

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

3071.

GÁSPÁR-HALASY VIKTÓRIA

Embriológia, őssejt és fejlődésbiológia
című program

Programvezető: Dr. Nagy Nándor, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Nagy Nándor, egyetemi tanár

A CXCL12 kemokin és receptorának (CXCR4) szerepe az utóbélhez asszociált szövetekben zajló sejt-vándorlási folyamatokban

Doktori értekezés

Gáspár-Halasy Viktória

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nagy Nándor, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Sótiné Dr. habil. Bagyánszki Mária, PhD, egyetemi docens
Dr. Tőkés Anna-Mária, PhD, tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Buzás Edit, DSc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Balogh Péter, DSc, egyetemi tanár

Dr. habil. Jakus Zoltán Péter, PhD, egyetemi docens

Budapest

2024

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK.....	4
1. BEVEZETÉS	6
1.1. A bélidegrendszer morfogenezise és funkciója	8
1.1.1. Az intrinsic bélidegrendszer.....	8
1.1.2. A bélidegrendszer extrinsic beidegzése a kismedencei régióban.....	10
1.1.2.1. A plexus pelvicus (plexus hypogastricus inferior).....	12
1.1.2.2. A Remak-ganglion	13
1.1.3. A bélidegrendszer embryonális fejlődése.....	14
1.1.3.1. A ganglionléc sejtek populációi és differenciálódása.....	14
1.1.3.2. A bélcső ganglionléc-kolonizációja.....	18
1.1.3.3. Az utóbél külső beidegzésének fejlődése: a Remak-ganglion és a plexus pelvicus kialakulása	21
1.1.3.4. A plexus pelvicus (plexus hypogastricus inferior) fejlődése a humán embryóban..	23
1.1.4. Az utóbél idegrendszerének rendellenes fejlődése: a Hirschsprung-kór	24
1.2. A csirke embryo jelentősége a fejlődésbiológiai kutatásokban	28
1.3. A kemokinek szerepe a sejtváándorlásban	30
1.3.1. A CXCR4 és a CXCL12 molekulák bemutatása és a jelátviteli szabályozása	31
1.3.2. A CXCR4-CXCL12 molekulák szerepe az embryonális sejtváándorlási folyamatokban	34
2. CÉLKITŰZÉSEK	37
3. MÓDSZEREK	38
3.1. Kísérleti állatok.....	38
3.2. A minták szövettani feldolgozása	39
3.2.1. Zselatinos fagyasztott metszetek készítése	39
3.3. Fluoreszcens immuncitokémia	40
3.3.1. Teljes szöveti fluoreszcens immuncitokémia.....	41
3.4. GFP-Remak-ganglion kiméra és choriollantois membrán technika	43

3.5. GFP-velőcső kiméra	44
3.6. Bursa Fabricii GFP-CAM kiméra.....	45
3.7. <i>In vitro</i> sejtmigrációs kultúra	46
3.8. Függesztett szervtenyészet.....	46
3.9. Mikrogyöngy implantáció	47
3.10. <i>In situ</i> hibridizáció	47
3.10.1. A paraplast beágyazás és a metszetek készítése	47
3.10.2. Digoxigenin-jelölt RNS-próbák készítése.....	48
3.10.2.1. „Maxiprep” készítés.....	48
3.10.2.2. DNS linearizálás.....	50
3.10.2.3. RNS-próba készítés.....	50
3.10.3. <i>In situ</i> hibridizáció.....	52
3.11. A mikroszkópos képek elkészítése, feldolgozása és értékelése.....	54
3.12. Statisztikai analízis	55
4. EREDMÉNYEK	56
4.1. A CXCR4 receptor expressziójának nyomonkövetése a bélidegrendszer létrehozó ganglionléc sejtek fejlődése során.	56
4.1.1. A CXCR4 receptort a cervicalis régióból származó ganglionléc sejtek expresszálják.....	56
4.1.2. A CXCR4 receptort a lumbo-sacralis ganglionléc-eredetű Remak-ganglion fejezi ki.....	58
4.2. A colorectum külső beidegzésének kialakulásának tanulmányozása madár és emlős embryokban.....	62
4.2.1. A Remak-ganglion rostjai részt vesznek az utóbél mesenchymájának és a neurális plexusainak beidegzésében.....	62
4.2.2. A pelvicus ganglionok CXCR4 receptort expresszálnak	64
4.2.3. A <i>CXCR4</i> receptor és a <i>CXCL12</i> ligand mRNS expressziója csirke embryóban.....	68
4.2.4. A <i>CXCL12</i> elősegíti a Remak-ganglionból eredő neuritok növekedését <i>in vitro</i>	70

4.2.5.	A CXCR4 jelátvitel gátlásakor nem alakul ki a bél extrinsic beidegzése.....	73
4.2.6.	A CXCL12 chemoattraktáns faktorként hat az extrinsic idegrostokra <i>ex vivo</i>	76
4.3.	A CXCR4-CXCL12 expressziójának elemzése a bursa Fabricii fejlődésében részt vevő sejtváندorlási folyamatokban.....	78
4.3.1.	<i>CXCR4</i> mRNS lokalizációja a bursa Fabricii fejlődése során.....	78
4.3.2.	<i>CXCL12</i> mRNS expressziója a bursa Fabricii különböző fejlődési stádiumaiban.....	79
4.3.3.	A CXCR4-CXCL12 jelátvitel funkciója a bursa Fabricii fejlődésében ..	83
5.	MEGBESZÉLÉS	86
6.	KÖVETKEZTETÉSEK.....	97
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	98
8.	SUMMARY	99
9.	IRODALOMJEGYZÉK	100
10.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	131
10.1.	A disszertációhoz kapcsolódó publikációk.....	131
10.2.	A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk	131
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	132

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

BFABP:	agyi zsírsavkötő fehérje (Brain Fatty Acid-Binding Protein)
BMP:	csont növekedési fehérje (Bone Morphogenetic Protein)
BSA:	borjú szérum albumin (Bovine Serum Albumin)
BSDC:	bursai szekréción dendritikus sejt (Bursal Secretory Dendritic Cell)
CAM:	chorioallantois-membrán (ChorioAllantoic Membrane)
CN:	csirke neuron (Chicken Neuron)
CSF1R:	kolónia stimuláló faktor 1 receptor (Colony Stimulatory Factor 1 Receptor)
CXCL12:	C-X-C kemokin ligand 12 (C-X-C motif chemokine Ligand type 12) (=SDF-1, stromal cell-derived factor 1)
CXCR4:	C-X-C kemokin receptor 4 (C-X-C motif chemokine Receptor type 4)
CXCR7:	C-X-C kemokin receptor 7 (C-X-C motif chemokine Receptor type 7)
D:	kikelés utáni nap (Day after hatching)
DAPI:	4,6 diamidino-2-fenilindol (4,6 DiAmidino-2-PhenylIndole)
DCC:	vastagbélrákban deletált gén (Deleted in Colorectal Carcinoma)
E:	embryonális nap (Embryonic day)
ECM:	extracelluláris mátrix (Extracellular Matrix)
EDN3:	endothelin 3
EDNRB:	B típusú endothelin receptor (Endothelin receptor type B)
ENS:	bélidegrendszer (Enteric Nervous System)
G-CSF:	granulocita-kolónia-stimuláló-faktor (granulocyte colony-stimulating factor)
GDNF:	glia-eredetű növekedési faktor (Glia cell line-Derived Neurotrophic Factor)
GFAP:	gliális fibrilláris savas fehérje (Glial Fibrillary Acidic Protein)
GFP:	zöld fluoreszcens protein (Green Fluorescent Protein)
GFRα-1:	GDNF család receptor alfa-1 (GDNF family receptor alpha-1)
HAEC:	Hirschsprung-asszociált enterocolitis (Hirschsprung-Associated Enterocolitis)
hg:	utóbél (Hindgut)

HH:	Hamburger-Hamilton szerinti stádiumbeosztás (Hamburger-Hamilton stages)
HNK1:	humán természetes ölő glikoprotein 1 (Human Natural Killer-1 glycoprotein; CD57)
HSCR:	Hirschsprung-kór; <i>congenitum megacolon</i>
HU:	humán Hud neuronális fehérje (human HuD neuronal protein)
Hud:	ELAV-szerű protein-4 (Embryonic Lethal Abnormal Visual protein-4)
ICaBP:	intesztinális kalcium kötő fehérje (Intestinal Calcium Binding Protein)
IPAN:	belső primer afferens neuronok (Intrinsic Primer Afferens Neuronok)
nNOS:	neuronális nitrogén-monoxid-szintáz (Neuronal Nitric Oxide Synthase)
NoR:	Remak-ganglion (Nerve Of Remak)
P75:	anti-neurotrophin receptor
PGP9,5:	protein gene product 9.5
PHOX2b:	párosított Homeobox gén 2b (Paired-like Homeobox 2b)
RET:	tirozin kináz receptor (Receptor tyrosine kinase)
S100:	intesztinális kalciumkötő protein-kalcium kötő doménja (ICaBP type calcium binding domain)
SDF-1:	stromális eredetű 1-es faktort (stromal cell-derived factor 1 (=CXCL12))
SMA:	alpha-simaizom aktin (alpha Smooth Muscle Actin)
SOX10:	Sry-vel rokon Homeobox gén 10 (SRY-related HMG-box 10)
SubP:	P-anyag neuropeptid (Substance P)
TUJ1:	βIII-tubulin (class III beta-tubulin)
VIP:	vazoaktív intestinalis peptid (Vasoactive Intestinalis Peptid)
WHIM:	warts, hypogammaglobulinemia, immunodeficiency, myelokathexis
Wnt1	Wingless MMTV integrációs hely faktor család 1 (Wnt Family Member 1)

1. BEVEZETÉS

Ma a fejlődéstan, az őssejtbiológia és a genetika együttes fejlődése vezető szerepet tölt be a biomedicinális kutatásban. A mesterséges intelligenciával támogatott mikroszkópos képalkotás és a sejt szintű RNS-szekvenálás technológiája forradalmasítja az embryo szerveződésének megértését. Összehangolva a különböző tudományterületek eredményeit, megoldásokat kínálnak a korábban meg nem választott kérdésekre és ez nem csak a kutatókat, hanem a hétköznapi embert is foglalkoztatja, hiszen nagy reményeket fűzünk ahhoz, hogy az őssejtterápia és a regeneratív gyógyítás hamarosan mindenki számára elérhetővé válik.

A sejt migrációs folyamatok hibái az embrionális fejlődés minden szakaszában súlyos defektusokhoz vezetnek, és olyan drasztikus következményekkel járnak, mint a magzati lethális vagy a születés után megjelenő abnormalitások, amelyek hozzájárulnak több szervrendszert is érintő szindrómák kialakulásához. A komplex fejlődési rendellenességek hátterében zajló hibás sejt vándorlást célzó kutatások olyan modellállatok alkalmazását igénylik, amelyekben az emberi szervezethez hasonló mechanizmussal történnek a sejt migrációs események és a kísérletes manipulálhatóságuk lehetővé teszi a háttérben működő celluláris és a molekuláris szabályozások feltárását. Csirke embryokon végzett embryomanipulációs módszerekkel igazolták először, hogy az intenzív migrációt végző ganglionléc sejtek hozzák létre a bélidegrendszer neuronokból és gliasejtekből álló komplex hálózatát (Yntema & Hammond 1954). A ganglionléc eredetű őssejt kísérletes eltávolításának következtében a bélidegrendszer nem jön létre (Goldstein et al., 2013; Schneider et al., 2019). Zebradánió, csirke, egér és tengerimalacok felhasználásával végzett vizsgálatok alátámasztották, hogy a bélidegrendszer szabályozza a bélmozgást, az enterális transzportfolyamatokat és a szekréciós működéseket (Brookes, 2001; Heanue et al., 2016).

A bélmozgás-problémák hátterében leggyakrabban a bélidegrendszert érintő fejlődési rendellenességek állnak (Goldstein et al., 2016; Rao & Gershon, 2018; Kang et al., 2021). A legjobban karakterizált, viszonylag gyakori előfordulású (1:5000) veleszületett patológiás elváltozás a *congenitum megacolon*, vagy Hirschsprung-kór, amelyet a colorectum változó hosszúságú ganglionmentessége jellemez. Az érintett vastagbél szakasz folyamatos izomfeszülése passzázsavart vagy bélelzáródást okoz, ennek következtében a bél proximalis szakasza a felgyülemelő széklet miatt kitágul. A

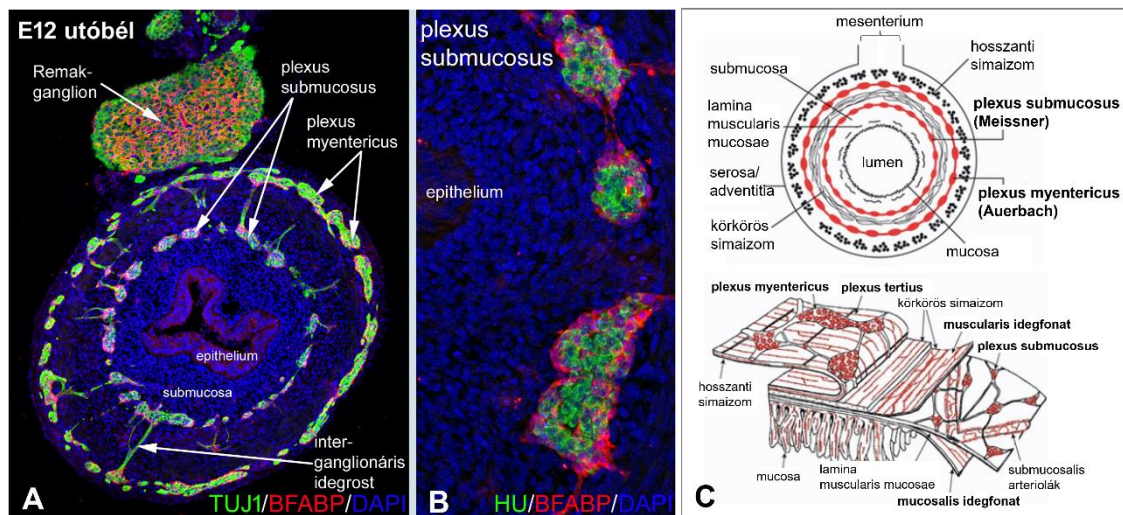
Hirschsprung-kórban szenvedő csecsemők sok esetben fejletlenek maradnak és röviddel a születésük után a tágult has, a bélgyulladás, a krónikus székrekedés és az epés hányás tüneteit mutatják. A kórkép kialakulását a bélidegrendszert létrehozó ganglionléc sejtek hibás vándorlásának, differenciálódásának vagy proliferációjának tulajdonítják, azonban a patomechanizmushoz a bél distalis részét beidegző nagyszámú, hypertrophicus extrinsic idegrost jelenléte is hozzájárul (Holland et al., 2010). Jelenleg a betegség egyetlen kezelési módja az érintett bélszakasz sebészi eltávolítása, azonban sok esetben a páciensek életminősége nem javul a műtétet követően sem, ami indokolja az alternatív gyógy módok kifejlesztésének szükségességét. A bélidegrendszert létrehozó őssejtek izolálása, felszaporítása és a sérült területre történő transzplantációja egy új, hatékony megoldást jelenthet a betegség gyógyításában, amelyhez ismernünk kell a beültetett sejtek és a fogadó szövet tulajdonságait (Kapur, 2009; Goldstein et al., 2016).

Az elmúlt években jelentős előrelépések történtek a sejt vándorlást irányító szabályozó események molekuláris alapjainak megértésében. Megfigyelték, hogy a növekedési faktorok, valamint a kemokinek a különböző sejtek, szövetek és szervek fejlődési folyamataiban hasonló szerepet töltenek be (Hynes & Lander, 1992; H. Xu et al., 2023). A C-X-C kemokin ligand 12 (CXCL12) és receptora, a C-X-C kemokin receptor 4 (CXCR4) kiemelkedik szerteágazó szerepével. A molekulapáros funkciójának feltárásakor elsőként a CXCR4-CXCL12 jelátvitel T- és B-lymphocytaforgalom folyamataiban betöltött elengedhetetlen szerepét bizonyították emlősejtekben (Beck et al., 2014). További laboratóriumi kutatások kimutatták, hogy a CXCR4-CXCL12 molekulapáros felelős a primordiális csírasejtek, a melanoblastok, a vérképző őssejtek, az aortafal simaizom sejtjeinek, a szív ganglionléc sejtjeinek megfelelő vándorlásáért, illetve, hogy a cranialis és a törzsi ganglionléc sejtek szintén a CXCL12 gradiens hatására vándorolnak és hozzák létre a szimpatikus ganglionokat (Olesnický Killian et al., 2009; Kasemeier-Kulesa et al., 2010; Escot et al., 2013). Bár a CXCR4-CXCL12 szignalizációról bebizonyították, hogy fontos szerepet játszik a neurogenesisben azáltal, hogy támogatja a neurális progenitorok migrációját és érését, valamint befolyásolja az axonális projekciót a központi és a perifériás idegrendszerben, amit a szakirodalom szintén „sejtvándorlásként” definiál (Doitsidou et al., 2002; Belmadani et al., 2005; Lieberam et al., 2005; Ödemis et al., 2005; Tanaka et al., 2010; Cheng et al., 2017), a bélidegrendszer fejlődésében betöltött szerepéről még nincsenek adatok.

1.1. A bélidegrendszer morfogenezise és funkciója

1.1.1. Az intrinsic bélidegrendszer

A bélidegrendszer a perifériás idegrendszer legnagyobb alegysége, amely az oesophagustól a rectumig terjedő, belső (intrinsic) és külső (extrinsic) kompartmentekre osztható hálózat. Ez a nagy kiterjedésű autonóm egység felelős a bélmozgás, a lokális vérátáramlás, a mucosalis transzport és szekréció, a barrier funkciók fenntartásáért, illetve a normál bélflóra, az immun és endokrin feladatok szabályozásáért (Goldstein et al., 2013; Schneider et al., 2019). A belső bélidegrendszer elemei két koncentrikus ganglionált gyűrűbe szerveződnek, amelyek összeköttetésben vannak interganglionáris idegrostokon keresztül. A bélfal körkörös és hosszanti simaizomrétege között a plexus myentericus (Auerbach-féle plexus), a körkörös simaizomréteg lumenális oldalán a plexus submucosus található, amely további egy külső (Schabadasch-féle plexus) és egy belső (Meissner-féle plexus) ganglionált idegfonatból áll (1. ábra, A, B, C). A colorectális szakaszon a submucosa lumenáris részén gyakran megfigyelhető egy harmadik plexus, a plexus tertius (Nagy et al., 2007, 2012; Zhang et al., 2010) (1. ábra, C). A plexus submucosus az oesophagus területén hiányzik (Timmermans et al., 2001).



1. ábra. A colorectális bélidegrendszer szövettani felépítése. A) A 12 napos (E12) csirke embrionális colorectum középső szegmensének keresztmetszetén elvégzett fluoreszcens immuncitokémia mutatja, hogy a β -III tubulint (TUJ1) tartalmazó neuronok és az agyi zsírsavköti fehérjét (BFABP) kifejező enterális gliasejtek már embryonális korban kirajzolják az intrinsic bélidegrendszeri plexusokat. **B)** A plexus submucosus ganglionjaiban az ELAV neuron specifikus RNS kötő fehérje (HU) immunpozitivitású neuronális sejttetek szoros kapcsolatban állnak a BFABP tartalmú gliasejtekkel. **C)** A sematikus ábra az emberi szervezet béltraktusának keresztmetszetét (felső ábra) és annak falszerkezetét mutatja rétegekre lebontva. *Az ábrák forrása: A, B) saját készítésű képek; C) Jänig, 2022, módosítva.*

A bélidegrendszer több, mint 100 millió idegsejtből áll (meghaladva a gerincvelőben található neuronok számát), és a funkciójuk szerint 18 altípusba kategorizálható enterális neuronok számos olyan neurotranszmittert termelnek, amelyek a központi idegrendszerben is jelen vannak, valamint képes a központtól független működésre is, így a bélidegrendszer joggal szolgál rá – a manapság használt hangzatos – „második agy” jelzőre (Brookes, 2001; Schemann & Williams, 2005; Goldstein et al., 2013; Schneider et al., 2019). Az enterális neuronok 4 fő osztályát a neuronok morfológiája, vetülete, elsődlegesen kimutatható ingerületátvivő anyagai, valamint fiziológiájuk alapján határozták meg, így elkülöníthetők: moto- és szekretomotoros neuronok, interneuronok, intrinsic primer afferens neuronok (IPAN) és intesztinofugális neuronok. A tunica mucosae és a lamina muscularis mucosae a plexus myentericus serkentő és gátló motoneuronjai idegzik be. A propulzív reflexek kivitelezését a fel- és leszálló interneuronok végzik. Az IPAN nagy csoportjába mucosális kemoszenzoros neuronokat, mechanoreceptorokat vagy a motilitási reflexek beindítását végző nyúlásra érzékeny neuronokat sorolják (Furness, 2000; 2006). A plexus submucosus szekretomotoros neuronjai a víz- és elektrolit kiválasztás egyensúlyát lokális reflexkörökön keresztül központi irányítás mellett szabályozzák. A gyomor szekretomotoros neuronjai a parietális sejtek gyomorsav, és a fősejtek pepszinogén termelését befolyásolják, illetve a submucosális arteriolák vazodilatációját irányítják. A gyomor-bél traktus enteroendokrin sejtjeit is a submucosa szekretomotoros neuronjai látják el rostokkal (Brookes, 2001; Costa, 2000; Furness, 2000; Spencer & Hu, 2020).

A neuronok mellett a gliasejteknek is nagy jelentősége van a normál bélidegrendszeri feladatok ellátásában. Morfológiájuk és intra- vagy extraganglionáris elhelyezkedésük alapján az enterális glia 6 fő típusát határozták meg: a myentericus plexus neuronjainak sejttestével kapcsolatban álló (IMP) és a submucosális plexusok neuronjainak sejttestével kapcsolatban álló glia (ISMP, 1. ábra, B), az idegrostokhoz asszociált myentericus glia (II), az idegrostokhoz asszociált extraganglionáris glia a myentericus és a submucosális plexusok szintjén (III_{MP/SMP}), a mucosális glia (III_{mucosa}), végül a simaizom rétegek idegrostjaihoz asszociált gliasejtek (IV). Érdekes módon az egyes glia típusok kialakulását elsősorban a környezeti jelek határozzák meg, például a mucosális glia a közös enterális glia populációból a mikrobiomból származó szignálók hatására vándorol a rendeltetési helyére (Seguella & Gulbransen, 2021). A gliasejtek és

az enterális neuronok közötti jelátviteli mechanizmusok befolyásolják a gasztrointesztinális reflexeket, a szenzoros funkciókat és a bél-agy kommunikációban is fontos szerepet játszanak (Kaelberer et al., 2018). Ezenkívül az enterális glia és az immunsejtek közötti kétirányú kommunikáció hatással van a bélrendszer homeosztázisára (Seguella & Gulbransen, 2021).

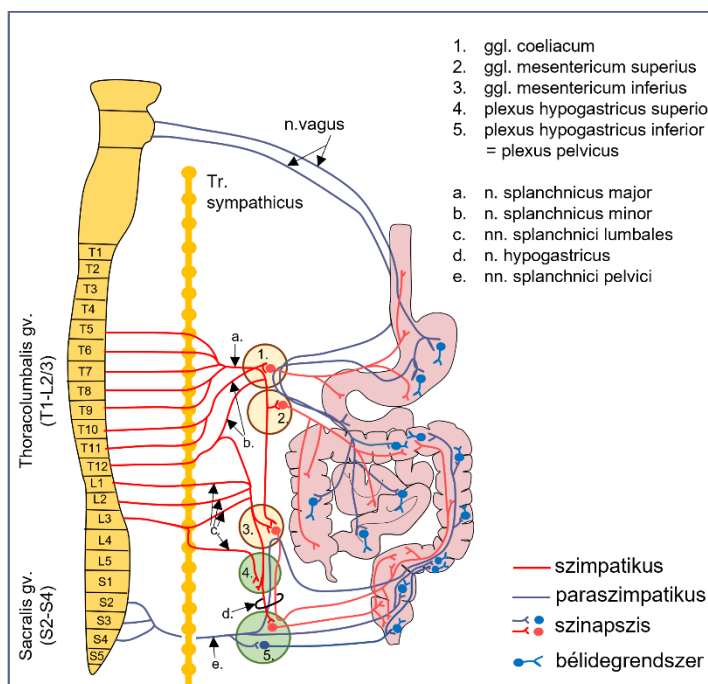
Dóra és munkatársai rávilágítottak arra, hogy a bélidegrendszer ideg-, és gliasejtjein kívül egy harmadik sejtpopuláció is létezik a ganglionokban: az intraganglionáris makrofágok, amelyek mieloid sejtvonalból származó, makrofág jellegű sejtek (Dora et al., 2018). Az intraganglionáris makrofágok közvetlenül érintkeznek az enterális neuronokkal, valamint gliasejtekkel és szerepük van az extracelluláris mátrix (agrin és kollagén IV), továbbá a glia talpak által alkotott vér-bélidegrendszer barrier integritásának megváltozásával járó gyulladásos folyamatokban (Dora et al., 2021).

A myentericus és submucosalis plexusok enterális neuronjai lokális reflexköröket alkotva képesek a központi idegrendszertől függetlenül működni és szabályozni a bélfal izomzatának kontraktilitását, mirigyeinek víz- és ionszekrécióját, valamint a bélrendszer vérrellátását (Kirchgessner és Gershon, 1990; Schneider et al., 2019). Ez a belső neurális kör polarizált, ezáltal egészséges körülmények között emberben a béltartalom kizárólag aborális irányban mozog. Azáltal, hogy a bélben áthaladó táplálék a bél feszülését idézi elő, a kiváltási ponttól rostralis irányban lévő bélszakasz simaizomzata a felszálló pályák aktivációjának köszönhetően összehúzódik, míg a caudalis szegmensben a leszálló pályák stimulációjának hatására a simaizomzat ellazul, így a béltartalom aborálisan irányítva halad a perisztaltikus reflexnek köszönhetően (Bayliss, 1899). A másik neurogén összehúzódási mintázat a szegmentációs kontrakció, ami oda-vissza keveri a béltartalmat a megfelelő emésztés és a tápanyagok hatékony felszívódásának elősegítésére (Fung & Vanden Berghe, 2020).

1.1.2. A bélidegrendszer extrinsic beidegzése a kismedencei régióban

Az autonóm idegrendszernek fontos szerepe van a test homeosztázisának változó körülmények között való fenntartásában. Az autonóm idegrendszer két fő részét – a paraszimpatikus és a szimpatikus idegrendszert – a gasztrointesztinális traktus esetében egy harmadik egység egészíti ki, a bélidegrendszer, amely a korábban említett intramurális plexusokból áll. A kismedencei régióban a distalis vastagbélszakasz beidegzéséért elsősorban az intrinsic bélidegrendszer felelős, ezt modulálja a szimpatikus

és a paraszimpatikus perifériás elemek által létrehozott extrinsic idegfonat, a plexus pelvicus. Az extrinsic (szimpatikus és paraszimpatikus) útvonalak nagymértékben befolyásolják a bélműködést, hatásuk nagy része közvetetten az enterális neuronális hálózatok modulációján keresztül történik (Brookes et al., 2009). A thoracolumbalis gerincvelői szakasz szimpatikus preganglionáris neuronjai (a gerincvelő cornu lateralisból) szinaptikus kapcsolatot létesítenek a prevertebrális ganglionok (ganglion (ggl.) mesentericum superius et inferius) és a kismedencében elhelyezkedő plexus pelvicus posztganglionáris idegsejtjeivel, amelyek a distalis vastagbél szimpatikus beidegzését adják. Ez a szimpatikus hatás lassítja a bélmotilitást és csökkenti a bél szekréción folyamatát (Furness et al., 2014). A paraszimpatikus preganglionáris neuronok a sacralis gerincvelő intermediolaterális szürkeállományából származnak, szinaptizálnak a plexus pelvicus posztganglionáris idegsejtjeivel és az intrinsic bélidegrendszer ganglionjaival (2. ábra). A paraszimpatikus hatás fokozza a motilitást és a mirigyelválasztást. (Furness et al., 2014; Niu et al., 2020; Spencer & Hu, 2020). Egy nemrégiben közölt feltételezés szerint azonban a distalis vastagbélbe vezető sacralis autonóm rostok valójában sajátos funkciójú szimpatikus idegrostoknak tekinthetők (Espinosa-Medina et al., 2016; Sivori et al., 2024). A distalis vastagbél és a végbél autonóm beidegzése felelős a székletkontinencia fenntartásáért és szabályozza a bélidegrendszer által regulált perisztaltikát és székletürítést (Browning & Travagli, 2014).



2. ábra. A humán központi idegrendszer és a bélidegrendszer közötti kölcsönhatást bemutató sematikus illusztráció.

A piros vonalak a szimpatikus, a kék vonalak a paraszimpatikus természetű idegrostokat szemléltetik.

T, thoracalis; L, lumbalis; S, sacralis gerincvelői szegmens (gv).

Az ábra forrása: saját készítésű ábra Felten et al., 2003; Keast, 2006 és Furness et al., 2014 alapján.

1.1.2.1. A plexus pelvicus (plexus hypogastricus inferior)

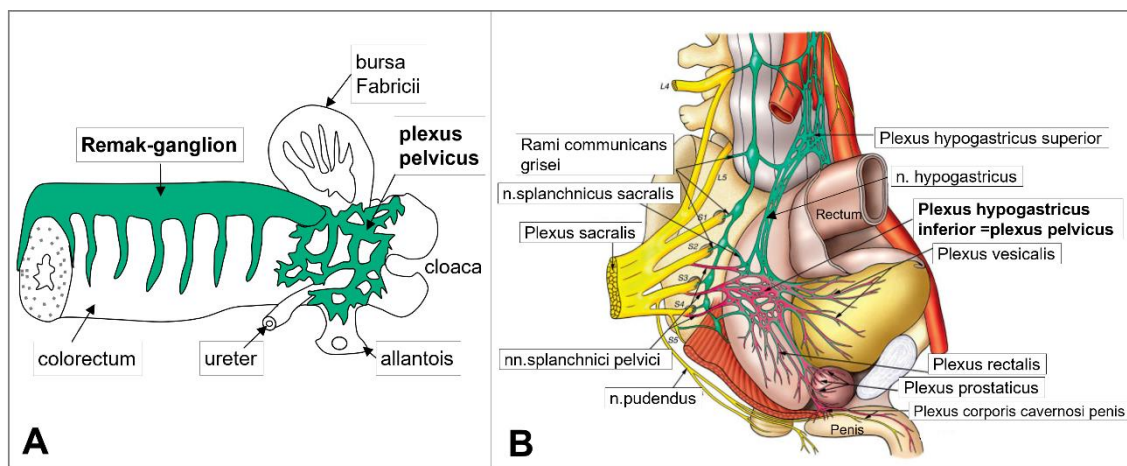
A kismedencei szerveket a plexus hypogastricus inferior, vagy más néven a plexus pelvicus idegrostjai innerválják. A kétoldali nervus (n.) hypogastricus a plexus hypogastricus superiorból ered, ami a plexus aorticus-szal és a ggl. mesentericum inferiorral van összeköttetésben. A kétoldali n. hypogastricusok a plexus hypogastricus inferiorokban folytatódnak. A plexus hypogastricus inferiorok (más néven plexus pelvicusok) háromszög alakú, extraperitoneális helyzetű plexusok, amik létrehozzák a plexus vesicalist, a plexus rectalis mediust, továbbá férfiaknál plexus prostaticust, nőknél a plexus uterovaginalist (Mauroy et al., 2007; Röthlisberger et al., 2018) (3. ábra, B). A kistestű állatokban, így egérben (Wanigasekara et al., 2003) vagy patkányban (Arellano et al., 2019) prominens kismedencei ganglionok alakulnak ki, amik az alsó n. hypogastricushoz kapcsolódnak. Nagyobb testű gerincesekben, mint csirkében (Teillet, 1978; Nagy et al., 2007), a kutyákban (Li & Masuko, 2001), és az emberi (Tekenaka et al., 2005) szervezetben is plexusok formálódnak, amelyekben kisebb ganglionokat idegrostok kötnek össze egymással (3. ábra, B). Emberi szervezetben a plexus pelvicus a distalis vastagbélből a colon sigmoideumot és a rectumot innerválja, a plexus pelvicusból eredő rostok a körkörös és a hosszanti simaizomréteg között futnak és szinaptizálnak a plexus myentericus-szal (Gonella et al., 1987). A plexus hypogastricus inferiorhoz (plexus pelvicushoz) a n. hypogastricus, a nn. splanchnici lumbales (a truncus sympathicusból, T10-L2 gerincvelői szintről) és a nn. splanchnici pelvici (S2-4 gerincvelői szintről) adnak afferentációt (Mauroy et al., 2007) (2. ábra). Mivel a plexus pelvicus a sacralis gerincvelőből származó (definíció szerint paraszimpatikus) bemenet mellett a felső lumbális gerincvelői szintekről szimpatikus bemenetet is kap (Keast, 2006), ezért kevert funkciójúnak, szimpatikusnak és paraszimpatikusnak is tekinthető (Keast, 1995). 2016-ban Espinosa-Medina és munkacsoportja egér és csirke embryokon végzett ontogenetikai vizsgálatai alapján a sacralis innervációt szimpatikusnak minősítették a neuronspecifikációért felelős transzkripciós faktorok jelenléte alapján (ISLET1, GATA3 és a HAND1). A paraszimpatikus idegrendszer perifériás részéhez eszerint a vélemény szerint kizárólag az agyidegek visceromotoros komponensei járulnának hozzá, a szimpatikus idegrendszer perefáriás része pedig a thoracolumbalis és a sacralis gerincvelői idegek vegetatív rostjaiból állnak (Espinosa-Medina et al., 2016).

A bélrendszer extrinsic ellátását tekintve az egerek pelvicus ganglionjaihoz hasonlóan a madár plexus pelvicus extrinsic innervációt biztosít a distalis utóbél számára (Nolf, 1934 ; Nagy et al., 2007) , amelyhez a praeaorticus plexus, a pelvicus visceális idegek, a mediális gerincvelői paravertebralis törzsi, valamint a Remak-ganglion rostjai csatlakoznak (Browne, 1953).

1.1.2.2. A Remak-ganglion

A madarak – az emlősökben már jól ismert – prevertebralis szimpatikus ganglionjaik mellett rendelkeznek egy további, morfológiailag is jól elkülöníthető, autonóm idegtörzsszel, amelyet a lengyel-német embryológus, fiziológus és neurológus Robert Remak 1847-ben – mint a bélhez asszociálódó ganglion – „nervus intestinalis”-ként írt le (Remak, 1847). A későbbiekben Remak-ganglionként ismert struktúra, az embryonális fejlődés végére 30-45 különböző méretű gangliont tartalmaz, ami a mesorectumban és a mesentériumban végig, a colorectum, a coecum (ahol kapcsolódik a plexus coeliacumhoz) és a vékonybél dorsalis oldalán a cloacától a duodeno-jejunalis junctioig található meg (Allan & Newgreen, 1977; Nolf, 1934). A n. vagus, a ggl. coeliacum, a ggl. mesenterica superior és a plexus pelvicus rostjai is elérik ezt a láncolatot, valamint fejlődés közben már kommunikálnak a praeaorticus plexussal (Nolf, 1934; Browne, 1953; Yntema és Hammond, 1954), illetve a paravertebralis szimpatikus idegek szintén belépnek az ideg állományába (Bennett és Malmfors, 1970). Az elektrofiziológiai és farmakológiai vizsgálatok a Remak-ganglion bélmotilitásban betöltött szerepét bizonyították. Elektromos ingerlése a végbél izomzatának kontrakcióját váltotta ki, atropin alkalmazása részben vagy teljesen gátolta az izomösszehúzódnás válaszát. A cholinerg hatást a Remak-ganglion az entericus neuronoktól kapja, hasonló módon az emlősök praevertebralis neuronjaihoz (Komori et al., 1984, 1988). Kiterjedt vizsgálatok bizonyították, hogy a már kikelt állatok idegláncolata tartalmaz tirozin-hidroxilázt vagy calbindin kalciumkötő fehérjét, illetve β -endorphin immunreakciót mutató neuronokat (Lunam, 1993). Nem-adrenerg, nem-kolinerg (nonadrenergic noncholinergic (NANC)) gátló posztganglionáris rostok elhagyják a Remak-gangliont a nagyobb caudális ágakon keresztül, amik a végbél izomzatát idegzik be (Komori & Ohashi, 1982). A Remak-ganglion vasoaktív intesztinális neuropeptidet (VIP) expresszáló rostokat is tartalmaz, amely az egész bélrendszer intramurális ganglionjaiban kifejeződnek és a bursa

Fabriciiben is kimutathatók. A VIP jelenléte a myentericus plexus gátló neuronjaiban és a submucosalis szekréción motoneuronokban egyrészt gátolja bél simaizomzatának összehúzódását, másrészt serkenti a mirigyek szekréciónját (Epstein & Poulsen, 1991). A Remak-ganglionban is kimutatható P-anyag (substance-P, SubP) a tachykinin családba tartozó neurotranszmitter, amely fontos a gasztrointesztinális traktus normál fiziológiai funkcióinak fenntartásáért, a simaizomokra és a szekréciónra kifejtett excitátoros hatásán keresztül (Liu et al., 2009). A plexus pelvichoz hasonlóan - a szimpatikus neuronokra jellemző transzkripciós faktorokat expresszálja (ISLET1, HAND1) (Espinosa-Medina et al., 2016). A Remak-ganglion, együtt a plexus pelvich-szal a korábban említett plexus hypogastricus inferiornak feleltethető meg (Liu et al., 2007) (3. ábra, A).



3. ábra. A kismedencei szerveket beidegző plexus pelvich és a Remak-ganglion szerkezete. A) A madarakra jellemző Remak-ganglion a plexus pelvich folytatása, összességében a humán plexus hypogastricus inferiorral egyezik meg. B) A humán kismedencei szervek plexus pelvichből kiinduló vegetatív beidegzésének összefoglaló ábrázolása egy férfi situs példáján, a jobb oldali os coxae eltávolítása után. *Az ábrák forrása: A) Nagy et al., 2007 után módosítva; B) Scheuerer & Raab, 2016, módosítva.*

1.1.3. A bélidegrendszer embryonális fejlődése

1.1.3.1. A ganglionléc sejtek populációi és differenciálódása

A bélidegrendszert alkotó neuronok és gliasejtek egy átmeneti multipotens őssejt populációból, a ganglionlécéből (crista neuralis) származnak. A ganglionléc sejtek a feji szegmens záródó velőcsővének velőredői területéről és a záródott caudálisabb (törzsi) velőcső szakasz dorsalis részéről epithelio-mesenchymalis tranzíció révén leválnak a neuroepitheliumról és meghatározott vándorlási útvonalakon eléri a célszerveket, ahol változatos sejttypusokat alakítanak ki (Bronner & LeDouarin, 2012). A ganglionléc sejtek

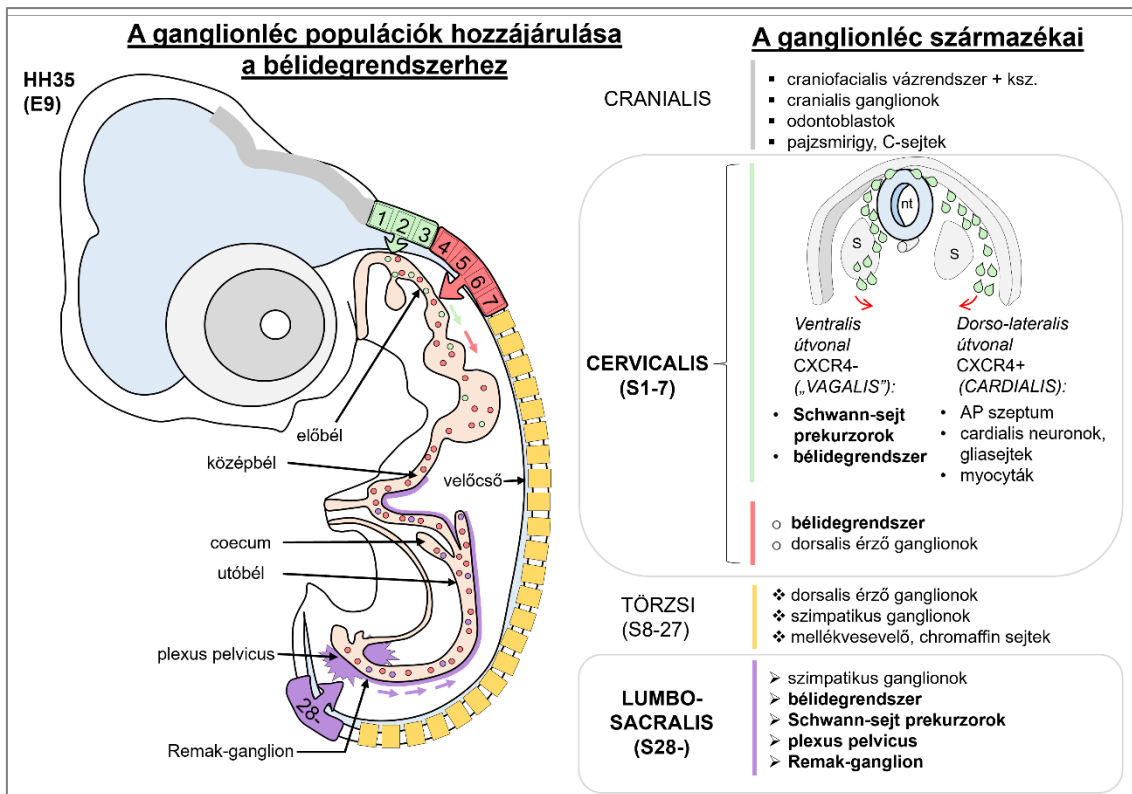
felfedezése 150 évre nyúlik vissza és Wilhelm His svéd anatómus nevéhez fűződik, aki csirke embryóban azonosította először a velőlemez és a „nem-ectoderma” határán lokalizálódó sejtcsoportot, ami képes a feji és gerincvelői ganglionok kialakítására (His, 1868). Később zebradánió (Rocha et al., 2020), egér (Trainor, 2005) és emberi (Srinivasan & Toh, 2019; Thomas et al., 2008) embryokban is azonosították ezt a sejtpopulációt. A ganglionléc sejtek négy alpopulációját különböztetjük meg a velőcső és a kialakuló szomiták cranio-caudalis tagozódása mentén: cranialis, cervicalis, törzsi és lumbosacralis ganglionléc populációkat, amelyek külön-külön meghatározott, saját migrációs útvonallal, differenciációs potenciállal és génexpressziós profillal rendelkeznek (Bronner-Fraser, 1993; 2012; Nagy & Goldstein, 2017) (4. ábra).

A bélidegrendszer fejlődése szempontjából kiemelten fontos, az első 7 szomitapár magasságában kialakuló, a velőcső cervicalis szakaszából származó ganglionléc populáció. Csirke embryokon végzett ganglionléc ablatios kísérletekkel igazolták először az intesztinális traktus intrinsic idegrendszerének ganglionléc eredetét (Yntema & Hammond, 1954). Csirke-fürj, illetve csirke és zöld fluoreszcens fehérjét expresszáló (green fluorescent protein, GFP) transzgenikus csirke kimérák létrehozásával határozták meg, hogy a cervicalis ganglionléc hozza létre a bélidegrendszeri prekursorok döntő többségét (Le Douarin & Teillet, 1973; Nagy et al., 2012). A velőcső cervicalis szakaszából származó ganglionléc sejtek funkcionálisan további alcsoportokra: az 1-3., illetve a 4-7. szomitapárok magasságából kilépő ganglionléc populációkra oszthatók. Az 1–3. szomita szinten további két csoportot azonosítottak a dorso-lateralis, illetve a ventralis útvonalon migráló sejtekét (4. ábra). A 10. Hamburger-Hamilton stádiumú (HH10, a fertilizációt követő 2. embryonális napnak (E2) felel meg, amikor az embryo 10 szomitapárral rendelkezik (Hamburger & Hamilton, 1992)) csirke embryóban (egérben 8,5. embryonális nap) a szív telepéhez és a 3. garatívhez dorso-laterálisan vándorló, úgynevezett cardialis ganglionléc sejtek hozzák létre a truncus aortico-pulmonaris terület szeptumait, a paraszimpatikus cardialis neuronokat és gliasejteket, illetve a myocytákat (Stoller & Epstein, 2005). Az említett populáció vándorlását a CXCR4 receptor irányítja a garat és a szív mesenchymájában kifejeződő CXCL12 hatására (Escot et al., 2013). A ventralis útvonalon haladó sejtcsoport – amely CXCR4 negativitást mutat (Tang et al., 2021) – a HH13 stádiumban indul meg a velőcső dorsalis részéről, kialakítva a nyelőcső és a gyomor falának ganglionjait, valamint az előbél

bélidegrendszerét (Kuo & Erickson, 2010; Nagy & Goldstein, 2017). Ugyanez a sejtcsoport Schwann-sejt prekursorokként, először a n. vagus paraszimpatikus ganglionjait kolonizálja (innen ered az angol szakirodalomban olvasható „vagalis” ganglionléc elnevezés), ahonnan majd a nyelőcső és a gyomor intramurális plexusaihoz járul hozzá (Espinosa-Medina et al., 2014). A cervicalis populáció caudalis szegmensének (4-7. szomitapár) ventralis útvonalon vándorló ganglionléc sejtei csatlakoznak az előbelet kolonizáló 1-3. szomitától kilépő sejtcsoporthoz és létrehozzák a teljes béltraktus intinsic bélidegrendszerét. A cervicalis, valamint a 28. szomitától caudalisan kivándorló lumbo-sacralis ganglionléc szakaszt „szimpatointerikus” populációnak is nevezik, mert egyrészt az aorta dorsalis körüli szimpatikus láncot, a ggl. cervicale superiust, a plexus pelvicust, a madarak Remak- ganglionját, valamint az enterális plexusokat képezik. A 7. szomitától kivándorló sejtek a dorsalis érző ganglionokká és a melanocytákká differenciálódnak (Burns et al., 2000; 2005; Espinosa-Medina et al., 2016; Rao et al., 2018) (4. ábra).

A 8. és a 28. szomita között kilépő törzsi ganglionléc sejtek ugyan nem járulnak hozzá a belső enterális plexusok kialakításához, de különböző központi és perifériás idegrendszeri struktúrákat hoznak létre, amelyek innerválják a gasztrointesztinális traktust. A nevezett sejtcsoportok a dorsalis érző ganglionokat, para- és prevertebralis szimpatikus ganglionokat, a ggl. coeliacumot, a ggl. mesentericum inferiort, és Schwann-sejteket hoznak létre. A mellékvesevelő chromaffin sejtei is a törzsi ganglionléc populációból származnak (Artinger & Bronner-Fraser, 1992; Kuo & Erickson, 2010) (4. ábra).

A lumbo-sacralis ganglionléc sejtek a 28. szomitától (csirkében) caudálisan vándorolnak ki a velőcsőből, és részt vesznek az colorectum, a coecum és a posztumbilicalis középbél bélidegrendszerének kialakításában madarakban és emlősökben is, neuronokkal és gliasejtekkel az intrinsic bélidegrendszerhez 15-20%-ban járulnak hozzá, mely sejtek egyik csoportja az extrinsic rostok mentén bevándorló Schwann-sejt prekursorokat adja (Le Douarin & Teillet, 1973; Pomeranz & Gershon, 1990; Serbedzija et al., 1991; Burns & Le Douarin, 1998; Burns et al., 2000; Kapur, 2000; Nagy et al., 2007; Uesaka et al., 2015). Ezenkívül ez a ganglionléc csoport melanocytákat és szimpatikus ganglionokat is képez. A lumbo-sacralis ganglionléc sejtek létrehozzák a Remak-gangliont és a plexus pelvicust (Catala et al., 1995) (4. ábra).



4. ábra. A ganglionléc sejtek populációi, származékai, különös tekintettel a bélidegrendszer kialakítására csirke embryóban. Az axiális tagozódás alapja a HH16 stádiumú csirke szomita (S) szintjei alapján történik és az ábrán a 9 napos (E9, HH35) embryon látható téglalapokban (szomiták) leírt számok jelzik. Az S1-7 színről kilépő, S1-3 alcsoportba tartozó sejtek (zöld) kétféle migrációs útvonalat követnek (jobb oldali ábra, zöld sejtek), a ventralis útvonalon haladók érik el a bélrendszert, ahol – csatlakozva az S4-7 populációhoz (piros) – cranio-caudalisan vándorolva (nyilak) képesek a bélcső teljes kolonizációjára (zöld és piros pöttyök). A 28. szomitától caudalisan kivándorló, majd a bélben rostralisan migráló (nyilak) lumbo-sacralis ganglionléc sejtek (lila pöttyök) a posztumbilicalis szakaszig vesznek részt a bélidegrendszer ganglionjainak kialakításában, a Remak-ganglion és a plexus pelvis képzése mellett. Melanocyta irányba az összes ganglionléc populáció képes differenciálódni. AP, aortico-pulmonaris; ksz., kötőszövet; nt, velőcső; S, somita. Az ábra forrása: saját készítésű ábra, Rothstein et al., 2018 és Nagy & Goldstein, 2017 alapján.

A közelmúltban egér embryokon végzett sejtors követési kísérletek azt mutatták, hogy a Schwann-sejtek prekurzorai a prevertebrális ganglionokból és pelvis ganglionokból származó külső idegek mentén jutnak a béltraktusba, először enterális glia fenotípust vesznek fel, majd calretinint expresszáló neuronokká differenciálódnak (Niu et al., 2020; Uesaka et al., 2015). Egy kínai kutatócsoport idén megjelent munkájában arról értekezik, hogy a lumbo-sacralis ganglionléc populáció nem járul hozzá a bélidegrendszer kialakításához, azt kizárólag a cervicalis gerincvelői szintből származó sejtek alakítják ki. Ezt a feltevést egyrészt azzal magyarázzák, hogy a nyomkövetési

kísérletekben nem találtak a lumbo-sacralis sejteket a distalis bélszakasz ganglionjaiban, másrészt a lumbo-sacralis sejtek esetleges jelenléte annak lehet köszönhető, hogy a sejtek csak keresztülhaladnak az utóbélben annak érdekében, hogy elérjék a kétoldali pelvicus ganglionokat, így szerintük az említett sejtcsoport csak az autonóm ganglionokat, a dorsalis érző ganglionokat és a pelvicus ganglionokat kolonizálják (Yu et al., 2024). Ezzel szemben – a korábbi adatokat alátámasztva – a csirke enterális ganglionok egy-sejtes-transzkriptomikai elemzése azt mutatja, hogy a lumbo-sacralis ganglionléc sejtek nem csak hozzáadnak az intrinsic plexusokhoz, de jelentősen hozzájárulnak ahhoz, hogy postumbilicalisan egy eltérő sejttöszetételű bélidegrendszer alakuljon ki a craniális szakaszokhoz képest (Jacobs-Li et al., 2023).

1.1.3.2. A bélcső ganglionléc-kolonizációja

A cervicalis ganglionléc sejtek előbélbe történő belépése (innenről enterális ganglionléc sejteknek hívjuk) csirke és fűz embrióban már a 3. embryonális napon megvalósul (Burns & Le Douarin, 1998), mely egérben a 9,5 embryonális napnak feleltethető meg (Anderson et al 2006), humán embrióban ugyanez a folyamat a foetalis fejlődés 4. hetében történik (Fu et al., 2004). A ganglionléc sejtek csirkében az 5,5. embryonális napra érik el a coecumot, ami egérben a 11,5. napon, emberben a 6. héten történik (Nagy & Goldstein, 2017). A coecumon való áthaladás kritikus jelentőségű a colon normál bélidegrendszerének kialakulásához, aminek bizonyítéka, hogy a coecum ablatio a distalis bél aganglionózisához vezet (Nagy et al., 2021). A coecum által biztosított mikrokörnyezet, a termelt növekedési faktorok a ganglionléc sejtek proliferációjának és differenciációjának befolyásolásával éri el, hogy elegendő számú, progenitor állapotú, migrációra képes sejt érje el a következő bélszegmenst (Nagy et al., 2021; Kovács et al., 2023;). Csirke embrióban a bélrendszer teljes kolonizációja, amikor az enterális ganglionléc sejtek elérik az utóbél legdistalisabb részét, a 8. embryonális napon következik be (Le Douarin & Teillet, 1973a; Nagy et al., 2012). Az egér embryo ganglionléc sejtjei a 14. embryonális napon (Young et al., 1998), a humán embrióban a 8. hétre fejezik be vándorlásukat (Fu et al., 2004; Wallace & Burns, 2005). Egerekben leírták, hogy az enterális ganglionléc sejtpopuláció egy bizonyos csoportja megkerüli a hagyományos cranio-caudalis útvonalat, és a distalis középbél és az utóbél között található mesenteriumon keresztül jut el a colorectumba (Nishiyama et al., 2012).

A ganglionléc sejtek vándorolnak és proliferálódnak, mielőtt neurális és glia altípusokká differenciálódnának. A differenciálatlan ganglionléc sejteket molekuláris tulajdonságaik alapján lehet elkülöníteni: a Sry-vel rokon homeobox gén 10 (SRY-related HMG-box 10; SOX10) és párosított homeobox gén 2b (paired-like homeobox 2b; PHOX2b) transzkripciós faktorokat, a G-fehérjéhez kapcsolt endothelin receptor B-t (EDNRB), az anti-neurotrophin receptor (P75^{NTR}, a továbbiakban P75) és a tirozin kináz receptort (RET) fejezik ki. Az előbelet kolonizáló enterális ganglionléc sejtek rostro-caudalisan haladnak és először a plexus myentericus alakítják ki, de az utóbélben megfordul a sorrend, a nyálkahártya alatti régió hamarabb megtelepszik (Burns és Le Douarin, 1998; Nagy et al., 2007, 2012). A kolonizációs folyamat során a sejtek csoportban vándorolnak, a legelől haladók még differenciálatlanok, és a fentebb említett molekulák széles skáláját expresszálják, míg a migrációs „hullámfront” mögött a ganglionléc sejtek már az érés különböző szakaszaiban vannak.

A neuron irányba történő elköteleződés röviddel azután kezdődik, hogy a sejtek belépnek a fejlődő előbélbe, a glia irányú differenciáció később indul meg. A neuronokban a SOX10 és a P75 szintje lecsökken, a RET és a PHOX2b pozitivitás megmarad. A neurális sejt vonal képviselői még ugyan progenitor alakban vannak, de már termelik az idegi molekulákat, többek között a protein gén termék 9.5-öt (protein gene product 9.5, PGP9,5), a neurofilamentumot, β III-tubulint (TUJ1), ELAV neuron specifikus RNS kötő fehérje (HUC/D), illetve mitotikus aktivitást mutatnak (Nagy és Goldstein, 2017). Differenciált állapotba akkor kerülnek, amikor neurotranszmittereket is expresszálnak: neurális nitrogén-monoxid-szintáz (nNOS), VIP, neuropeptid-Y (NPY), SubP és kolin-acetiltransferáz (ChAT). Egérben a myentericus plexus definitív idegsejtjei már a 11-13. embryonális naptól kimutathatók, míg a neurotranszmittereket produkáló submucosalis neuronok a születés után alakulnak ki (Erickson et al., 2014; Kang et al., 2021).

A gliasejtekben megmarad a SOX10 és a P75 pozitivitás, lecsökken a RET expresszió, és sorra megjelennek a glia specifikus markerek, mint az agyi zsírsavkötő fehérje (brain fatty acid-binding protein; BFABP), az intesztinális kalciumkötő protein-kalcium kötő doménje (ICaBP type calcium binding domain; S100), végül a gliális fibrilláris savas fehérje (glial fibrillary acidic protein; GFAP) (Goldstein et al., 2013; Nagy és Goldstein, 2017). Érdekes módon az enterális gliasejteknek van egy olyan

tulajdonsága, hogy megtartják a neurogén potenciáljukat, így sérülés esetén visszatérhetnek progeritorszerű állapotba, majd ebből neuronokká képesek differenciálódni (Laddach et al., 2023).

A vándorlás mintázata a bélrendszerben a sejteket körülvevő környezeti komponensektől függ, mint az extracelluláris mátrix összetétele, az epithelium és a mesenchyma által termelt faktorok, a simaizomzat morfológiája és a vérerek elrendeződése (Young et al., 2005; Nagy et al., 2012;).

A fibronectin, a tenascin (Akbareian et al., 2013), a laminin (Nagy et al., 2009), a kollagén I (Nagy és Goldstein, 2006a), a kollagén XVIII (Nagy et al., 2018) pozitív hatást gyakorol a sejtadhézióra és migrációra, míg az agrin (Nagy et al., 2018), a kollagén VI (Nishida et al., 2018; Soret et al., 2015), a kollagén IX és a versican (Perris et al., 1996) erősen gátolja a sejtek előrehaladását.

A bélmesenchyma által termelt növekedési faktorok is szabályozzák a bélrendszeren áthaladó ganglionléc sejtek vándorlását, túlélését, differenciálódását és proliferációját. A glia eredetű növekedési faktor (glia cell line-derived neurotrophic factor; GDNF), a RET tirozin kináz és a GDNF receptor család alfa-1 (GDNF family receptor alpha-1; GFR α -1) receptor komplexhez kötődik a ganglionléc sejtek membránján és serkenti azok migrációját, valamint befolyásolja a neuronokká történő differenciálódást és a proliferációt (Hearn et al., 1998; Young et al., 2001; Gianino et al., 2003; Nagy & Goldstein, 2006b). A csont növekedési fehérjék (bone morphogenetic protein; BMP 2, 4, 7) a tumor növekedési faktor β (tumour growth factor β , TGF β) családba tartoznak, a BMP receptorokhoz (BMPRIA/B, BMPRII) kötődnek. Korábbi kísérletes munkák bizonyították, hogy hatásuk van a sejt migrációra, a neuron glia irányú differenciálódásra és a gangliogenezisre (Goldstein et al., 2005; Fu et al., 2006; Chalazonitis et al., 2008, 2011). Laboratóriumunk a közelmúltban embryonális szövettenyészetekkel és retrovírus injektálással igazolta, hogy a BMP4 hatása a ganglionléc sejtekre nagymértékben függ annak tér és időbeli expressziójától és a GDNF faktorra való együttes megjelenésétől, amely elengedhetetlen a colorectum megfelelő kolonizációjához (Kovács et al., 2023).

A bélhám által termelt faktorok is jelentős szerepet vállalnak a normál bélidegrendszer kialakulásában. A Sonic hedgehog (SHH) a ganglionléc sejtek mikrokozonyzetének összetételét befolyásolja és az intramurális plexusok pozícionálását

végzi (Nagy et al., 2016a). A netrin molekulák fontosak a bélidegrendszer fejlődésében csirke és egér embryokban. Az középbél epitheliuma által termelt netrin irányítja a vastagbélrákban deletált netrin receptort (deleted in colorectal cancer, DCC) kifejező ganglionléc sejtek nyálkahártya felé történő migrációját (Jiang et al., 2003). A gyomor és a vékonybél myentericus plexusaiban a korai neuronok fejezik ki a DCC receptort, így az extrinsic szenzoros axonok innerválni tudják az említett stuktúrákat. A n. vagus gyomrot irányzó neuronális projekciójának kialakulásánál is kimutatták a netrin szerepét (Seaman et al., 2001; Ratcliffe, 2011; Kang et al., 2021).

Az enterális ganglionok koncentrikus elrendeződése a körkörös simaizom réteg két oldalán megy végbe. Az enterális ganglionléc sejtek, amikor áthaladnak az előbél és a középbél mesenchymáján, egyenletesen, de véletlenszerűen, primitív ganglionokba szerveződve, a külső intesztinális mesenchymalis rétegekben rendeződnek el, mert ebben az időszakban a simaizomzat még differenciálatlan állapotban van (Allan & Newgreen, 1980; Conner et al., 2003). Az izomréteg strukturálsági szintjének emelkedésével a kialakuló cirkuláris izomzat külső oldalára kerülnek a ganglionléc sejtek. Ezzel ellentétben csirke embryóban az utóbél mesenchymájának simaizom differenciálódása már a bélidegrendszert kialakító sejtek megérkezése előtt megtörténik, és az enterális ganglionléc sejtek először a submucosalis réteget kolonizálják, majd a külső rétegekbe vándorolva létrehozzák a myentericus plexust. A lumbo-sacralis régióból származó sejtek ezzel szemben először a myentericus, majd a submucosalis régiót népesítik be (Burns és Le Douarin, 1998; Burns és Le Douarin, 2001; Graham et al., 2017). Egér embryóban a submucosalis plexus csak posztnatálisan fejlődik ki (McKeown et al., 2001).

A simaizomzat mellett a bélrendszerben fejlődő vérerek elrendeződése is kulcsfontosságú a ganglionléc sejtek mintázatának kialakításában. Csirke embryok érrendszerének vizsgálata során fény derült arra, hogy az endothél sejtek már az enterális ganglionléc sejtek megérkezése előtt jelen vannak a gasztrointesztinális rendszerben olyan koncentrikus gyűrűkben, amelyek előre kirajzolják a kialakuló neurális plexusok helyét (Nagy et al., 2009).

1.1.3.3. Az utóbél külső beidegzésének fejlődése: a Remak-ganglion és a plexus pelvicus kialakulása

Burns és Le Douarin csirke-fürj kiméra kísérletsorozataiban fürj embryóból származó lumbo-sacralis velőcsőszakaszt transzplantáltak azonos korú csirke embryóba,

és fűrj sejt specifikus perinukleáris (quail cell specific perinuclear, QCPN) ellenanyaggal követték nyomon az átültetett sejtek sorsát (Burns & Le Douarin, 2001). Kimutatták, hogy a 4. embryonális napon (HH22) a 33-39. szomita magasságba eső lumbo-sacralis ganglionléc sejtek a velőcsőből való kilépésük után egyrészt kialakítják a dorsalis érző ganglionokat, másrészt ventralisan vándorolnak és az aorta dorsalis közvetlen közelében felhalmozódnak a mesorectumban, létrehozva a Remak-ganglion kezdeményét (His, 1868; Yntema & Hammond, 1955; Teillet, 1978; Catala et al., 1995; Burns & Le Douarin, 2001). A továbbiakban ezek a lumbo-sacralis ganglionléc sejtek intenzíven osztódnak, majd rostralisán haladnak végig a fejlődő utóbél, a coecum és a középbél mesentériumában és a 6. embryonális napra érik el a Remak-ganglion legcraniálisabb pontját, amely az epehólyag és a hasnyálmirigy kivezetőcsöveinek benyílásának (csirkében a duodeno-jejunalis junctio) szintjében helyezkedik el. A Remak-ganglion az utóbél magasságában jelentős vastagságbeli növekedésnek indul és a bél dorsalis oldalán helyezkedik el, míg rostralisán az idegláncolat ileumhoz és a jejunumhoz tartozó része vékonyabb morfológiát mutat. Az enterális ganglionléc sejtek általi kolonizációt követően, a Remak-ganglionból számos nyúlvány hatol be a bélfalba (Teillet, 1978; Suzuki et al., 1996). A Remak-ganglion idegsejtjeinek nyúlványai késleltetve, csak a 7,5. napon (HH31) érik el a bélfalat (Burns & Le Douarin, 1998). A colorectális mesenchymában expresszálódó collapsin-1 (egerekben semaphorin-D, emberben semaphorin III) glikoprotein molekulák „axontaszító”, kemorepellens tulajdonságának köszönhetően 3 napig távol tartják a Remak-ganglion eredetű rostokat a bélfaltól. A 8. embryonális naptól a collapsin-1 expresszió visszahúzódik először az utóbél külső simaizom, majd submucosalis szövetéből, így a Remak-rostok fokozatosan belépnek a bélfalba (Shepherd & Raper, 1999). A lumbo-sacralis ganglionléc eredetű sejtek a Remak-ganglion rostjai mentén jutnak a distalis utóbélbe a 10. embryonális napon (Burns & Le Douarin, 1998). A Remak-ganglion caudalis része idegi összeköttetésben áll a plexus pelvicus hálózatával (Browne, 1953; Yntema & Hammond, 1955) (4. ábra, A; 5. ábra).

A plexus pelvicut szintén a lumbo-sacralis ganglionléc sejtek hozzák létre, ami csirkében a 28. szomitától caudálisán, egerekben a 24-es szomita szintben, emberi szervezetben L1-2 csigolyák magasságában található (Le Douarin & Teillet, 1973; Serbedzija et al., 1991; Kapur, 2000; Anderson et al., 2006; Wang et al., 2011a). Madár embryóban az embryonális fejlődés 3. napján a ganglionléc sejtek elhagyják a velőcsövet,

áthatolnak a farokbimbó mesenchymáján, 48 órával később benépesítik a cloaca területét és megformálják a plexus pelvicult (Catala et al., 1995; Nagy et al., 2007; Pomeranz et al., 1991; Serbedzija et al., 1991). Egerekben a lumbo-sacralis ganglionléc sejtek 9-9,5. embryonális napon kivándorolnak a velőcsőből és a 10,5-11. napon paraaortikus régióban aggregálódnak, majd a 11,5-12,5. embryonális nap között az utóbél ventro-laterális oldalán pelvicult ganglionokká állnak össze (Erickson et al., 2012; Kapur, 2000; Serbedzija et al., 1991; Teillet, 1978; Wang et al., 2011a; Yu et al., 2024), amikor már kimutathatók extrinsic rostok az egerek utóbelében (Young et al., 1998).

1.1.3.4. A plexus pelvicult (plexus hypogastricus inferior) fejlődése a humán embrióban

Kruepunga és munkatársai 3D rekonstrukciós modellekkel térképezték fel a bélrendszer extrinsic beidegzésének kialakulását és a plexus pelvicult, másnéven a plexus hypogastricus inferior képződését humán embriókban és magzatokban (Kruepunga et al., 2020a, 2020b). Eredményeik szerint a praenatalis fejlődés 5. és 6. hetén a lumbo-sacralis ganglionléc sejtek a paraaorticus, majd a praeorticus régióba vándorolnak, ahol kialakítják a truncus sympathicust és a praevertebralis ganglionokat. Innen az extrinsic idegek az intesztinális artériák mentén növekednek, hogy elérjék az intinsic bélidegrendszer elemeit a 7. és a 9. hét között. A plexus hypogastricus inferior kialakító ganglionléc sejtek csoportjait először az S1 csigolya szintjében fedezték fel 6 hetes embriókban. A sejtcsoport a következő napokban egyre kiterjedtebbé válik és a legcraniálisabb populáció a szimpatikus törzs ganglionjaivá aggregálódik. A formálódó plexusok végül egy háromszög alakú területet foglalnak el, amelynek alapja dorsalisán az S1-S5 között, csúcsa ventralisan a Wolff-cső nephricus részénél található, a peritoneális kismedencei tasak két oldalán (Tobin & Benjamin, 1945; Kruepunga et al., 2020b). A sejtek ventralisan továbbhaladnak és kialakítják a bal és a jobb oldali saggitalis orientációjú plexus hypogastricus inferior ganglionjait. A 8. hét végén a plexus hypogastricus inferiornak 3 idegrost csoportja különíthető el: nn. splanchnici lumbales (T12-L2) és a nn. splanchnici sacrales (L3 tól caudalisán), illetve a paraszimpatikus nn. splanchnici pelvini az S2-4 gerinevelői idegekből származnak. A plexus hypogastricus inferior craniálisán növekszik kialakítja a fejlődő húgyhólyag körül a plexus vesicalist, és distalisán az utóbél körül a plexus rectalist, míg a Wolff-cső és a Müller-cső sinus urogenitalisba nyíló vége köré hatoló, apróbb rostok a plexus uterovaginalist vagy a

plexus prostaticus. A plexus növekedésével kapcsolatok alakulnak ki a jobb és bal oldali plexus hypogastricus inferior között a distalis utóbél szakasz dorsalis oldalán. A plexus hypogastricus inferior extrinsic enterális idegrostjai a mesenterium mentén bejutnak a distalis colorectumba és kapcsolatot létesítenek az intrinsic enterális idegi elemekkel (Erickson et al., 2012), valamint az urogenitalis mesenchymában lévő ganglionokkal (Kruepunga et al., 2020b).

1.1.4. Az utóbél idegrendszerének rendellenes fejlődése: a Hirschsprung-kór

A bélidegrendszert kialakító ganglionléc sejtek migrációjának, proliferációjának, túlélésének vagy differenciálódásának zavara veleszületett enterális neuropátiákat okoz. A bélmotilitási-problémákat okozó gyomor-bél traktus idegrendszeri hibái, ezenkívül különböző etiológiákból származhatnak, mint az enterális neuronok veleszületett hiánya, a neurodegenerációt okozó fertőzések és gyulladásos folyamatok. A colorectum bélidegrendszerét és a külső beidegzésének érintettségét a Hirschsprung-kórban (HSCR) írták le a legrészletesebben (Goldstein et al., 2016; Rao & Gershon, 2018; Kang et al., 2021).

A fejlődési rendellenességet Harald Hirschsprung (1830-1916) dán gyermekorvosról nevezték el. Két fiúgyermekről készített feljegyzéseket, akik veleszületett megacolon miatt kialakuló bélelzáródás miatt haltak meg. A gyermekeknél hiányoztak a spontán székletürítések, bélfeszülés, hasmenés rohamai váltogatták egymást. A kórbonctani vizsgálat során feljegyezte többek között a végbél beszűkülését és a kitágult, hypertrophicus proximalis vastagbelet, vagyis a megacolon jelenségét, amely esetekről a Német Gyermekorvosi Társaság 1886-os konferenciáján számolt be (Hirschsprung, 1888; Sergi, 2015). Érdekes, hogy a veleszületett megacolon első megfigyelése mégis egy holland anatómus, Fredericus Ruysch nevéhez fűződik, aki 1691-ben Observatorium Anatomici-chirurgiarum Centuria-ban írta le egy 5 éves kislány kórtörténetét, aki folyamatos hasi görcsöktől és felfúvódástól szenvedett, a féreghajtás és a fájdalomcsillapító kezelés hatástalan volt. A test boncolása a rectum kezdetének hatalmas mértékű tágulatát derítette ki (Leenders & Sieber, 1970).

A betegség előfordulási gyakorisága világviszonylatban 10000 születésből 1-2,6, ami globális eltéréseket mutat. A nemi eloszlást tekintve a férfiakat négyszer gyakrabban érinti, mint a nőket (Montalva et al., 2023). Legjellemzőbb tünetei közé sorolható a

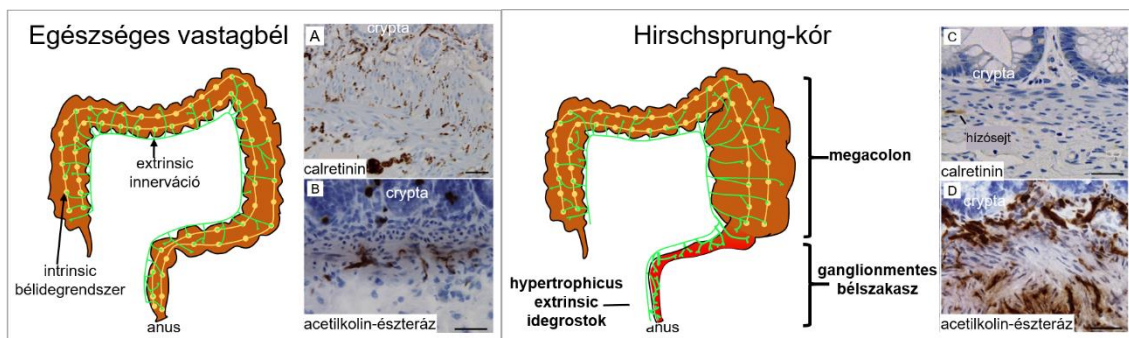
meconium (magzatszurok) késleltetett megjelenése (az élet első 24-48 óráján túl), a részleges vagy teljes bélelzáródás következtében kialakuló táplálkozási nehézségek, hasi puffadás, fokozatosan fellépő hányás, a rendszeres székletürítés elmaradása, székrekedés. A betegség leggyakoribb (70-80%-ban előforduló) formája a colon rövid szegmensén alakul ki, a sigmoideumtól a colon descendensig. Ritkábban (15%) az aganglionózis hosszabb szakaszon érintett, a colon sigmoideumtól egészen a coecumig, azonban a páciensek 8-10%-ában kiterjedhet a teljes vastagbélre, amely esetlegesen az ileum végső szakaszáig is elérhet. Az esetek kevesebb, mint 1%-ánál rögzítették a teljes bélszakasz ganglionmentességét (Goldstein et al., 2016; Kapur, 2009).

A HSCR kialakulásában számos olyan jelátviteli út zavara vesz részt, amelyek szabályozzák a ganglionléc sejtek migrációját. Jelenleg több, mint 25 gént azonosítottak, amelyek befolyásolják a HSCR kialakulását és fenotípusos variabilitását. A bélidegrendszer fejlődésére jelentős hatást gyakorló gének és útvonalak közé tartoznak a gliasejtekből származó gének (*RET*, *GDNF*, neurturin (*NTN*), *SOX10* és *PHOX2B*), az endothelin útvonal gének (*EDN3*, *EDNRB*, *SOX10*) és a TGF β jelátviteli útvonal gének cink ujj homeobox 1b (zinc finger E-box binding homeobox 2, *ZFHX1B*). A *RET* és az *EDNRB* a két leggyakoribb gén, amely a betegség fejlődésével összefüggésbe hozható. A fejlődés során a ganglionléc sejtek által kifejezett *RET* és a bélmesenchyma által termelt *GDNF* (a *RET* ligandja) közötti jelátviteli szerepét a sejtek vándorlásában, túlélésében és differenciálódásában bizonyították. Az *EDNRB* és liganduma, az endothelin 3 (*EDN3*) szignalizációja fontos az őssejtek differenciálatlan, proliferatív állapotban tartásához. Az útvonalak zavarai korai differenciálódáshoz és a normál migráció megzavarásához vezetnek (Serra et al., 2009; Niesler et al., 2021). A korábban említett *SOX10* transzkripciós faktor a korai, progenitor állapotban lévő ganglionléc sejtekben fejeződik ki. A *Sox10* homozigóta mutáns egerekben a teljes intesztinális rendszer ganglionmentes, míg a heterozigóta állatok distalis bélszakasa aganglionotikus (Bondurand et al., 2006; Serra et al., 2009).

A rendellenesség az esetek 70-80%-ában külön fordul elő, de más genetikai szindrómákkal kapcsolatosan is kialakulhat. A Down-szindrómás HSCR az esetek kb. 10%-ban van jelen. A Shah-Waardenburg szindróma egy olyan neurocristopathia, amelyet a haj, a bőr és a szem kóros pigmentációja, a bél aganglionosisa és veleszületett hallásvesztés jellemez a ganglionléc sejtek hiánya miatt, amit a *SOX10*, *EDNRB* és az

EDN3 mutációk okoznak (Heanue & Pachnis, 2007). A Haadad-szindrómánál a spontán légzés autonóm központja károsodik, és egy, a bélidegrendszer és az autonóm idegrendszer fejlődéséért felelős transzkripciós faktor (*PHOX2B*) mutációja okozza (Cacheux et al., 2001). A Mowat-Wilson szindrómára mentális retardáció, epilepszia, késleltetett motoros fejlődés jellemző, és a SMAD-interaktáló protein 1 (*Sip1*) mutációjával hozzák összefüggésbe (Cacheux et al., 2001). A Hirschsprung-kóros esetek kb. 50%-a specifikus genetikai mutációkhoz köthető, kb. 20%-a familiáris, melynek egy része autoszomális domináns módon öröklődik. Azoknál a családoknál, amelyek kórtörténetében előfordult a HSCR, 200-szor nagyobb kiújulási kockázatot hordoznak, mint az általános populáció, de a HSCR fajtái között is vannak eltérések. A HSCR egyrészt sporadikus, másrészt nem-Mendeli öröklődésű, multifaktoriális betegség, a különböző gének együttes működése okozza, amelyeket környezeti tényezők módosíthatnak, és ezáltal változó penetranciájúak és expresszivitásúak (Amiel et al., 2008; Goldstein et al., 2016).

A HSCR diagnózisának felállításakor standardként szolgál, a rectalis biopsziából vett szövettani vizsgálat által kimutatott submucosális és a myentericus neuroenterális sejtek csökkent száma vagy hiánya (Goldstein et al., 2016) (5. ábra). A ganglionmentesség mellett, nagyszámú acetilkolin-észteráz-pozitív, nem mielinizált idegrost van jelen az érintett szakaszokon. A rostok jelentősen hypertrophizáltak, átmérőjük 40 µm-nél nagyobb (Monforte-Munoz et al., 1998; Holland et al., 2010). A HSCR mintákban ugyanakkor hiányoznak a submucosát, a myentericus ganglionokat, és a körkörös simaizomzatot beidegző calretinint és NADPH-diaphorase-t expresszáló adrenerg neurális elemek, ami az intrinsic ganglionsejtek hiányára vezethető vissza (Bagyánszki et al., 2000; Barshack et al., 2004; Kapur, 2009; Hwang & Kapur, 2020) (5. ábra).



5. ábra. Az egészséges- és a Hirschsprung-kóros vastagbél fenotípusának összehasonlítása.

A sematikus rajzok szemléltetik a legfontosabb anatómiai különbségeket az egészséges és a kóros állapot között, a HSCR-ben hiányoznak az idegi elemek. **A, B)** A normál colon és **C, D)** a Hirschsprung-kórosban szenvedő páciensek ganglionmentes bélszakaszából készült szövettani festések a calretinint tartalmazó intrinsic bélidegrendszeri elemeket és a túlnyomóan extrinsic idegrostokban expresszálandó acetilkolin-észteráz jelölést mutatják. *Az ábrák forrása: sematikus rajzok: saját készítés; a hisztológiai felvételek: Hwang & Kapur, 2020, módosítva.*

A HSCR széleskörűen elfogadott kezelése a ganglionmentes szegmens reszekciója és a vastagbél egészséges végének anasztomózisa a végbéllel vagy a végbélnyílással áthúzásos eljárásokkal. A standard terápiás eljárások közé tartoznak a laparoszkópos segítséggel, transzanalisan is elvégezhető Duhamel, Swenson és Soave eljárások (Montalva et al., 2023). A sebészi beavatkozások életmentőek a HSCR-ben szenvedő pácienseknél, és sikeresnek mondhatóak (a halálozási arány <5%), azonban súlyos következményekkel járhatnak, mert továbbra is előfordulhat krónikus székrekedés, széklet inkontinencia és a betegséggel járó pszichoszociális hatás sem elhanyagolható. A HSCR-ben szenvedő gyermekeknél a székletszennyeződés miatt fennáll a potenciálisan életveszélyes gyulladós folyamat, az úgynevezett Hirschsprung-asszociált enterocolitis (HAEC) kockázata is, amely a ganglionmentes szegmens műtéti eltávolítása előtt vagy után alakulhat ki (Gosain & Brinkman, 2015). A betegség kezeléséből eredő káros mellékhatások és az egyes betegek esetében előforduló halálos változat mindegyike, a gyógy módok kifejlesztését igényli. A bélidegrendszert létrehozó őssejtek izolálása, felszaporítása és a sérült területre történő transzplantációja egy új, hatékony megoldást jelenthet a betegség kezelésében. Ehhez feltétlenül ismernünk kell a bélidegrendszert létrehozó őssejtek migrációs hatékonyságát és a fogadó szövet tulajdonságait, amelyeknek az esetleges módosításával effektív őssejt transzplantációs hatékonyságot érhetünk el (Kapur, 2009; Goldstein et al., 2016).

1.2. A csirke embryo jelentősége a fejlődésbiológiai kutatásokban

A bélidegrendszeret érintő veleszületett neurocristopathiak patomechanizmusának megértéséhez olyan állatmodellekre van szükség, ahol tanulmányozható a ganglionléc sejtek vándorlásának, differenciálódásának és proliferációjának szabályozása. A csirke embryo kiemelkedik a sorból, ugyanis az emberhez hasonlóan mindkét plexus kialakul a születés előtt a bélrendszerben. A magasfokú bélidegrendszeri analógiák mellett, a madár embryo mint kísérletes állatmodell számos további előnnyel rendelkezik. Az embryok könnyű hozzáférhetősége, a költséghatékony fenntarthatósága, a rövid fejlődési ideje, az invazív beavatkozásokkal szembeni ellenállóképessége, illetve a hibridóma technikák által létrehozott egyre nagyobb számú monoklonális ellenanyagkészlet (Milstein, 1999; Nagy et al., 2001; Bódi et al., 2009; Fejszák et al., 2022) vonzó modellállattá tette az embryológiai kutatásoknak. Ezenfelül a csirke genom szekvenálása megnyitotta a lehetőséget a molekuláris genetikai kutatások előtt is (Heanue et al., 2016). Ezeket a tulajdonságokat szem előtt tartva nem meglepő, hogy a fejlődésbiológia számos aspektusát, mint például a ganglionléc sejtek vándorlását, és a belőlük kialakuló sejtek sorsát, a primordiális csírasejtek nyomonkövetését, a végtag bimbó fejlődését, a velőcső mintázatát, a szomiták szegmentációját, vagy a bal-jobb oldali asszimetriát madárembryok segítségével sikerült meghatározni (Levin, 1998; Pourquié, 2004; Stern, 2004; Tickle, 2004). A csirke embryo manipulálhatósága lehetővé tette, hogy a velőcső ablatios kísérletekkel és szövettranszplantációs technikákkal létrehozott csirke-fürj kimérékekkel meghatározzák a bélidegrendszer létrehozó ganglionléc sejtek axiális szintjét, a vándorlás irányának, idejének és távolságának kiegészítésével (Yntema & Hammond, 1954; Le Douarin & Teillet, 1973; Burns & Le Douarin, 1998; Burns et al., 2000).

Az *in ovo* elektroporációs technika (Uchikawa et al., 2004) megjelenésével lehetőség nyílt mutációk létrehozására csirke szomatikus sejtekben. Funkció-vesztéses génmanipulációk érhetőek el például fluoreszcenciával konjugált morfolino antiszensz oligonukleotid (Kos et al., 2003) vagy az RNS-interferencia mechanizmusát kihasználva rövid hajtű RNS-ek (Das et al., 2006; Odani et al., 2008) elektroporációjával. A transzpozon vektorba (például piggyBac a csirkében) integrált gének transzpozáz jelenlétében beépülnek a genomba, így a transzgén hosszú távú expresszióját lehet elérni (Li et al., 2012; Sato et al., 2007; Blixt et al., 2022). A növekedési faktorok és

transzkripció szabályozó elemek nagyobb szövetrészletre, vagy egész szervre kifejtett hatását elektroporációval vagy injektálással bejuttatott retrovírussal lehet vizsgálni. A replikáció-kompetens madaraktól izolált Rous-asszociált (RCAS) retrovírusokba klónozott génekkel egy adott faktor túlexpresszálatása érhető el (Goldstein et al., 2005; Mwizerwa et al., 2011; Nagy et al., 2016a; Kovács et al., 2023). Az eddig leírt technikákkal ugyan szabályozható a génmódosítás helye és ideje, de a sejtek proliferációja miatt a transzfektált konstrukciók a szövetekből történő kihígulásával, illetve a sejt szintű célzás pontos hiányával és a toxicitás veszélyével mindenképpen számolni kell (Eisen & Smith, 2008; Nakamura & Funahashi, 2013). A problémák megoldására a CRISPR/Cas9 egy forradalmi technológia, amely lehetővé teszi a célgének hatékony módosítását (Cong et al., 2013; Gandhi et al., 2017).

A blastoderma alatti subgerminalis üregbe mikroinjektált lentivírussal létrehozott zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) konstitutívan expresszáló embryók alkalmazása (McGrew et al., 2004, 2008) új kimérák megalkotásának lehetőségét kínálja, hiszen kijavította a csirke-fürj rendszerek eltérő fejlődéséből eredő problémáit, így számos fejlődésbiológiai kérdés megválaszolását segítette (Delalande et al., 2015; Dóra et al., 2017; Nagy et al., 2012).

A tojásban könnyen hozzáférhető csirke embryo alkalmas különböző (akár fajok közötti) embryonális szövetek, vagy komplett szervek tenyésztésére. A graft¹ intraembryonális coelomába ültetésével vagy chorioallantois membrán (CAM) transzplantációjával számos bélidegrendszer érintő kérdés tisztázódott (Catala et al., 1995; Dóra et al., 2017; Nagy et al., 2018; Nagy & Goldstein, 2006b). A CAM az emlős méhlepény homológjaként működik, gazdag kapilláris hálózatával a gázcsere-t biztosítja. Immundeficiens tulajdonsága miatt a transzplantáció nem vált ki akut immunválaszt, ezért alkalmazzák az orvosbiológiai kutatásokban is az angiogenesis, a tumornövekedés vagy a metasztázis vizsgálatára (Cimpean et al., 2008; Nowak-Sliwinska et al., 2014). A kiméra módszerek transzgenikus technológiákkal való kombinációja nemcsak a bélidegrendszeri kutatásokban hozott fontos eredményeket, hanem egyes alapvető immunrendszeri fejlődéssel kapcsolatos kérdések tisztázását is lehetővé tette, példaként említve az extraembryonális vérképző sejteket (pl. myeloid makrofágok, bursalis-secretios

¹ A csirke embryo chorioallantois membránján vagy testüregében tenyésztett izolált szövetet, szervet vagy szervrészletet nevezzük graftnak, amelyet egy meghatározott tenyésztési időt követően mikrosebészeti módszerekkel eltávolítunk a membránról és szövettani feldolgozásnak vetjük alá.

denditikus sejtek), vagy a lép ellipszoid sejtek eredetének azonosítását (Dóra et al., 2017; Garceau et al., 2015; Nagy et al., 2004). Csirke embryo immunrendszerével kapcsolatos kutatások kulcsfontosságúak az immunitás alapmechanizmusainak megértésében, a gazdaságilag jelentős baromfik egészségi állapotának javításában, a betegségek terjedésének megelőzésében, a vakcinafejlesztésben és az evolúciós vonatkozások betekintésében. A madarakra jellemző bélhez asszociált primer nyirokszerv, a bursa Fabricii felfedezése hamar az immunrendszer fejlődését célzó kutatások középpontjába került, ugyanis állományában a B-lymphocyták érése izoláltan tanulmányozható a többi lymphoid, myeloid és erythroid sejtvonaltól (Glick, 1994). Az 1960-as években a bursa Fabricii eltávolításán alapuló kísérletek vezettek az immunitás disszociás elméletének megszületéséhez, miszerint létezik egy bursa-függő, anititest-termelő humorális, és egy thymus-függő, sejtközvetített celluláris immunválasz (Warner et al., 1962) továbbá leírták a bursa-csontvelő homológiáját is (Cooper et al., 1965; Cooper et al., 1966).

1.3. A kemokinek szerepe a sejt vándorlásban

A sejt migrációt a legtöbb esetben a sejteket körülvevő folyadék térben jelenlévő kemoattraktánsok váltják ki. A kemoattraktáns jelenléte eredményezhet véletlenszerű elmozdulást (kemokinézist) vagy koncentrációs grádiensnek megfelelő irányított sejtmozgást (kemotaxist). A kemotaxist előidéző kemoattraktánsok változatos csoportjába kemokinek, növekedési faktorok, formilezett peptidek, a komplement rendszer elemei, valamint a foszfolipid metabolitok tartoznak (Majumdar et al., 2014). A fejlődésbiológiai tudományterület egyik legszéleskörűbben kutatott molekulái, a kemokinek, amelyek a növekedési faktorok mellett kulcsszerepet töltenek be az embryogenezis során (Mcgrath et al., 1999). Irányítják számos szervkezdemény sejtek általi kolonizációs folyamatát, például az ősvarsejtek gonádelepekben történő megtelepedését, a ganglionléc sejtek szív felé történő vándorlását, a csontvelői őssejtek homingját, szabályozzák az érrendszer mintázatát és átalakulását, illetve befolyásolják a postnatális időszakban a szövetregenerációt és a rákos sejtek metasztázisát (Raz, 2003; Orimo et al., 2005; Petit et al., 2007; Siekmann et al., 2009; Bussmann et al., 2011; Cha et al., 2012; Lewellis & Knaut, 2012; Cojoc et al., 2013; Szabó et al., 2018; Bianchi & Mezzapelle, 2020).

Emberben több, mint 50 különböző kemokint azonosítottak, amelyek a CL (C motif chemokine ligand), CCL (C-C motif chemokine ligand), CXCL (C-X-C motif chemokine ligand) vagy CX3CL (C-X-3-C motif chemokine ligand) alcsoportokba sorolhatók, attól függően, hogy az erősen konzervált cisztein aminosavak szekvenciálisan hol helyezkednek el (Zlotnik & Yoshie, 2000). A különböző kemokinek megkötésére alkalmas receptorok nevezéktana abból adódik, melyik alcsoportba tartozó ligandhoz képesek kapcsolódni (CCR, C-C motif chemokine receptor, vagy CXCR, C_X_C motif chemokine receptor) (Hughes & Nibbs, 2018). A mintegy 20féle receptor többsége G-fehérjéhez asszociált, ezek 25–80%-os szekvencia azonossággal rendelkeznek, ezért egy adott kemokin-alcsoporton belül több ligand megkötésére is alkalmasak (Allen et al., 2007). A CXCR4 és CXCR7 receptorok például megkötik a CXCL12 kemokint (Balabanian et al., 2005; Oberlin et al., 1996), a CCR7 receptor pedig a CCL19 és CCL21 ligandhoz is képes kapcsolódni (Yoshida et al., 1997). A ritkábban előforduló, atípusos kemokin receptorok szerkezeti rokonságot mutatnak a hagyományos G-fehérje kapcsolt kemokin receptorokkal, azonban a ligand kötés nem indítja be a klasszikus jelátvitelt (Hughes & Nibbs, 2018). A G-fehérjétől független működés lényege, hogy vagy „kemokin-csapdázó” receptorként működnek, vagy a β -arrestin jelátvitelt használják a receptor internalizálásához (Nibbs & Graham, 2013).

1.3.1. A CXCR4 és a CXCL12 molekulák bemutatása és a jelátviteli szabályozása

A C-X-C kemokin receptor 4 (CXCR4, másnéven fuzin, LESTR, CD184) receptor fontosságát először a HIV fertőzés kapcsán írták le, mert a vírus koreceptoraként van jelen a CD4 immunpozitív (CD4+) T-sejteken (Feng Y et al., 1996; Oberlin et al., 1996).

A CXCR4 diszfunkciójához köthető betegség az autoszomális-domináns módon öröklődő WHIM-szindróma (warts, hypogammaglobulinemia, immunodeficiency, myelokathexis), egy ritka immunihiánnyal járó kóros állapot, amelyet szemölcsök, visszatérő bakteriális fertőzések, hipogammaglobulinémia, limfopénia, myelokathexis és súlyos csontvelői neutropénia jellemez. A betegség kezelésében egy szintetikus molekula, az AMD3100 és a granulocita-kolónia-stimuláló-faktor (G-CSF) kombinációja pozitív eredményt hozott (Heusinkveld et al., 2019). Az AMD3100 másnéven plerixafor egy kis molekulájú biciklám származék, a CXCR4 antagonistája, amit HIV vírus bejutásának gátlására, illetve non-Hodgkin lymphomában, multiplex myelomában és

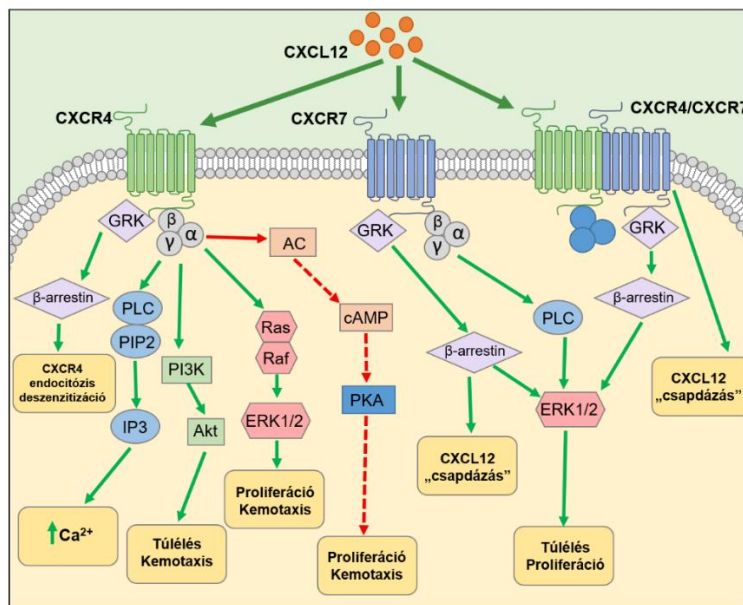
csontvelő transzplantáció során is alkalmaznak (De Clercq, 2003; Dar et al., 2011; Caocci et al., 2017). A molekula specifikusan képes a CXCR4-hez kapcsolódni, így az allosztérikus gátlással a ligand (CXCL12) nem fér hozzá a receptor kötőzsebéhez, ezáltal nem indul el az intracelluláris kalcium jelátvitel (Sachpatzidis et al., 2003; Rosenkilde et al., 2004). Az AMD3100 inhibitor számos fejlődésbiológiai tanulmányban használták a CXCR4-CXCL12 szignalizáció funkciójának bizonyítására (Chalasanani et al., 2003; Rezzoug et al., 2011; Caocci et al., 2017; Whitman et al., 2018).

A CXCR4 receptor ligandja, a C-X-C kemokin ligand 12 (CXCL12), másnéven stromális eredetű 1-es faktort, stromal cell-derived factor 1, SDF1) egy kisméretű (8 kDa) fehérje, amely mind embryonális, mind a felnőtt szövetekben (csontvelőben, hasnyámirigyben, májban, tüdőben, szívben, nyirokcsomóban, agyban) konstitutívan expresszálódik (De La Luz Sierra et al., 2004; Spinosa et al., 2017; Righetti et al., 2019).

A CXCL12 kötődik a CXCR4 receptorhoz, ezáltal aktiválódik a heterotrimer G-fehérje és/vagy a β -arrestin által közvetített jelátviteli kaszkád, mint a foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K)/Akt, az inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP3), a mitogén által aktivált protein kináz (MAPK) és a protein kináz-C (PKC) útvonalak, amelyek növekedés indukciójához konvergálnak vagy promótálják az intracelluláris kalcium mobilizációt a migráció elősegítésére. Egy másik lehetőség, hogy az aktivált G-fehérjék a β -arrestin felhalmozódásához járulnak hozzá, ami az Akt Ser/Thr kináz (más néven protein kináz B (PKB)), és az extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2 (ERK1/2) G-fehérje független aktiválásához vezethet (Cojoc et al., 2013) (6. ábra).

A CXCR4 mellett, a CXCL12 kötődik a nem kanonikus C-X-C kemokin receptor 7 (CXCR7, atypical chemokine receptor 3, RDC1) receptorhoz is, amely 31%-ban homológ a CXCR4-gyel. A kötődés két válaszreakciót eredményez: a megkötött ligand internalizációját, majd lebontását, illetve β -arrestin által közvetített G-fehérje független jelátvitelt. Ezenkívül a CXCR7 tízszer nagyobb affinitással köti a CXCL12-t, mint a CXCR4, és a receptor gyorsan visszakerül a plazmamembránba a ligandum által kiváltott internalizáció után (Burns et al., 2006). Embryológiai megfigyelések arra utalnak, hogy a CXCR7 és a CXCR4 közötti, ligand kötésükben kialakult verseny hatékony CXCL12 eliminációt eredményez a sejt közötti térből (Wang et al., 2011b). Továbbá a CXCR4 és a CXCR7 hasonló módon lép kölcsönhatásba a β -arrestinekkal, így a két receptornak a

relatív szintje fogja meghatározni, hogy a β -arrestin vagy a G-fehérje-függő downstream jelátvitel érvényesül (Huynh et al., 2020) (6. ábra).



6. ábra. A CXCR4-CXCR7-CXCL12 tengely molekuláris szabályozása. Az ábra forrása: Würth et al., 2014 nyomán.

Az extracelluláris mátrix (ECM) különböző komponensei képesek megkötni vagy felszínükön kihorgonyozni egyes kemokineket – ideértve a CXCL12-t is –, ezáltal befolyásolva az adott ligand lokalizációját, a gradiensének fenntartását a sejtek közötti térben, illetve modulálja a ligand által kiváltott jelátviteli folyamatokat (da Silva et al., 2021). A kötődésnek köszönhetően a CXCL12 védett a sejtlebontási folyamatokkal szemben és lassabban szabadul fel a szövetekből (Spinosa et al., 2017). A CXCL12 képes kapcsolódni a glükózamino-glikán (GAG) oldalláncokhoz, különösen a heparánszulfát-proteoglikánokhoz (HSPG), lehetővé téve a mioblasztok aktív migrációját, heparánszulfát hiányában a CXCR4⁺ sejtek irreverzibilisen kitapadnak a felszínhez, így mozdulatlanok maradnak *in vitro* (Thakar et al., 2017). Emlőrák metasztázist célzó vizsgálatokban kimutatták, hogy a tumoros sejteket körülölelő tenascin-C-ben gazdag sztróma direkt képes megkötni a CXCL12-t, ezáltal megakadályozza a CXCR4⁺ T-limfociták tumor belsejébe történő belépését, így az immunsejtek nem férnek hozzá a rákos sejtekhez (Murdamoothoo et al., 2021). A CXCR4⁺ thymocyta tenyésztésben a kemotaxist jelentősen befolyásolja, ha a receptor ligandját fibronectinnel vagy lamininnel együttesen adják a sejt kultúrához (Yanagawa Y et al., 2001), a CXCL12 közvetlen

kapcsolódása miatt ezen ECM molekulákhoz (Pelletier et al., 2000). Az integrinek – a sejtdhéziós receptorok családja – közvetítik a sejtek rögzülését az ECM-hoz. Kimutatták, hogy a CXCL12 fokozza a lymphocyták integrin függő adhézióját, így az endothelsejtekhez való horgonyzódását (Campbell et al., 1998). Bizonyítékok szolgálnak arra is, hogy a CXCL12 serkenti a kissejtes tüdőrák sejteinek adhézióját a β 1-integrin ligandumokhoz, a fibronektinhez és a kollagén IV-hez az integrin heparin-kötő doménján keresztül (Hartmann et al., 2005).

1.3.2. A CXCR4-CXCL12 molekulák szerepe az embryonális sejt vándorlási folyamatokban

A *Cxcr4* vagy a *Cxcl12* homozigóta mutáns egerek elpusztulnak a 17. embryonális nap előtt a B-lymphopoiesis, a myelopoiesis, a szívsvényképződés és az érrendszer kialakulásának zavara miatt, mindemellett súlyos idegrendszeri rendellenességek lépnek fel (Ma et al., 1998; Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998).

Egérben és emberben is kimutatták, hogy a CXCR4-CXCL12 kölcsönhatás fontos szerepet játszik a B-sejtek túlélésében, érésében és migrációjában (Ma et al., 1999; Beck et al., 2014). A csontvelői sinusoidokhoz asszociált retikuláris sztróma sejtek CXCL12 expressziója helyben tartja a CXCR4 receptort kifejező hematopoetikus őssejteket és a lymphocytákat (Bleul et al., 1996; Burger & Bürkle, 2007). Az E- és P-szelektinek, illetve az intercelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1) és a vaszkuláris sejtdhéziós molekula-1 (VCAM-1) segítségével a vérképző sejtek képesek az endothelhez kapcsolódni, gördülő mozgást végezni, majd áthatolni a bazális membránon. A csontvelői mikrokörnyezetben a sejtek fibronektinnel való kölcsönhatása segíti a migrációt (Caocci et al., 2017). A B-sejt progenitorok érésében és a csontvelői niche-ben való mozgásában jelentős szerepet játszik a CXCR4-CXCL12 szignalizáció. A B-sejtek érése során a CXCR4 expresszió egyre gyengébb lesz, és a sikeres immunglobulin könnyűlánc-rekombinációt követően az IgM-et expresszáló, naív B-sejtek internalizálják membránjukból a maradék CXCR4 receptorukat, ami szükséges ahhoz, hogy végül elhagyják a csontvelőt (Clark et al., 2014; Freitas et al., 2014).

A CXCR4-CXCL12 receptor-ligand páros hematopoiesisben betöltött szerepe mellett, jelentős befolyással bír a keringési rendszer fejlődésére. Csirke modellrendszerben a CXCL12 a garat és a szív mesenchymájában fejeződik ki, így vonzza a velőcső cervicalis szakaszáról származó, CXCR4-immunpozitivitást mutató

cardialis ganglionléc sejteket, és ezáltal hozzájárul a szív morfogeneziséhez (Escot et al., 2013). Továbbá a CXCR4 jelátvitel gátlása csökkenti a miogén és angiogen sejtek bevándorlását a fejlődő végtagbimbókba (Yusuf et al., 2006). A CXCR4, mint az angiogenesis egyik kulcsmolekulája a gasztrointesztinális traktus vaszkularizációjáért (Tachibana et al., 1998), a vese glomerulusok fejlődéséért (Takabatake et al., 2009), illetve a szív koszorúereinek (Ivins et al., 2015) kialakulásáért is felel.

További példák is bizonyítják a CXCR4-CXCL12 molekulapáros embryonális sejtmigrációban nyújtott sokrétű szerepét. A cloaca izomzatának fiziológiás fejlődését (Rehimi et al., 2010), valamint a primordiális csírarsejtek (Stebler et al., 2004) gonadokba történő migrációját szintén a CXCL12-függő kemotaxis határozza meg.

A CXCR4-CXCL12 molekulapáros a ganglionléc sejtek vándorlásában betöltött funkcióját az afrikai karmosbéka, zebradánió, csirke és egér embryonban is leírták (Belmadani et al., 2005; Rehimi et al., 2008; Olesnický Killian et al., 2009; yTheveneau et al., 2010). A CXCR4 receptort a cranialis- és a törzsi ganglionléc sejtek által képzett dorsalis érző ganglionok (Belmadani et al., 2005; Olesnický Killian et al., 2009; Theveneau et al., 2010), valamint a szimpatikus ganglionok is hordozzák (Kasemeier-Kulesa et al., 2010; Olesnický Killian et al., 2009).

A *CXCR4* és a *CXCL12* gének célzott deléciójával létrehozott egerek *in situ* expressziós vizsgálatai és *in vitro* elemzései alapján kiderült, hogy a szignalizáció több agyi régió fejlődésében is fontos szerepet játszik. Mind a hippocampusban, mind a kisagyban a neurális prekursor sejtek migrációja zavart szenved, a kisagy esetében a SHH és a CXCL12 közötti szinergikus hatás kiesése miatt a sejtek proliferációja is károsodik (Ma et al., 1998; Zou et al., 1998; Klein et al., 2001; Lu et al., 2002). Zebradánióban a ggl. trigeminale kialakulásában szintén a CXCR4-CXCR7 szabályozása szükséges egy olyan szöveti környezetben, ahol a neuronok a vándorlásuk során több CXCL12-t expresszáló szövettel találkoznak. A n. oculomotorius CXCR4-CXCL12 által irányított axonprojekcióját az AMD3100 inhibitor alkalmazásával és *CXCR4* vagy *CXCL12* génkiütéssel bizonyították (Whitman et al., 2018).

A CXCR4 jelátvitel fontos szerepet játszik a neurogenesisben azáltal, hogy támogatja a – korábban említett – idegi progenitor sejtek migrációját, proliferációját és differenciálódását, valamint további kísérletes adatok igazolják, hogy modulálja a neuronális projekciót, amit a szakirodalom szintén „sejtmigrációként” definiál. A

legismertebb axon irányító molekulák a netrinek, a slit glikoprotein (Slit) és a Roundabout receptor (Robo) molekulák, a semaforinok csoportja, valamint az ephrinek (Doitsidou et al., 2002; Belmadani et al., 2005; Lieberam et al., 2005; X. Cheng et al., 2017; Tanaka et al., 2010), amelyek hatásait nagymértékben befolyásolja a CXCR4-CXCL12 tengely (Chalasanani et al., 2003; Ödemis et al., 2005; Lieberam et al., 2005).

2. CÉLKITŰZÉSEK

A CXCR4-CXCL12 jelátvitel szerepét számos sejtándorlással járó fejlődésbiológiai folyamatban bizonyították, úgy, mint a ganglionléc sejtek, a primordiális őssejtek migrációja és az axon növekedés, valamint a hematopoetikus őssejtek, és a lymphocyták vándorlása. A bélidegrendszer létrehozó ganglionléc sejtek migrációjának zavara veleszületett neurointesztinális betegségek kialakulásához vezet, amit a colorectum változó hosszúságú aganglionózisa jellemez. A ganglionmentesség mellett nagyszámú CXCR4+ extrinsic rost is megfigyelhető, amelynek kialakulásáról kevés ismerettel rendelkezőnk. Az utóbél CXCL12 *in situ* hibridizációs vizsgálata során megfigyeltük, hogy az extrinsic beidegzést adó Remak-ganglion mellett az utóbélhez asszociált bursa Fabricii mesenchymájában is kifejeződik. A bursa Fabricii lehetőséget kínál arra, hogy a többi vérképző sejtvonaltól függetlenül egy izolált környezetben tanulmányozhassuk a B-sejtek migrációját és fejlődését.

Doktori értekezésemben célul tűztem ki:

A CXCR4-CXCL12 molekulapáros sokrétű feladatának vizsgálatát a fejlődő farokbimbó szöveteiben, azon belül az utóbél külső beidegzésének fejlődésében és az utóbélhez asszociált primer nyirokszerv kialakulása során.

1. A CXCR4 receptor expressziójának nyomonkövetése a bélidegrendszer létrehozó ganglionléc sejtek fejlődése során.
2. A colorectum külső beidegzésének kialakulásának tanulmányozása madár és emlős embryokban.
3. A CXCR4-CXCL12 expressziójának elemzése a bursa Fabricii fejlődésében részt vevő sejtándorlási folyamatokban.

3. MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez vad típusú csirke (*Gallus gallus domesticus*, White Leghorn típus), transzgenikus zöld fluoreszcens fehérjét (green fluorescent protein, GFP) expresszáló csirke és *Wnt1^{Cre/+} Rosa26^{flox-mTRed-Stop-flox-mGFP}* egér (*Mus musculus*) embryokat használtunk.

A megtermékenyített White Leghorn csirketojásokat kereskedelmi tenyésztőktől (Prophyl-BIOVO Ltd., Magyarország) szereztük be, a transzgenikus GFP-t expresszáló csirke tojásait a skóciai Roslin Intézetből Prof. Helen Sang és Dr. Adam Balic jóvoltából kaptuk (McGrew et al., 2004). A tojásokat laboratóriumunk keltetőgépében 37,5°C-on 60%-os páratartalom mellett keltettük. Abban az esetben, ha 3 napnál idősebb embryokat vizsgáltunk, a tojások függőleges helyzetben, a tompa végével felfelé állítva, míg korai (1-2 napos) embryoknál a tojások horizontálisan inkubálódtak, az embryok könnyebb hozzáférhetőségének céljából. A fejlődési stádiumok meghatározása az embryonális napok száma (E) vagy a Hamburger-Hamilton (HH) táblázat (Hamburger & Hamilton, 1992) alapján történt. A bél fejlődési stádiumainak megállapításánál a csirke embryo bélstádium-meghatározási táblázatára (Southwell, 2006) és a bélidegrendszer kialakulásának időpontjaira (Nagy et al., 2012) hivatkoztunk.

A *Rosa26^{flox-mTRed-Stop-flox-mGFP}* knock-in mutációt hordozó egereket (Muzumdar et al., 2007) Dr. Jakus Zoltántól (Semmelweis Egyetem, Élettani Tanszék), a *Wnt1^{Cre/+}* knock-in allélt hordozó egereket (Danielian et al., 1998) Dr. Liam Ridge-től (UCL GOS Institute of Child Health, Egyesült Királyság) kaptuk, és heterozigóta formában tartottuk őket intézetünk állatházában. Minden egér C57BL/6 genetikai háttérrel rendelkezett. A két törzs keresztezésének eredményeként *Wnt1^{Cre/+}Rosa^{26flox-mTRed-Stop-flox-mGFP}* (a továbbiakban *Wnt1;GFP*) genotípusú egerek születtek, amelyekben az összes ganglionlécből származó sejt zöld fluoreszcenscenciával jelzett volt. Az embryok izolálása során vemhes egerek terminálását növekvő szén-dioxid koncentrációval történő altatással, nyaki diszlokációval végeztük.

A puffertolt 4%-os paraformaldehidben (PFA) fixált abortált humán embryokon végzett szövettani munkát a Semmelweis Egyetem Regionális és Intézményi

Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága etikailag jóváhagyta (Kutatásetikai Bizottság jóváhagyása: 70/2012).

3.2. A minták szövettani feldolgozása

A csirke és egér embryo farokbimbóját, illetve teljes bélszakaszát mikropreparációra alkalmas eszközök (mikrocsipesz, mikroolló, perforált Moria típusú kanál, iridectómiás olló (Unicam)) segítségével sztereomikroszkóp alatt kimetszettük, majd 1x-es foszfát-pufferelt sóoldatba (1x-es PBS) gyűjtöttük. A szöveteket egy éjszakán át fixáltuk 4%-os PFA-ban 4°C-on, végül immuncitokémiai feldolgozásnak vetettük alá (zselatinos beágyazás vagy „whole mount” immunfluoreszcencia).

3.2.1. Zselatinos fagyasztott metszetek készítése

A PFA fixálást és a mosási lépést (3x5 perc 1x-es PBS-ben) követően a szerveket egy éjszakán át 15%-os szacharózban tartottuk 4°C-on. A beágyazáshoz 7,5%-os zselatint használtunk. A zselatin dermedése és a szervek elhelyezkedésének megjelölése után egy éles eszköz segítségével kivágtuk a kívánt méretű blokkot. A blokkokat -60°C-ra folyékony nitrogénnel, izopentánban (2-methylbutane, Sigma Aldrich, M32631) fagyasztottuk le. A krioblokkok metszését Shandon gyártmányú kriótómmal (kriosztáttal) -27°C-on végeztük. A 12 µm vastag metszeteket Poly-L-lysinnel (Sigma Aldrich, P8920) kezelt tárgylemezre vittük fel és -20°C-on tároltuk felhasználásig.

A beágyazáshoz használt oldatok

10x-es koncentrált foszfát-pufferelt-sóoldat (PBS, pH=7,0, minden összetevő 10-szeres mennyiségben van jelen):

- 1000 ml desztillált víz
- 80 g NaCl (Lach-Ner, 30093AP0)
- 2 g KCl (Reanal, 1805010138)
- 1,2 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O (Lach-Ner, 30388AP0)
- 2 g KH₂PO₄ (Lach-Ner, 30016AP0)

Az 1x-es PBS elkészítéséhez a koncentrált 10x-es PBS oldatot 10-szeres hígításban alkalmaztuk. Az oldatot autoklávoztuk és szobahőmérsékleten tároltuk.

Pufferelt 4%-os paraformaldehid (PFA, pH=7,4) oldat:

- 700 ml desztillált víz
- 40 g paraformaldehid (Reanal, 2555001338)
- 20%-os 0,5M-os NaOH (Reanal, 14052138)
- 1 M HCl
- 250 ml 1x PBS

A tárolás -20°C-on történt.

15%-os szacharóz oldat:

- 100 ml 1x-es PBS
- 15 g szacharóz (Reanal, 0714000838)

A szacharóz oldatot 4°C-on tároltuk.

7,5%-os zselatin oldat:

- 500 ml 1x-es PBS
- 75 g D-(+)-szacharóz (Reanal, 0714000838)
- 37,5 g zselatin (Sigma Aldrich, G2625)

A szacharózt és a zselatint maximum 80°C-ra melegített PBS-hez adtuk hozzá mágneses keverőn, majd addig kevertettük, míg egynemű oldatot nem kaptunk, amit befejezésül 50 ml-es centrifuga csövekbe (VWR, 75874294) porcióztuk szét és -20°C-on tároltuk.

3.3. Fluoreszcens immuncitokémia

A fluoreszcens immuncitokémiát fagyasztott metszeteken végeztük. A metszeteket 37°C-os 1x-PBS-ben rehidráltuk 10 percig. A szövetben a megjelölni kívánt molekulának megfelelő primer ellenanyagok (1. táblázat) hígítását 1 %-ban BSA-t (Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich, A9647) és 0,1 %-ban Na-azidot (NaN₃) tartalmazó 1x-PBS oldatban végeztük. A hígítás mértékének (1:50-1:1000), valamint az inkubációs időnek a beállítása gyártói utasítás vagy publikációkban leírt információk alapján történt. A primer ellenanyagot pipetták segítségével a metszetekre mértük és nedves kamrában (PathnSitu Biotechnologies) inkubáltuk 1-3 órán át szobahőmérsékleten vagy egy éjszakán át 4°C-on, majd 3x5 perces 1x-es PBS mosás következett. A fluorokrómmal kapcsolt szekunder

ellenanyag (2. táblázat) a primer ellenanyagoknak megfelelő állatfajú és izotípusú volt, amit 1:200 koncentrációban 1x-es PBS-ben hígítottunk, 45 percig hagytuk a metszeten, végül egy újabb mosási lépést követően elvégeztük a sejtmagjelölést 1 µg/ml koncentrációjú DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole dihidrochloride, Invitrogen, D1306) reagens 10 perces inkubálásával. Az utolsó PBS mosás után a metszeteket vízdékony fedőanyaggal (Aqua-Poly/Mount, Polysciences, 1860620) fedtük le és 4°C-on tároltuk. Kettős fluoreszcens immuncitokémia esetén különböző molekulák egyidejű jelenlétét tudtuk igazolni ugyanazon metszeten. Az első primer és a primer ellenanyagoknak megfelelő izotípusú és állatfajból származó szekunder ellenanyag inkubációja után az elsőtől eltérő állatfajú vagy más izotípusú második primer ellenanyagot választottunk ki, majd hívtuk elő a második ellenanyagot felismerő eltérő fluoreszcenciájú szekunder ellenanyaggal. A sejtmagjelölés, az inkubációs idők és a kísérleti körülmények beállításai a fent leírt módon történtek.

3.3.1. Teljes szöveti fluoreszcens immuncitokémia

A Remak-ganglion morfológiai fejlődésének tanulmányozásához „whole mount” fluoreszcens immuncitokémiát végeztünk, amelyhez 6, 9, 12 és 14 napos csirke embryok utóbeleit izoláltuk, majd 4 %-os PFA-ban egy éjszakán át 4°C-on fixáltuk. A szöveteket permeabilizáltuk 0,1 %-os Triton-X (Thermo Fisher Scientific, A16046) 1x-es PBS oldatával egy éjszakán át 70 rpm-en rázatva 4°C-on. A beleket 1:400-ban hígított TUJ1 primer ellenanyag (1. táblázat) és 1 %-os kecske szérumban (Vector, S1000) inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten 70 rpm fordulatszámon. A három 10-perces 1x-es PBS mosást követően a β III-tubulint Alexa Fluor kecskében készült anti-egér IgG (H+L) 488 (2. táblázat) szekunder ellenanyaggal hívtuk elő 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten, 70 rpm-es rázatással, végül háromszor mostuk 1x-es PBS-sel és Nikon SMZ25 fluoreszcens sztereomikroszkóppal vizsgáltuk.

1. táblázat. A felhasznált primer ellenanyagok

Primer ellenanyag neve	Klón	Hígítás	Származás, cég, katalógusszám	Host, Izotípus	Megjelölt sejttípus(ok)
anti-alpha simaizom aktin (SMA)	1A4	1:400	Thermo Fisher Scientific, 14976082	egér, IgG2a	simaizom
anti-BFABP	poli-klonális	1:50	Kurtz et al. ,1994	nyúl, IgG	glia
anti-CN		felülúszó	Dr. Hideaki Tanaka szívességéből (Tanaka et al., 1990)	egér, IgG1	csirke specifikus neuron
anti-CSF1R	ROS-AV170	1:200	BioRad, MCA5956GA	egér, IgG1	bursai szekréciós dendritikus sejt
anti-CXCR4	9D9	1:100	Dr. Sonja Hartle, München University	egér IgG2a	ganglionléc sejt, perifériás ideg, B-lymphocyt
desmin	DER11	1:200	DAKO Corporation, M0760	egér, IgG1	bursai corticalis mesenchymális-, izom-, reticulumsejt
E-cadherin	36	1:200	BD Biosciences, 610181	egér IgG2a	bursai medullaris mesenchymalis retikuláris sejt
anti-GFP	poli-klonális	1:200	Rockland, 600-101215M	kecske, IgG	green fluorescent protein
anti-HNK1 (CD57)	Ab2	1:50	Neomarkers, MS1163P	egér, IgM	ganglionléc sejt
anti-HuC/D	16A11	1:50	Invitrogen, A21271	egér, IgG2b	neuron perikaryon
anti-neurofilament	2F11	1:50	Thermo Fisher Scientific, MUB1303P	egér, IgG1	neuron
anti-nNOS	3G6B10	1:200	Thermo Fisher Scientific, 372800	egér, IgG1	nitreg neuron
anti-P75 ^{NRT+}	poli-klonális	1:200	Weskamp és Reichardt, 1991	nyúl, IgG	csirke ganglionléc
anti-SOX10	A-2	1:30	Santa Cruz Biotechnology, sc365692	egér, IgG1	csirke ganglionléc
anti-TUJ1	AA10	1:400	Santa Cruz Biotechnology, sc80016	egér, IgG2a	βIII-tubulin, neuron

2.táblázat. A felhasznált szekunder ellenanyagok

Szekunder ellenanyag neve	Fluorokróm excitációs hullámhossza (nm)	Cég, katalógusszám
Alexa Fluor kecskében készült anti-egér IgG (H+L)	488	Thermo Fisher Scientific, A32723
Alexa Fluor kecskében készült anti-egér IgG (H+L)	594	Thermo Fisher Scientific, A32742
Alexa Fluor kecskében készült anti-egér IgG1 (H+L)	488	Thermo Fisher Scientific, A21121
Alexa Fluor kecskében készült anti-egér IgG1 (H+L)	594	Thermo Fisher Scientific, A21125
Alexa Fluor kecskében készült anti-egér IgG2a (H+L)	488	Thermo Fisher Scientific, A21131
Alexa Fluor kecskében készült anti-egér IgG2a (H+L)	594	Thermo Fisher Scientific, A21135
Alexa Fluor kecskében készült anti-egér IgM (H+L)	488	Thermo Fisher Scientific, A10680
Alexa Fluor számban készült anti-kecske IgG (H+L)	488	Thermo Fisher Scientific, A11055
Alexa Fluor kecskében készült anti-nyúl IgG (H+L)	488	Thermo Fisher Scientific, A32731
Alexa Fluor kecskében készült anti-nyúl IgG (H+L)	546	Thermo Fisher Scientific, A11035

3.4. GFP-Remak-ganglion kiméra és choriollantois membrán technika

Annak meghatározására, hogy a Remak-ganglion szerves részét képezi a bélidegrendszernek, fluoreszcens jelölést végeztünk a különböző szövetrészek elkülönítésére, melyhez *in vitro* szövetrekombinációt kombináltunk *ex vivo* chorioallantois membrán (CAM) technikával a laboratóriumunkban kifejlesztett, korábban leírt módszer szerint (Nagy és Goldstein, 2006; Nagy et al., 2020). Az első lépésben 6 napos csirke embryok postcoecalis bélszakaszát (utóbelét) mikropreparációra alkalmas eszközök segítségével sztereomikroszkóp alatt 100 µg/ml penicillin-streptomycin (PenStrep, Sigma Aldrich, P0781) tartalmú DMEM/F12 médiumba (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, Gibco, Thermo Fisher Scientific, 11320033) izoláltuk. Eltávolítottuk a Remak-gangliont és azonos korú GFP csirke embryóból származó Remak-ganglionnal helyettesítettük azonos orientációban. A

kísérletesen rekombinált szövetet 24 órára 3-dimenziós kollagén mátrixba ágyasztuk, hogy elősegítsük a szöveti integritás kialakulását a szövetek között (Nagy et al., 2007). A 3D kollagén mátrix oldat 70 %-ban I-es típusú kollagént (BD Biosciences; 354236), 29,4 %-ban DMEM médiumot (Gibco, Thermo Fisher Scientific, 11965092) és 0,6 %-ban 1 N NaOH oldatot tartalmazott. Az összetevőket mindig 4°C-ra lehűtött állapotban mértünk össze szervtenyésztésre alkalmas szűkített aljú Petri-csészében (Falcon, 353037). A következő napon eltávolítottuk a szerveket a mátrixból és egy 9 napos (HH35) csirke embryo CAM membránjára ültettük a következők szerint: csipeszek segítségével egy ablakot nyitottunk a tojáshéjon a légkamra felett és a héjhártya gondos lefejtése után egy steril vattával traumatizáltuk a CAM membránt ott, ahol egy „Y” alakban elágazódó 1 mm-nél vastagabb érszakasz volt. Az embryonális beleket traumatizált kapillárisok területére ültettük, a tojást egy steril ragasztószalaggal lezártuk (a kiszáradás és a szennyeződések elkerülése végett). A CAM kimérákat 7 napig inkubáltuk laboratóriumunk keltetőgépében (túlélési arány 80%).

CAM technikát alkalmaztuk annak bizonyítására is, hogy a Remak-ganglionból származó extrinsic idegrostok ganglionmentes utóbélbe is képesek projektálni. A kísérlethez 5 napos embryonális preganglionotikus utóbeleket Remak-ganglionjukkal együtt ültettünk CAM-ra és 9 napig tenyésztettük (túlélési arány 95%, szövettanilag feldolgozott utóbél kimérák száma n=5).

Miután a CAM graftokat eltávolítottuk a membránról, 4 %-os PFA-ban egy éjszakán át fixáltuk, majd a szövettani feldolgozás következett. Immunfluoreszcens jelölés után a GFP-Remak-ganglion-rekombinációs kísérletben 5 db graft esetében számoltuk meg a GFP⁺/TUJ1⁺ extrinsic és a GFP⁺/TUJ1⁺ intrinsic idegrostok arányát.

3.5. GFP-velőcső kiméra

Az enterális ganglionléc sejtek megjelölésére *in ovo* GFP-csirke velőcső kiméra technikát alkalmaztunk egy korábban leírt technika szerint (Nagy et al., 2012; Delalande et al., 2015). Mivel a bélidegrendszer kialakító ganglionléc sejtek a velőcsőből delaminálódnak a neuruláció során a 2. embryonális napon a vagális szakasz esetében (Le Douarin & Teillet, 1973; Stoller & Epstein, 2005; Nagy et al., 2012), ezért a folyamat előtt (10-11 szomitás stádiumban, E1,5) a 2-6. szomita között található velőcsőszegmens GFP-rekombinációjával a kivándorló ganglionléc sejtek GFP-vel jelöltek lesznek, így

vizsgálhatóvá váltak bélidegrendszer belső plexusait létrehozó prekurzorok. A folyamathoz a csirketojásokat fektetve inkubáltuk, majd a légkamra felől egy 1,2 mm-es injekciós tű (Rextra, 10.0.0170.05) segítségével 8 ml albumint szívtunk le, melynek eredményeként az embryo néhány mm-rel lesüllyedt a tojásban, így hozzáférhetővé vált. A tojás középső részén egy 3 cm-es ablakot nyitottunk a fogadó embryo felett, és az embryo jobb vizualizációja érdekében a csírákorong közepe alá vitális festéket (FastGreen (Arthur H. Thomas Company, 537) 100 µg/ml Pen/Strep 1x-es PBS-ben hígítva 1:1 arányban) injektáltunk üveghúzott mikropipettával. Felnyitottuk a membrana vitellinát, mikrosebészeti úton saját készítésű wolfrámkések segítségével vágást ejtettünk a velőcső mindkét oldalán a 2-6. szomiták szintjén, majd kimetsztük a velőcsövet a fogadó embryóból. A GFP csirke donor embryot izoláltuk a tojásból és rovartűkkel rögzítettük szilikon aljú Petri-csészében, amely Pen/Strep 1-x-es PBS-t tartalmazott. Kipreparáltuk az azonos szegmensből származó GFP+ velőcsövet a környező szövetekkel együtt, amit Pen/Strep-es 1-x-es PBS-ben hígított 0,2 %-os pancreatinnal (Sigma Aldrich, P3292) emésztettünk 10 percig szobahőmérsékleten, elősegítve a szövetek elválását. Az enzimatis emésztés leállítására céljából a disszociált velőcsövet 5 percre 10 %-os juh szérumot (Jackson ImmunoResearch Lab, 013000121) tartalmazó DMEM oldatba helyeztük, majd transzplantáltuk a fogadó embryoba megfelelő orientációban. A kiméra tojást lezártuk, majd 8 napig tenyésztettük. A túlélési arány 30 % volt, 5 db kimérán végeztük el az immuncitokémiai vizsgálatot (n=5). A 10 napos kiméra embryok utóbelét 4 %-os PFA-ban fixáltuk le egy éjszakán át 4°C-on, zselatinba ágyasztuk és GFP, HU, valamint TUJ1 fluoreszcens immuncitokémiával az intrinsic neuronhálózatot vizsgáltuk.

3.6. Bursa Fabricii GFP-CAM kiméra

A bursa-CAM graftokat Dóra és mtsai. munkájában leírtak szerint végeztük el (Dóra et al., 2018). A B-sejtek bevándorlása előtti stádiumban a 9 napos vad típusú csirke embryokból izolált bursa Fabricii előtelepeket 9 napos transzgenikus GFP-csirke CAM membránjára transzplantáltuk, amelyből a GFP+ vérképző sejtek képesek kolonizálni a bursát. A CXCR4 jelátvitelt gátló kísérletekhez a bursa primordiumok mesenchymájába 1 µl 200 µM AMD3100-at (Sigma Aldrich, 155148315) injektáltuk (n=6), a kontroll bursákba (n=6) a kísérleti mintákban oldószerként használt 1 µl steril 1x PBS-oldatot jutattunk, és a GFP-CAM membránon tenyésztettük 9 napig (túlélési arány: 70%), majd a graftokat makroszkópos és mikroszkópos vizsgálatoknak vetettük alá.

3.7. *In vitro* sejtmigrációs kultúra

Migrációs tesztet alkalmaztunk a CXCL12 növekedési faktor *in vitro* vizsgálatára. A kísérlethez 6 cm átmérőjű műanyag Petri-csészéket (CytoOne, CC7682-3359) 20 µg/ml fibronektin mátrix-szal fedtünk be (FN, Thermo Fisher Scientific, 33010018) 30 percig 37°C-on. A tenyésztés során Remak-gangliont is tartalmazó E6 csirke utóbeleket az oldalukra fektetve helyeztünk ki a fibronektinnel bevolt felszínre. A tenyésztést 4 ml DMEM/F12 (Sigma Aldrich, D5429) médiumban végeztünk, melyhez CXCL12 (100 ng/ml; R&D Systems, 6448SD025), CXCL12 (100 ng/ml) +AMD3100 (200 µM) inhibítort vagy GDNF (10 ng/ml; R&D Systems, 212GD010) növekedési faktort adtunk, majd az inkubátorban (Eppendorf) 24 óráig tenyésztettük 37°C-on, 5%-os CO₂ szint mellett (n=5/kezelési csoport). A folyamat végén 4 %-os PFA-ban fixáltuk a beleket és „whole mount” immunfluoreszcenciát végeztünk. Legalább 6 db béltenyészetet hoztunk létre vizsgálati csoportonként, a kivándorló TUJ1⁺ extrinsic idegrostokat és a SOX10⁺ ganglionléc sejtek számát vizsgáltuk a különböző kezelések hatására.

3.8. Függesztett szervtenyészet

Az extinsic idegrendszer struktúrájának vizsgálatához függesztett szervtenyészeteket hoztunk létre. 6 napos csirke embryok izolált bélszakaszait steril Pen/Strep tartalmú DMEM/F12 médiumba gyűjtöttünk össze, majd rovartűk segítségével rögzítettük azokat szilikonnal bevont steril Petri-csészék aljához, oly módon, hogy ne tapadjanak le a szilikonhoz, hanem minden felületén egyenletesen érintkezzen a médiummal. A kísérletben a kontroll csoport DMEM/F12 médiuma nem tartalmazott növekedési faktort, a CXCR4-CXCL12 jelátvitel tanulmányozásához 200 µM-os AMD3100 inhibítort mértünk a médiumba. A tenyésztés 72 óráig tartott 37°C-on 5 %-os CO₂ szint mellett. A folyamat végén 4 %-os PFA-ban fixáltuk a beleket és szövettani beágyazásnak és „whole mount” immunfluoreszcens festést végeztünk. Minden kísérleti csoport esetén 5 függesztett belet dolgoztunk fel, pozitív kontrollként 9 napos utóbél szolgált. A TUJ1 „whole mount” immunfluoreszcens beleken az idegrostok számát, hosszúságát és szélességét vizsgáltuk, továbbá CN, valamint HU immunfluoreszcenciával az intrinsic plexusok neuronjainak sejttestjeit és rostjainak számát mértük meg.

3.9. Mikrogyöngy implantáció

A CXCR4-CXCL12 jelátvitel szöveten belüli idegrostnövekedést befolyásoló vizsgálatára mikrogyöngy technikát alkalmaztunk, amivel a vizsgálni kívánt növekedési faktorok lokálisan kifejtett hatását lehetett tanulmányozni (Nagy & Goldstein; 2006; Nagy et al., 2009). A heparin-akril gyöngyöket (átmérő: 70-150 μm , Sigma Aldrich, H5263) a következők alapján készítettük elő: **1.)** a kontrollként használt 20 $\mu\text{g/ml}$ BSA, 20 $\mu\text{g/ml}$ CXCL12 rekombináns protein, illetve az 1 mM AMD3100 inhibitor steril 1x-es PBS oldatába áztattuk 37°C-on 1 órán keresztül, majd **2.)** 20 percig szárítottuk azokat steril körülmények között és **3.)** E5 csirke embryo utóbél mesenchymájába ültettük, majd CAM membránon tenyésztettük 9 napig (a túlélési arány 70% volt). Legalább 5 db mikrogyöngy tartalmú utóbél graftot hoztunk létre minden vizsgálni kívánt csoport esetében és TUJ1 immunfluoreszcenciával a gyöngyök 300 μm -es környezetében a vizsgáltuk az idegrostok számát, vastagságát kvantifikáció céljából.

3.10. *In situ* hibridizáció

3.10.1. A paraplast beágyazás és a metszetek készítése

Az *in situ* hibridizációhoz a szöveteket DEPC (diethyl-pyrocabonate) kezelt 1x-es PBS-ben izoláltuk RNase Zap (Thermo Fisher Scientific, AM9780) vegyszerrel kezelt RNáz mentesített eszközökkel, majd egy éjszakán át 4°C-on Carnoy-fixálóval tartósítottuk, mely 60%-ban abszolút EtOH-t (Molar Chemicals, 02910481340), 30%-ban kloroformot (Reanal, 11192265) és 10%-ban ecetsavat (Reanal, 10047) tartalmazott. A következő napon végeztük el a paraplast beágyazást.

A fixálószer eltávolítása után a szerveget felszálló alkoholsorban dehidráltuk: 2 x 30 perc 70 % EtOH, 2 x 30 perc 90 % EtOH, 2 x 30 perc abs. EtOH, 2 x 15 perc toluol (Molar Chemicals, 09150101340). A következő lépésben Jouan termosztátban 2 órán át 65°C-os olvasztott paraplastban inkubáltuk (Sigma Aldrich, P3683-1KG), hogy a beágyazószer megfelelően átjárja a szöveteket. A kiöntő formákba olvasztott paraplastot öntöttünk és egy kismértékű dermedés után behelyeztük a szerveget, majd vártunk a teljes megszilárdulásig. A paraplast blokkokat 4°C-on tároltuk felhasználásig.

Kerekes mikrotómmal 7 µm vastag sorozatmetszeteket készítettünk, melyeket DEPC-kezelt ultratiszta vízben (UTV) terítettünk, és Superfrost (TS Labor, J1800AMNZ) tárgylemezekre vittünk fel. A metszeteket 4°C-on tároltuk.

3.10.2. Digoxigenin-jelölt RNS-próbák készítése

Az *in situ* hibridizációhoz a *Cxcr4* és *Cxcl12* antiszensz szekvenciákat tartalmazó plazmidokat Dr. Beate Brand-Saberi (Ruhr-Universität Bochum, Németország; (Rehimi et al. 2008; 2010) laboratóriumából kaptuk, amelyekből előbb „Maxiprep”-et készítettünk, a DNS-t linearizáltuk, majd digoxigeninnel jelölt RNS-próbát hoztunk létre.

3.10.2.1. „Maxiprep” készítés

A Maxiprep készítés célja nagy mennyiségű tisztított plazmidok előállítása volt, a gyártó utasításai szerint jártunk el.

Oldatok előkészítése

Első lépésként az agar táptalajt és tápoldatot készítettük elő az *Escherichia coli* (röviden *E. coli*) baktériumok tenyésztéséhez. Az LB médium létrehozásához 1000 ml UTV-hez 100 g Miller's LB Broth Base dehidratált táptalaj port (Invitrogen, 12795027) adtunk és szobahőmérsékleten kevertettük, majd 120°C-on 30 percig autoklávoztuk az oldatot. A 40°C alá hűtött tenyésztőfolyadékhoz 25 mg/ml ampicillint (Sigma Aldrich, A9518) pipettáztunk, majd szobahőmérsékleten rövid ideig tároltuk.

A táptalaj elkészítéséhez 12,5 g Miller's LB Broth Base port és 7,5 Bactoagar (Select Agar Invitrogen, 30391023) 500 ml UTV-ben oldottunk fel, melyet autoklávoztuk. A minimum 40°C-ra hűlt oldathoz 25 mg/ml ampicillint mértünk és 50 ml-enként kiöntöttük a 10 cm átmérőjű Petri-csészékbe (Orange Scientific, 4450300), amiket így 4°C-on tartottunk.

Transzformáció és *E. coli* tenyésztés

A külföldi laboratóriumokból érkező plazmidokat szűrőpapírra cseppentve kaptuk. A szűrőpapírt 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe helyeztük, majd 50 µl 10 mM-os pH 7,5 Tris pufferbe (BIORAD, trimethamin, 1610719) oldottuk be a plazmidot. 1 µl plazmidot mértünk a One Shot Top 10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fisher Scientific, C404010) – a gyártó által előre szétporciózott – elegyébe és 30 percen

keresztül jégkásán tartottuk, majd 30 másodpercre 42°C-os vízfürdőben hősokkoltuk a baktériumokat a sikeres transzformáció érdekében. A baktérium sejteket az agar táptalajra szélesztettük, végül 37°C-on Labnet Mini Inkubátorban tenyésztettük egy éjszakán keresztül.

A következő napon egy jól elkülönült ampicillinrezisztens baktérium populációból álló monoklón telepből steril 100 µl-es pipettahely segítségével mintát vettünk és 100 ml LB médiumot tartalmazó 250 ml-es Erlenmeyer-lombikban inkubáltuk, majd egy éjszakán keresztül 37°C-on BIOSAN ES-20 rázóinkubátorban 250 rpm fordulatszámom szaporítottuk fel a baktérium törzset.

A rákövetkező napon első lépésként elkészítettük hitelen fagyasztással az 1000 µl 1:1 arányú plazmiddal transzformált baktérium mintából és glicerolból (Reanal,07014) álló glicerol törzsoldatot, ami a hosszú távú tárolást szolgálja -80°C-on. A maradék tenyésztettel „Maxiprep” preparációt végeztük el. Szétporcióztuk a baktériumot tartalmazó tápoldatot 50 ml-es centrifuga csövekbe és 6000 g-n 4°C-on 30 percig centrifugáltuk Jouan CR3i típusú centrifugával. A folyamat végén elöntöttük a folyadékot és steril körülmények között kiszárítottuk a baktériumsejteket tartalmazó pelletet.

DNS preparálás

A DNS kinyerés lépéseit Quiagen Qiafilter Plasmid Maxi Kit-tel (Quiagen, 12263) végeztük a gyártó utasításai alapján.

Az 50 ml-es pipettacsőben lévő baktériumpelletet felszuszpendáltuk az RNáz-A és LyseBlue reagenst tartalmazó 10 ml Puffer 1-gyel, majd hozzákevertünk 10 ml Puffer 2-t (lízispufferek) a szuszpenzióhoz, melyet 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk. 4°C-os Puffer 3 neutralizáló oldatot mértünk a keverékhez és fecskendőszűrős csőbe (QIAfilter Maxi Cartridges) töltöttük a lizátumot. Egy 10 perces inkubációt követően a QIAGEN-tip 500 csövet 10 ml QBT pufferrel equilibráltuk, majd átszűrtük a szuszpenziót a QIAGEN-tip 500 csőbe, amely tartalmazta a lizált plazmidot, majd két lépésben 30-30 ml QC pufferrel mostuk át a szűrőt. A következő lépésben 15 ml 65°C-os QF pufferrel eluláltuk a DNS-t a fecskendőkből 50 ml-es centrifugacsövekbe, amihez 10,7 ml izopropanolt (Molar Chemicals, 00390) mértünk és 6000 g-n 4°C-on 60 percig centrifugáltuk az oldatot. Eltávolítottuk a felülúszót, 10 ml 70 %-os EtOH-t adtunk a mintához, majd centrifugáltuk 6000 g-n 4°C-on 60 percig. Kipipettáztuk az EtOH-t a csövekből, steril körülmények között kiszárítottuk a pelletet, melyet 200 µl DNáz/RNáz

mentes vízzel szuszpendáltuk fel és a tiszta plazmidot tartalmazó oldatot steril Eppendorfcsőbe mértük át, amit -20°C-on tártoltunk.

Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, ND2000) nanocsepp spektrofotométer segítségével 260/280 nm-en megmértük a plazmid oldat koncentrációját és tisztaságát, továbbá 0,8 %-os agaróz gélen Fisher Biotech FB-SB-710 típusú gélelektroforézissel (120 V, 40 perc) a plazmid méretét (CXCR4: 6000 bp, CXCL12: 5000 bp). A CXCR4 esetében 2500 ng/μl, a CXCL12-nél 4770 ng/μl volt plazmid koncentrációja.

3.10.2.2.DNS linearizálás

Mivel az RNS polimeráz nem képes hozzáférni a kötőhelyéhez egy cirkuláris DNS-en, így szükség van a plazmid felnyitására. A DNS linearizálás 20 μl-es reakcióelegye a következő komponensekből tevődött össze:

- 2 μl cc. CXCR4 vagy 1,1 μl cc. CXCL12 „Maxiprep” DNS
- 2 μl XbaI (CXCR4) vagy NotI (CXCL12) restrikciós endonukleáz (Thermo Fisher Scientific, K1991)
- 2 μl Fast Digest puffer (Thermo Fisher Scientific, K1991)
- 2 μl BSA (New England Biolabs, B9001S)
- 12 μl (CXCR4) vagy 13,5 μl (CXCL12) RNáz/DNáz mentes ddH₂O (Invitrogen, 10977-035)

A reakcióelegy 5 μg/μl „Maxiprep” DNS-t tartalmazott, azonfelül ddH₂O-val egészítettük 20 μl-re a végtérfogatot. 37°C-on 90 percig inkubáltuk az oldatot, majd 14000 rpm fordulatszámom, 4°C-on 10 percig centrifugáltuk (IEC Micromax RF, 3592 centrifuga), végül 65°C-on inaktiváltuk a restrikciós endonukleázt. Az utolsó centrifugálást (14000 rpm, 4°C, 4 perc) követően agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük a linearizált DNS épségét.

3.10.2.3.RNS-próba készítés

RNS próbát a linearizált DNS-ről készítettünk, mely komplementer volt a metszetben megjelölni kívánt mRNS-sel. Az RNS próba reakciómix (20 μl) összetevői:

- 5 μl linerizált *Cxcr4* vagy *Cxcl12* DNS
- 4 μl 5x transzkripció puffer (Promega P118B)

- 2 µl 10x DIG RNA Lab MIX (Roche 11277073910/26591020)
- 2 µl 100 mM DTT (Promega, 117B)
- 5 µl RNase/DNase mentes ddH₂O (Invitrogen, 10977-035)
- 1 µl RNase inhibitor 40 U/µl (Roche, 03335399001/ 35780600)
- 1 µl 20 U/µl SP6 (CXCR4; Promega, P108B) vagy T7 (CXCL12; Promega, P208C) RNS polimeráz

A DIG-11-UTP-t az SP6 és a T7 RNS polimerázok beépítik a transzkriptum körülbelül minden 20-25. nukleotidjánál, így a digoxigeninnel jelölt nukleotidot tartalmazó RNS mix, valamint az RNS polimeráz segítségével *in vitro* transzkripcióval elkészül az egyszálú digoxigeninnel jelölt RNS próba, mely komplementer a szövetben megtalálható *Cxcr4* vagy *Cxcl12* mRNS-ének egy adott fragmentjével. A reakcióelegyet 2 órán át hagytuk 37°C-os vízfürdőben, majd 2 µl (2U) DNáz I (Fermentas, ENO521) enzimmel bontottuk le az át nem írt DNS-t az oldatból, végül leállítottuk a reakciót 1 µl 0,5 M EDTA (Thermo Fisher Scientific, R1021) és 5 µl 4 M LiCl (Fluka, 62478) segítségével (20 perc, 37°C). Az RNS tisztítása és precipitációja 75 µl abs. EtOH -80°C-os éjszakai inkubációjával történt. A következő napon a kicsapott RNS pelletet 14000 rpm, 4°C, 4 perc centrifuga beállításokkal hoztuk létre, amelyet 100 µl RNáz/DNáz mentes vízben oldatba hoztunk. Gélelektroforézissel ellenőriztük a transzkripció sikerességét és elvégeztük a termék minőségellenőrzését.

A komplett digoxigeninnel jelölt RNS-próba (hibridizációs puffer) megfelelő koncentrációjának (1 µg/ml) kialakítása az előre elkészített prehibridizációs pufferrel történt, amely detergenst, továbbá RNS stabilizáló összetevőket tartalmazott 250 ml-ben:

- 50 ml DEPC- kezelt ddH₂O
- 125 ml (50%) formamid (Roche, 11814320001)
- 62,5 ml (5X) SSC pH 4,5 (Invitrogen, AM9763) – pH beállítás citromsavval (pH 1,6)
- 500 µl 50 µg/ml élesztő RNS (Sigma Aldrich, R6625)
- 12,5 ml (1%) SDS (Serva, 207683)
- 0,0125 g 50 µg/ml heparin (Sigma Aldrich, H4784)

Az oldat összetevői közül első körben a vizet, a formamidot, az SSC-t és az SDS-t mértük össze, majd 120°C-on 30 percig autokávoztuk, második körben az oldat 4°C-ra való hűtését követően hozzáadtuk az élesztő RNS-t, valamint a heparint, -20°C-on tároltuk az így elkészült jelölt RNS szálat tartalmazó hibridizációs puffert.

3.10.3. *In situ* hibridizáció

Első nap

A folyamat első lépéseként a paraplastba ágyazott metszeteket rehidráltuk, amit 2x5 perc toluol, 2x5 perc abs. EtOH, 2x2perc 90 % EtOH, 1x2 perc 70 % EtOH, 2x5 perc DEPC-kezelt 0,1% Tween-20 tartalmú 1x-es PBS (továbbiakban PBT) inkubálás követett. A lépések után *in situ* hibridizációra alkalmas steril metszettartó kazettákba helyeztük a metszeteket (5 db lemez/kazetta), melyekhez 15 ml 37°C-ra előmelegített PBT oldathoz hozzáadott 1,5 µl Proteinase K-t (18 mg/ml Roche, 3115887) mérünk és 37°C-on tartottuk 10 percig, ami a sejtmembrán permeabilizálását és az RNS próba hatékonyabb penetrációját teszi lehetővé. A következő lépés egy 3x5 perces PBT mosás, majd utófixálás volt 4%-os PFA-val. A második mosást után 15 ml 0,1 M TEA puffer mellett 37,5 µl ecetsav-anhidrid (0,25 %, Sigma Aldrich, 11,004-3) mRNS feltáró hatása következett (szobahőmérsékleten, 10 percig 70 rpm-en). A harmadik mosás után 70°C-ra előmelegített prehibridizációs puffert (ld. fentebb) kazettára mértük, amit rázató vízfürdőben (Precision, 34002581) 50 rpm-en, 2 óráig, 70°C-on inkubáltuk. A folyamat végén hibridizációs puffert adtuk a lemezekhez, mely tartalmazta a jelölt *Cxcr4* vagy *Cxcl12* RNS próbát, amit egy éjszakán át 50 rpm-en 70°C-on hibridizáltattunk a metszeten lévő mRNS-hez.

Második nap

Az *in situ* hibridizáció második napján a hibridizációs puffert összegyűjtöttük a metszetekről újbóli felhasználásra (-20°C-ra tettük) és 3x15 percig Solution I, továbbá 3x15 percig Solution III oldatban (az oldatok összetevőit ld. később) 70°C-on 50 rpm-en inkubáltuk a lemezeket. A kazettákba 3x10 percig az endogén alkalikus-foszfátázt gátló 1 mM levamisolt tartalmazó PBT-t (a továbbiakban LPBT) mértünk, és szobahőmérsékleten 70 rpm-en rázattuk. A 13,5 ml LPBT és 1,5 ml hőinaktivált juh szérum (10 %) blokkoló oldatában 70 rpm-en 2 órán át tartottuk a lemezeket, végül elvégeztük az egy éjszakán át tartó anti-digoxigenin-AP konjugálást (4°C-on), ami

kizárólag az általunk létrehozott DIG-11-UTP jelölt RNS-próbákhoz kötődött. Az oldat összetevői: 15 ml LPBT, 150 µl juh szérum (1 %) és 7,5 µl (10 U) anti-digoxigenin-AP (Sigma Aldrich, 11093274910). Az anti-digoxigenin oldat poliklonális anti-digoxigenin ellenanyagokból származó Fab-fragmenseket tartalmazott alkalikus foszfátázzal konjugálva, így alkalmas volt a digoxigeninnel jelölt nukleotidok kimutatására.

Harmadik nap

Az *in situ* hibridizáció 3. napján a lemezek 3x15 percig tartó szobahőmérsékleten történő LPBT mosását követően az alkalikus-foszfátáz enzim kromogén szubsztrát vegyületében (BM Purple AP szubsztrát, Sigma Aldrich, 11442074001) inkubáltuk a metszeteket 6 órán keresztül. A reakciótermék az alkalikus-foszfátáz helyén lokalizált sötétlila színű csapadék volt. Az *in situ* hibridizációs lemezek 1x-es PBS mosása után desmin, E-cadherin, P75 és SMA fluoreszcens immuncitokémiát végeztünk.

Az *in situ* hibridizációhoz használt oldatok

DEPC-kezelt UTV vagy 1x-es PBS oldat:

- 1000 ml UTV vagy 1x-es PBS
- 1000 µl DEPC (10⁻⁴ %, diethyl pyrocarbonate, Sigma Aldrich, 40718-25ML)

Az összemért oldatot 4°C-on állni hagytuk egy éjszakán át (RNáz inaktiválás), majd 120°C-on 30 percig autoklávoztuk és 4°C-on tároltuk.

Solution I oldat:

- 25 ml DEPC-kezelt UTV
- 62,5 ml (50%) formamid (Roche, 11814320001)
- 31,25 ml (20 X) SSC pH 4,5 (Invitrogen, AM9763) – pH beállítás citromsavval (pH 1,6)
- 6,25 ml (20 %) SDS (Serva, 20768.3)

Az oldatot 120°C-on 30 percig autoklávoztuk, majd -20°C-on tároltuk.

Solution III oldat:

- 50 ml DEPC-kezelt UTV
- 62,5 (50%) formamid (Roche, 11814320001)
- 12,5 ml (20 X) SSC pH 4,5 (Invitrogen, AM9763) – pH beállítás citromsavval (pH 1,6)

Az oldatot 120°C-on 30 percig autoklávoztuk, majd -20°C-on tároltuk.

Citromsav (pH 1,61) oldat:

- 100 ml DEPC-kezelt UTV
- 10 g citromsav (citromsav anhydrous, Biorad, 126623A)

Az oldatot 120°C-on 30 percig autoklávoztuk, majd szobahőmérsékleten tároltuk.

TEA puffér (0,1 M):

- 50 ml DEPC-kezelt UTV
- 0,925 g (TEA) (triethanolamine hydrochloride, Sigma Aldrich, T9534-250G)

Az oldatot 120°C-on 30 percig autoklávoztuk, majd szobahőmérsékleten tároltuk.

PBT oldat:

- 500 ml DEPC-kezelt 1x-es PBS
- 500 µl Tween20 (0,1%, MP Biomedicals, 9005645)

Az oldatot 120°C-on 30 percig autoklávoztuk, majd 4°C-on tároltuk.

LPBT oldat:

- 500 ml PBT
- 0,24 g levamisol (1mM, Sigma Aldrich, L9756-10G)

Az oldatot 120°C-on 30 percig autoklávoztuk, majd 4°C-on tároltuk.

3.11. A mikroszkópos képek elkészítése, feldolgozása és értékelése

A fluoreszcens immuncitokémiával kombinált *in situ* hibridizációs felvételeket Nikon Eclipse E800 fluoreszcens mikroszkóppal és Zeiss LSM780 és Olympus Fluoview

3000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A „whole mount” immunfluoreszcens felvételek Nikon SMZ25 fluoreszcens sztereomikroszkóppal egybeépített Prior L200/E egységgel készültek. A fluoreszcens képek feldolgozását, digitális összeillesztését, valamint az egyes struktúrák méretének és számának kvantifikációját CellSens, ZEISS ZEN Imaging, Nis-Elements (v 5.02) szoftverek mellett ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) és Adobe Photoshop CS 7.01 képfeldolgozó programokkal végeztük el.

3.12. Statisztikai analízis

A statisztikai analízishez Graphpad Prism v9.4.1 programot használtunk. A normál eloszlású, homogén varianciájú adatsorok esetében a csoportok összehasonlítását egy utas-ANOVA-val paraméteres post-hoc Tukey-tesztel végeztük, míg Kruskal–Wallis tesztet használtunk (post-hoc Dunn-tesztel, nem paraméteres) a nem normál eloszlású és/vagy nem homogén varianciájú adatsorokra. A post-hoc tesztekre Holm-korrekciót alkalmaztunk. Mann–Whitney U tesztet használtunk abban az esetben, amikor két csoportot hasonlítottunk össze. A varianciát és a normalitást a két legszigorúbb tesztel vizsgáltuk kis elemszámaink esetén: a normalitást Shapiro-Wilk tesztel, a varianciát Bartlett-tesztel. A szignifikancia szinteket a következők szerint határoztuk meg: ns, nem szignifikáns; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. A hibasávok az átlagok standard hibáját mutatták, egy eset kivételével, amikor minimum és maximum értékeket tüntettünk fel.

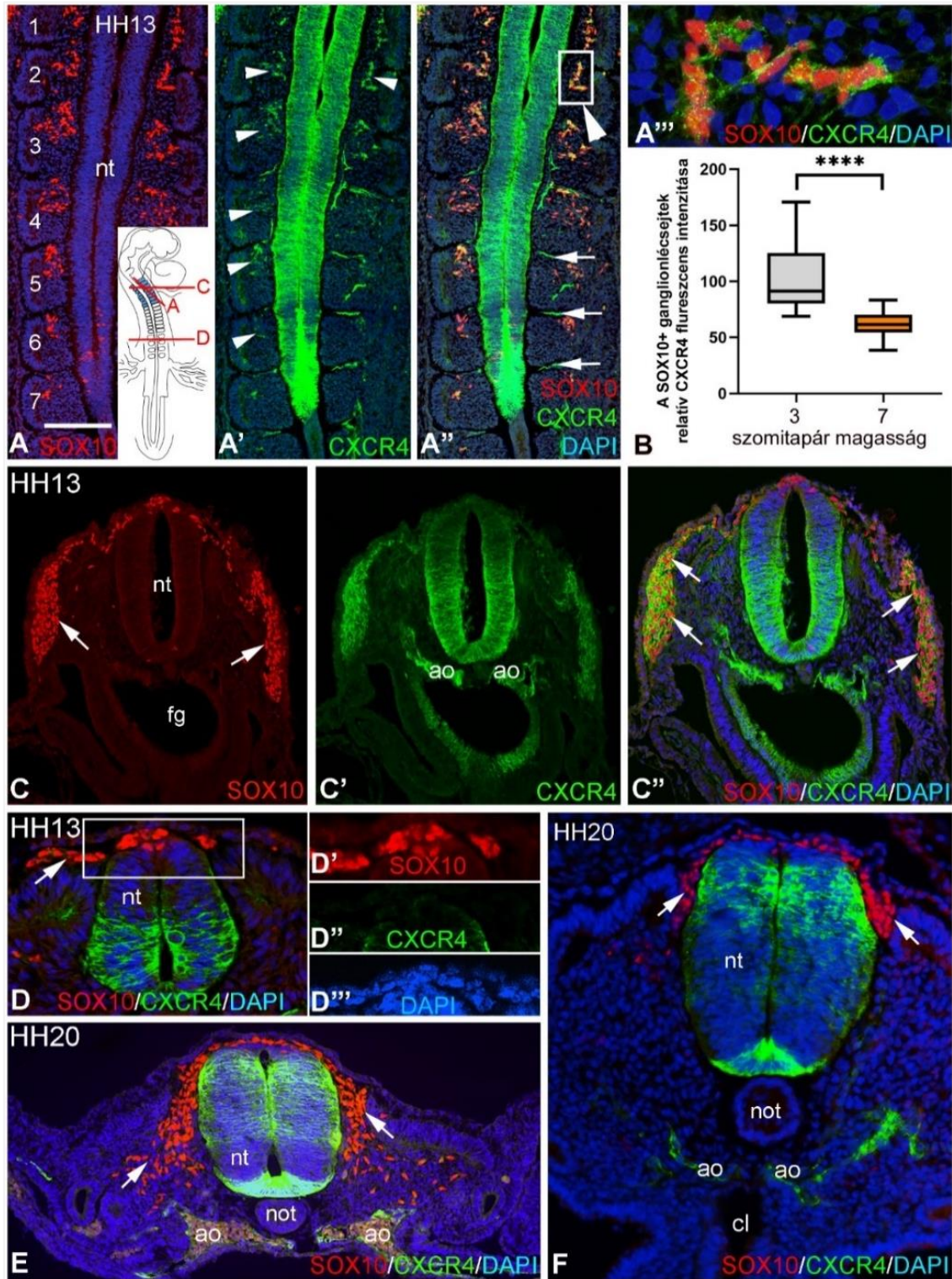
4. EREDMÉNYEK

4.1. A CXCR4 receptor expressziójának nyomonkövetése a bélidegrendszert létrehozó ganglionléc sejtek fejlődése során.

4.1.1. A CXCR4 receptort a cervicalis régióból származó ganglionléc sejtek expresszálják

A különböző ganglionléc sejtpopulációk CXCR4 expressziós mintázatának jellemzésére csirke embryok sorozatmetszeteit anti-CXCR4 és ganglionléc specifikus anti-SOX10 (SRY-kötő HMG-box transzkripciós faktor) ellenanyagokkal jelöltük meg a cervicalis, a törzsi és a lumbo-sacralis ganglionléc sejtek kivándorlásának kezdetekor a 13. és a 20. Hamburger-Hamilton (HH) stádiumban (2. és 3. embryonális nap) (Escot et al., 2013; Nagy et al., 2020). Az 1-7. cervicalis szomiták magasságában készült coronalis metszetek alapján a CXCR4 specifikusan kifejeződik a SOX10+ cervicalis régióból kivándorló ganglionléc sejtekben (7. ábra, A-A’’). Ezen a populáción belül az 1. és 3. szomita magasságban intenzív CXCR4 immunreaktivitást találtunk a velőcső mellett és a garatívek mesenchymájában elhelyezkedő cardialis ganglionléc sejtekben (7. ábra, A’’), ugyanakkor a 4. szomitától caudalisan kivándorló ganglionléc sejtek fokozatosan csökkenő CXCR4 kifejeződést mutattak (7. ábra, A’ nyílhegyek). A velőcső (7. ábra, A’, A’’, C’, C’’, D, D’’, E, F) és a SOX10- szomiták között lokalizálódó kapillárisok endothelsejtjei (7. ábra, A’’ nyilak) az összes szakaszban megtartották a magas CXCR4 expressziót. A CXCR4 immunreaktivitás relatív szintjének számszerűsítésére Shiha et al. (2021) leírása alapján a CXCR4 fluoreszcencia értékeinek szürkeárnyalatos egységekben kifejezett értékeit rögzítettük. A mérés során 3 egyedből készültek metszetek, egyedenként 5 metszet, metszetenként 20-20 db sejt intenzitása lett lemérve a 3. és a 7. szomitapár szintben. Az intenzitásértékek az 3. szomita szinten található SOX10+ cervicalis ganglionléc sejtekben szignifikánsan magasabbak voltak ($101,7 \pm 6,726$), mint a distalis (7. szomita szint) régióban ($61,59 \pm 2,614$) (7. ábra, B). Ellentétben a cervicalis ganglionléccel (7. ábra, C-C’’), a delaminálódó korai (HH13, 7. ábra, D-D’’’) és későbbi stádiumú (HH20, 7. ábra, E) törzsi (7. ábra, D-E) vagy a lumbo-sacralis (7. ábra, F) szegmensből származó sejtek nem fejezik ki a CXCR4 receptort.

Összefoglalva eredményeinket, a vándorló cervicalis velőcső szakaszból származó ganglionléc sejtek hozdozzák felszínükön a CXCR4 receptort, ugyanakkor a törzsi és a lumbo-sacralis ganglionléc sejtek nem expresszálják a molekulát.



7.ábra. A velőcsőből származó ganglionléc sejtek CXCR4 expressziójának karakterizálása. CXCR4 immunfluoreszcens festést végeztünk a különböző ganglionléc populációk vándorlásának időpontjában csirke embryokban. A metszési szinteket az A kép sematikus ábrája

mutatja. A-A'") A HH13 stádiumban a cervicalis ganglionléc szintjében készült coronalis metszetek jól mutatják a velőcsőből kilépő SOX10+ sejtek vándorlását a szomiták elülső felszínén. A) A számok az első 7 kialakult szomitapárt jelzik, a A') nyílhegyek a CXCR4 kifejeződésre mutatnak. A" **nyilak**) A CXCR4+ interszomitikus erek nem expresszálják a SOX10 anitgént. Az A'" nagyított kép az A" ábráról származik és SOX10+/CXCR4+ cervicalis ganglionlécéből származó összejteket jelenít meg. A B ábra a SOX10+/CXCR4+ sejtek fluoreszcens intenzitásértékeit ábrázolja relatív pixel intenzitásban kifejezve a 3. és a 7. szomitapár magasságában. Az embryo keresztmetszetek a HH13 stádiumú C-C'") előbél, a D-D'") törzsi szomiták, valamint a későbbi stádiumban (HH20) E) a törzsi és a F) cloaca régióból készültek. C-C'") A SOX10+ cervicalis velőcső eredetű ganglionléc sejtek hordozzák felszínükön a CXCR4 receptort, azonban a D-E) törzsi és a F) lumbo-sacralis szakaszból származó sejtek nem mutatják az expressziót (nyilak). A D kép bekeretezett területe a D'-D'" képeken látható kinagyítva. A B kép statisztikai elemzéséhez Mann–Whitney U tesztet használtunk, és az adatok minimum, maximum értékeit tüntettük fel. A szignifikancia szintje: ****P<0.0001. A méretarányt jelölő vonal az A képen található: A-A'") 170 µm; A'")15 µm; C-C'") 90 µm; D) 40 µm; D'-D'") 30 µm; E)120 µm; F) 60 µm. *ao, aorta; cl, cloaca; fg, előbél; HH, Hamburger-Hamilton stádium; not, chorda dorsalis; nt, velőcső.*

4.1.2. A CXCR4 receptort a lumbo-sacralis ganglionléc-eredetű Remak-ganglion fejezi ki

A törzsi ganglionlécéből származó szimpatikus- és a dorsalis érző ganglionokban beszámoltak a CXCR4 megjelenéséről (Yusuf et al., 2005; Rezzoug et al., 2011; Yahya et al., 2021), de expressziója a csirke és az emlős bélidegrendszer kialakulása idején még nem ismert.

A CXCR4 teljeskörű expressziójának meghatározására a csirke-embryo utóbél régiójában a ganglionléc sejtek kolonizációjának és differenciálódásának periódusaiban CXCR4 immuncitokémiát ötvöztük bélidegrendszer specifikus poliklonális anti-neurotrophin receptor (P75^{NTR}, a továbbiakban P75); anti-csirke neuron (CN), anti-ELAV-szerű protein-4 (HU), anti-βIII tubulin (TUJ1) és anti-glia specifikus agyizsírsvkötő fehérje (brain fatty acid binding protein BFABP; FABP7) monoklonális ellenanyagokkal. A CN és a TUJ1 antigének a neuronok perikaryonjának, valamint nyúlványainak kimutatására alkalmazhatók és kolokalizációt mutatnak (Tanaka et al., 1990; Nagy et al., 2012). A fluoreszcens immuncitokémiáknál az izotípusok kombinálhatóságának megfelelően felváltva alkalmaztuk a két ellenanyagot.

A Remak-ganglion neurális irányú differenciálódását teljes szöveti („wholemout” technika) TUJ1 immuncitokémiával követtük nyomon (8. ábra, A, C, F, H) Az 5 napos csirke embryóban (E5, HH27) a cervicalis ganglionlécéből származó sejtek kolonizálják az embryonális elő- és középbelet. Ebben a fejlődési stádiumban a lumbo-sacralis ganglionléc sejtek elérik a dorsalis mesenteriumot és rostralis irányba haladva létrehozzák a Remak-gangliont, valamint a plexus pelvicus ganglionhálózatát (Nagy et al., 2007). A caudalis irányban vándorló cervicalis ganglionléc sejtek egy nappal később (E6, HH28) érkeznek meg a distalis coecum területére (8. ábra, A nyilak), és a következő

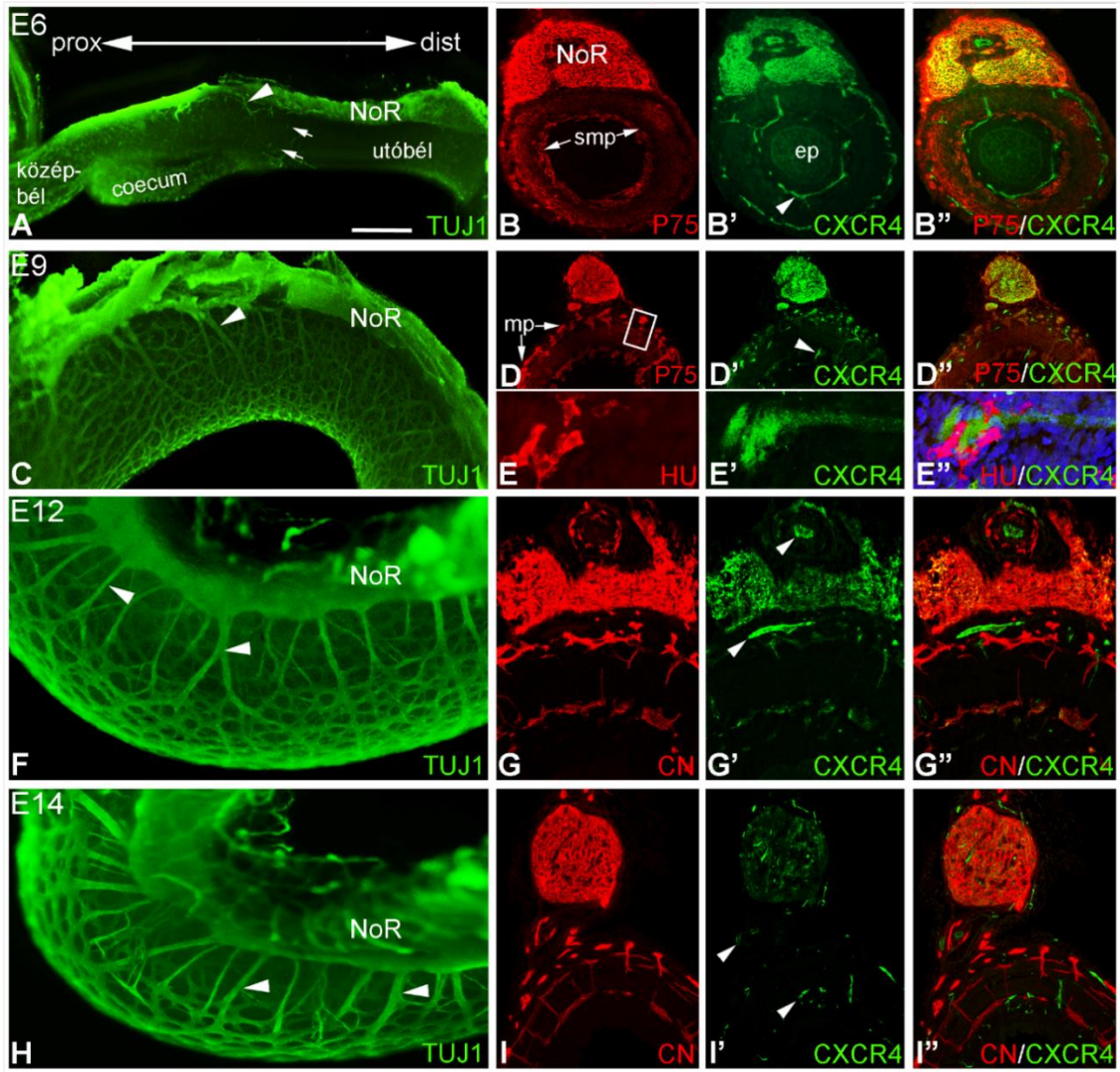
3 napban az utóbélben keresztül a distalis helyzetű cloacat is kolonizálják. A 6. embryonális naptól kezdve intenzív CXCR4 expressziót figyeltünk meg a P75+ Remak-ganglionban (8. ábra, B-B’). A 9. (E9, HH35) és a 12. (E12, HH38) napon a CXCR4-et továbbra is a Remak-ganglion és annak bélbe projektáló idegrostjai fejezik ki (8. ábra, D’, D’’, E’, E’’, G’, G’’). Ezzel szemben, a HU+/CN+ immunreaktivitású belső neurális plexusok (8. ábra D, E, G ábra) nem hordozzák felszínükön a CXCR4 receptort.

A 14. embryonális napra (E14, HH40) csökkent CXCR4 immunreaktivitás figyelhető meg a Remak-ganglionban (8. ábra, I-I’’) míg a nagyobb erek endothelsejtjeiben intenzíven megmarad (8. ábra, I’ nyílhegyek).

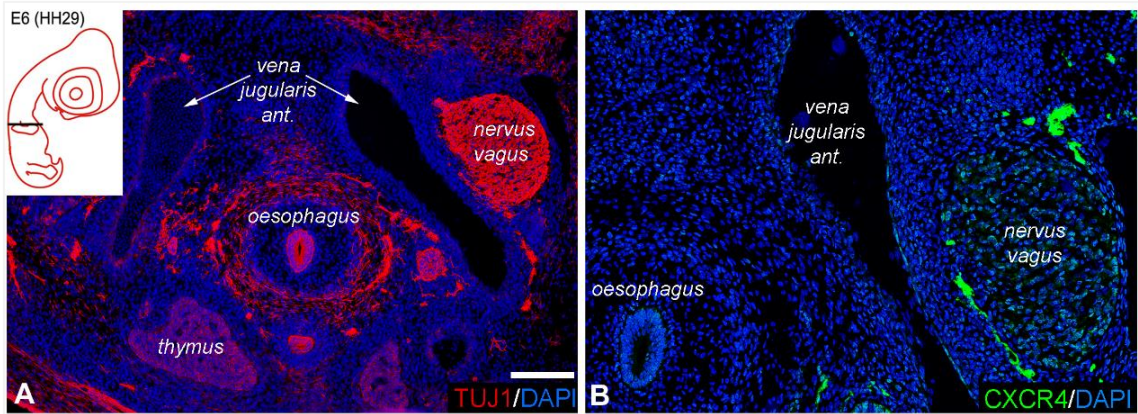
Továbbá, a gasztrointesztinális traktus craniális szegmensének paraszimpatikus beidegzéséért felelős n. vagus (9. ábra, A) szintén CXCR4 negativitást mutat, mint ahogyan azt a 6 napos csirke embryo nyelőcsővének alsó 1/3-ában készült keresztmetszete mutatja (9. ábra, B).

A fejlődő csirke vastagbél CXCR4 expressziójának analízise neuron- és gliaspecifikus ellenanyagokkal azt mutatta, hogy a CXCR4 a CN+ idegsejtekkel együtt lokalizálódik a Remak-ganglionban és annak idegrostjaiban (10. ábra, A-A’’), de a BFABP+ gliasejtek nem hordozzák felszínükön a receptort (10. ábra, B-B’’).

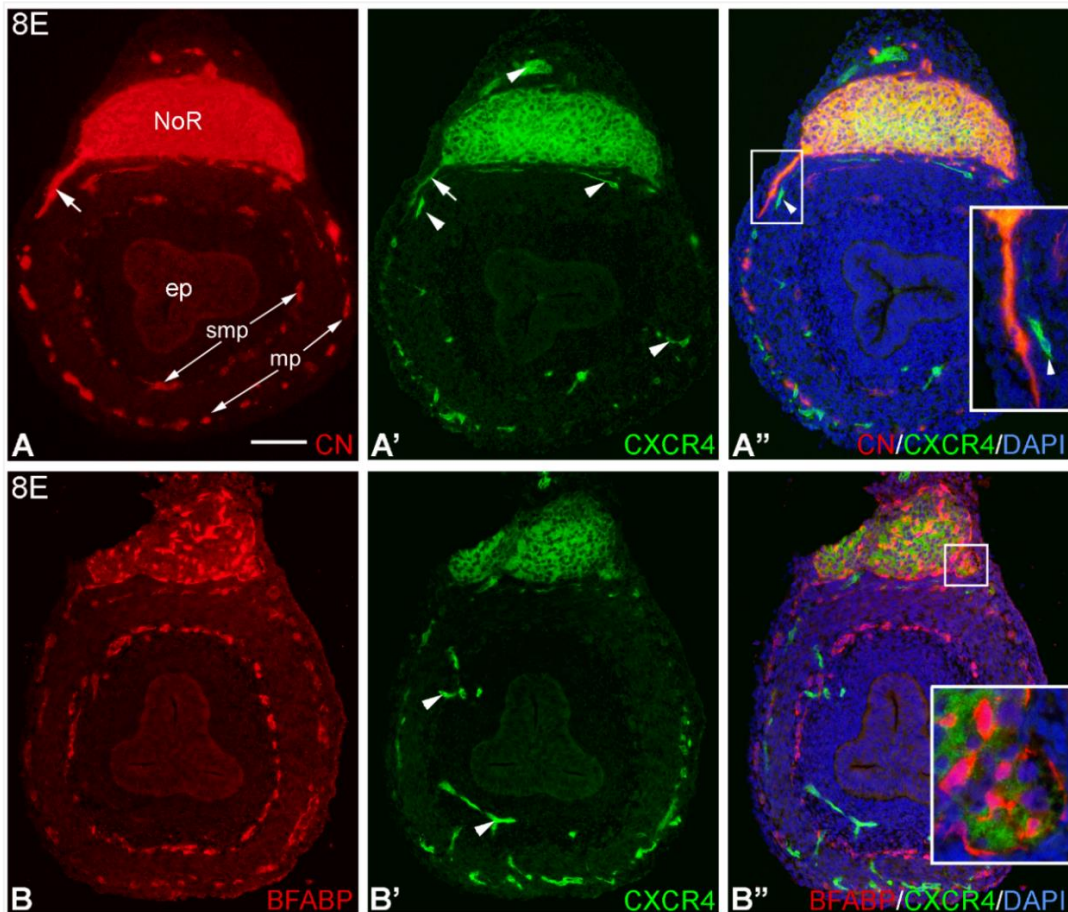
Összefoglalva az immuncitokémiai elemzés alapján elmondható, hogy a CXCR4 átmeneti expressziója az utóbél külső beidegzését adó Remak-ganglion idegrostjain mutatható ki, amikor a Remak-ganglionból származó idegrostok a bélfal irányába növekednek, majd a beidegzés kialakulása után a CXCR4 immunreaktivitásuk lecsökken.



8. ábra. A CXCR4 expressziójának változása az utóbél idegrendszerének embryonális fejlődése során. **A, C, F, H)** Csirke embryo teljes utóbél szövetén és **B-B'', D-D'', E-E'', G-G'', I-I'')** készült utóbél metszetein fluoreszcens immuncitokémiával követtük nyomon a fejlődő Remak-ganglion CXCR4 expresszióját. A bal oldali oszlop az **A)** E6, **C)** E9, **F)** E12 és **H)** E14 korú csirke embryo utóbeleik teljes szöveti TUJ1 immunfestése a fejlődő Remak-gangliont és annak bélfalat innerváló rostjait (nyílhegyek) jelöli meg. E6 stádiumban a cervicalis ganglionlécből származó sejtek elérik az utóbél proximalis szakaszát (**A**, nyilak). Az **B-B'')** E6, **D-D'')** E9, **G-G'')** E12 és **I-I'')** E14 korú csirke utóbél középső szakaszából készült keresztmetszetein bélidegrendszeri elemek eloszlását a ganglionléc-specifikus P75, neuron-specifikus CN és HU antigének expressziójával mutattuk ki. A **D** kép bekeretezett területének részletei az **E-E'')** ábrákon láthatók kinagyítva. **E-E'')** A plexus myentericus ganglionjait a Remak-ganglion eredetű CXCR4+ rostok idegzik be. A CXCR4 receptort a Remak-ganglion és az intesztinális endothel sejtek fejezik ki (nyílhegyek), de az intrinsic bélidegrendszeri elemek nem (jobb oldali oszlop). **B'', D'', G'', I'')** A CXCR4 expressziója a Remak-ganglionban a 12. embryonális napig növekszik, majd fokozatosan csökken. A méretarányt jelölő vonal az **A** képen található: **A)** 400 μ m ; **B-B'')** 130 μ m ; **C)** 180 μ m ; **D-D'')** 200 μ m ; **E-E'')** 25 μ m ; **F)** 230 μ m ; **G-G'')** 100 μ m ; **H)** 340 μ m, **I-I'')** 200 μ m. *dist, distalis; E, embryonális nap; ep, utóbél epithelium; NoR, Remak-ganglion; mp, plexus myentericus; prox, proximalis; smp, submucosalis plexus.*



9. ábra. A n. vagus nem fejezi ki a CXCR4 receptort. **A)** 6 napos (E6, HH29) csirke embryo nyelőcső magasságában (sémás rajz) készült metszeten neurális TUJ1 ellenanyaggal kirajzolódik a n. vagus és a nyelőcső idegszövege. **B)** A n. vagus nem fejezi ki a CXCR4 receptort. A méretarányt jelölő vonal az A képen található: **A)** 200 μm ; **B)** 100 μm . *ant.*, anterior; *E*, embryonális nap; *HH*, Hamburger-Hamilton stádium.



10. ábra. A Remak-ganglion neuronjai CXCR4 receptort expresszálnak. A 8 napos csirke embryo (E8) utóbélének keresztmetszete. **A, A'')** A nyíl A neuron-specifikus (CN) antigénnel kimutatott Remak-ganglion eredetű külső rostokra mutat. **A'', bekeretezett terület)** CN+ idegrostok erősen kifejezik a CXCR4-et. **A)** A nyílhegyek a CN-/CXCR4+ ereket jelölik. **B-B'')** A BFABP antigént kifejező enterális gliasejtek nem expresszálnak a CXCR4-et, míg a nyílhegyek a CXCR4+ erekre irányulnak. **B'')** ábra bekeretezett területén nincs átfedés a CXCR4+ sejtek és a BFABP+ gliasejtek között. A méretarányt jelölő vonal az A képen található: **A, A', A'')** 100 μm ; **A'' bekeretezett terület)** 50 μm ; **B, B', B'')** 100 μm ; **B'' bekeretezett terület)** 20 μm . *E*, embryonális nap; *ep*, utóbél epithelium; *mp*, plexus myentericus; *NoR*, Remak-ganglion; *smp*, plexus submucosus.

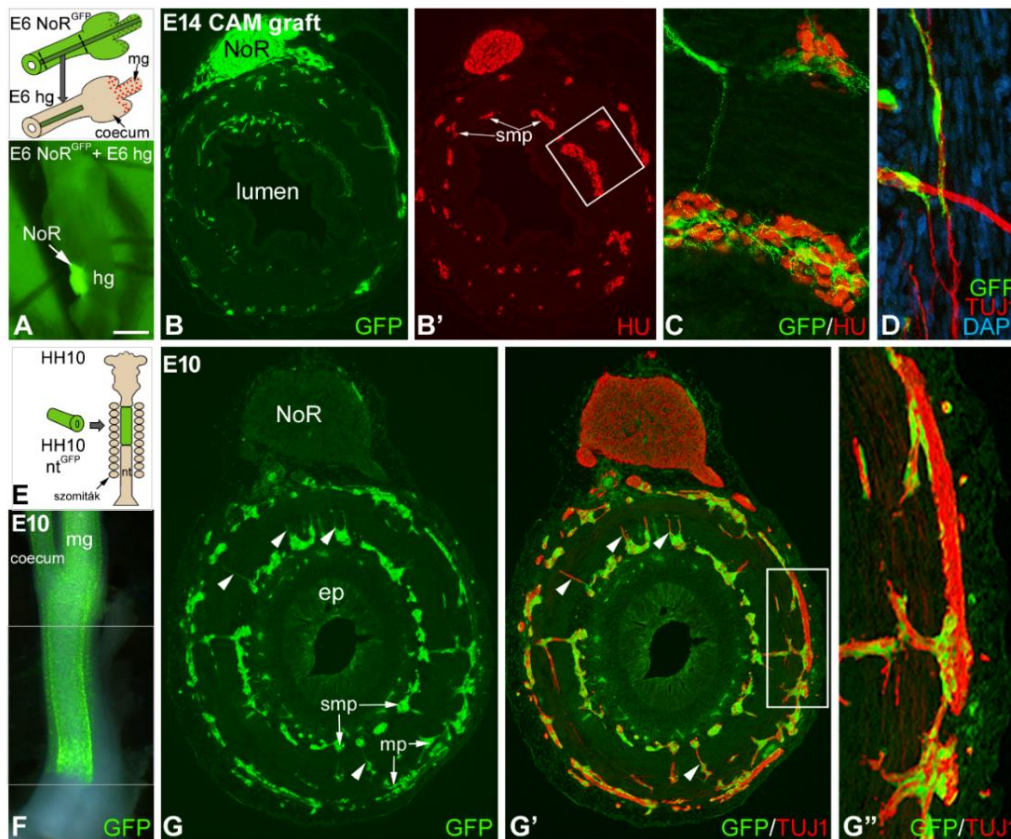
4.2. A colorectum külső beidegzésének kialakulásának tanulmányozása madár és emlős embryokban

4.2.1. A Remak-ganglion rostjai részt vesznek az utóbél mesenchymájának és a neurális plexusainak beidegzésében

A Remak-ganglion és a bélidegrendszer kapcsolatának meghatározására *ex vivo* szövet rekombinációt ötvöztünk CAM technikával. Első lépésben eltávolítottuk a Remak-gangliont egy 6 napos (E6) vad típusú csirke embryo (csirke^{wt}) utóbél szakaszáról és egy azonos korú zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) expresszáló csirke embryoból (csirke^{GFP}) származó Remak-ganglionnal helyettesítettük. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy ebben a stádiumban a coecumot és az utóbelet kolonizálják a ganglionléc sejtek, ezért *ex vivo* körülmények között a ganglionléc sejtek teljes bélidegrendszert tudnak a vastagbélben létrehozni (Nagy et al., 2021). A Remak-ganglion és a ganglionléc sejtekkel kolonizált utóbél kiméra rekombinánsokat 24 órán át 3-dimenziós kollagén gélben tartottuk, majd egy vad típusú csirke embryo chorioallantois membránján (CAM) 7 napig tenyésztettük tovább (11. ábra, A) (túlélési arány 80%, szövettanilag feldolgozott utóbél kimérák száma n=5). Amint az a 11. ábra B, B', C, D képeken látható, a CAM-graftot teljes mértékben kolonizálták a ganglionléc sejtek, amelyek normális morfológiájú bélidegrendszert alakítottak ki. Számos GFP+ rost van jelen a CAM-graftokban (11. ábra, B, C.), amely azt mutatja, hogy a donor GFP+ csirke Remak-ganglionból származó idegrostok képesek belenőni az utóbél falába és az enterális ganglionokat is behálózzák (11. ábra, C). Az intrinsic versus extrinsic eredetű idegrostok százalékos összehasonlítása alapján a TUJ1 immunreaktivitás szignifikánsan több GFP- (68,03±9,00%), mint a GFP+ idegrostot (31,96±9,00%) mutatott (11. ábra, D). Annak igazolására, hogy a Remak-ganglionból származó idegrostok hozzájárulnak az utóbél bélidegrendszeréhez a belső ganglionok jelenlétében, *in ovo* GFP csirke embryokból származó E1.5 (HH10) korú teljes cervicalis velőcső szakaszt és a hozzá tartozó ganglionléc szövetet azonos embryonális stádiumú vad típusú csirke embryokba transzplantáltuk (11. ábra, E sematikus ábra) és további 8 napig inkubáltuk (túlélési arány 30 %, szövettanilag feldolgozott velőcső kimérák száma n=5). A GFP jelölt cervicalis szegmensből származó ganglionléc sejtek megtalálhatók a bélfal enterális plexusaiban (11. ábra, F, G), hasonlóan a korábbi munkák során látottakhoz (Nagy et al., 2012; Delalande et al., 2021). TUJ1+/GFP- idegrostok is jelen vannak az utóbélben a GFP+ ganglionokkal. A

TUJ1+/GFP- axonok Remak-ganglion eredetűek, más rostok pedig a GFP-t expresszáló cervicalis ganglionléc sejtekből (TUJ1+/GFP+) származnak és differenciálódva enterális ganglionokat képeznek (11. ábra, G-G’’).

Összefoglalva, eredményeink kísérletesen igazolják azt, hogy a Remak-ganglion számos idegrostot növeszt a bélfalba és extrinsic idegként szerves részét képezi az utóbél idegrendszerének.



11. ábra. A Remak-ganglionból származó rostok beidegzik az enterális ganglionokat. Az A ábra felső része: egy 6 napos csirke^{GFP} Remak-ganglion és a 6 napos csirke^{wt} középbél-utóbél szöveti rekombinációinak sematikus illusztrációja. A piros pöttyök a rekombináció időpontjában a középbélet és a coecumot már kolonizáló cervicalis ganglionléc eredetű sejteket mutatják. **A kép alsó része)** chorioallantois membránra (CAM) transzplantált rekombináns belet mutatja. **B)** 8 napos CAM-tenyésztés után a csirke^{GFP} Remak-ganglion-eredetű rostok belépnek az utóbélbe. **C)** A GFP-t expresszáló Remak-ganglion rostok és kosárszerű axonterminálisaik behálózzák az enterális ganglionokat, és a HU⁺ neuronokon végződnek. A **B'** ábra bekeretezett területe a **C** képen látható kinagyítva. A **D** ábra szerint a GFP-t expresszáló Remak-ganglionból származó TUJ1⁺ axonok a TUJ1⁺/GFP⁻ intrinsic plexusok rostjaival is asszociálódnak. Az **E** vázlatos rajz a HH10 (E1.5) korú velőcső mikrosebészeti eltávolítását mutatja a 2-7. szomiták szintjében, és a rekombinációt az azonos embryonális korú csirke^{GFP} donor embryoból nyert egyező szegmensű velőcsővel. **F)** 8 nap tenyésztés után a GFP jelölt 10 napos kiméra utóbél teljes szöveti immunfestése és a **G, G')** középső szakaszból vett keresztmetszeti képe azt mutatja, hogy ebben a fejlődési stádiumban a GFP⁺ cervicalis ganglionlécből származó TUJ1⁺ idegsejtek a teljes vastagbélet kolonizálják, azonban sem a TUJ1⁺ Remak-ganglion, sem a belőle származó külső rostok nem expresszálják a GFP-t. A **G'** ábrán a bekeretezett terület kinagyítva látható a **G''**-ben, ahol a TUJ1⁺/GFP⁻ külső rostok eléri a TUJ1⁺/GFP⁺ belső plexusokat (nyílhegyek mutatnak rá a **G, G'**-ben). A méretarányt jelölő vonal az **A** képen található: **A)** 400 μ m; **B, B')** 170 μ m; **C, D)** 40 μ m; **F)** 600 μ m; **G, G')** 100 μ m; **G'')** 35 μ m. CAM, chorioallantois membrán; E, embryonális nap; ep, utóbél epithelium; hg, utóbél; mg, középbél; mp, plexus myentericus; NoR, Remak-ganglion; nt, velőcső; smp, plexus submucosus; wt, vad típus.

4.2.2. A pelvis ganglionok CXCR4 receptort expresszálnak

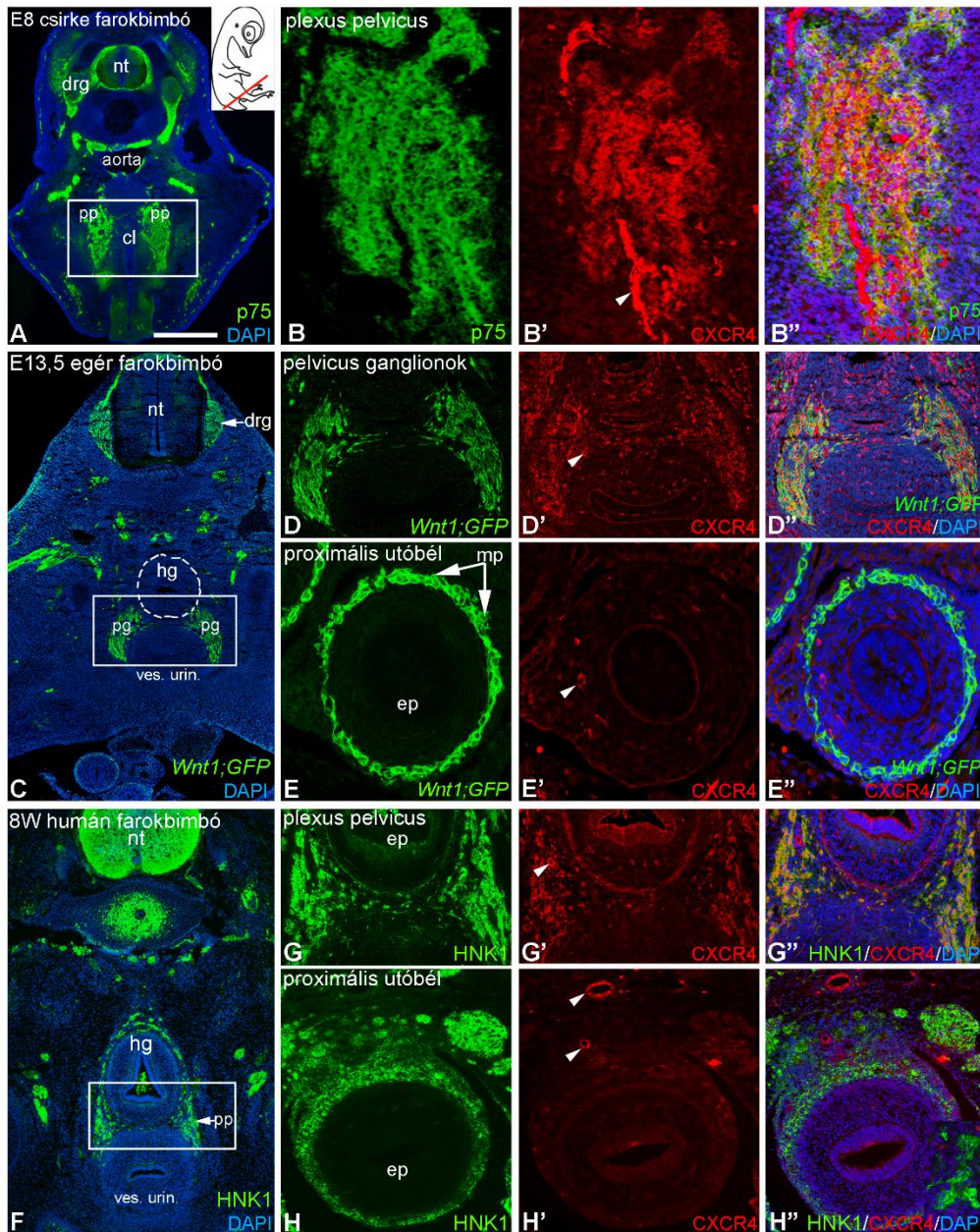
Általánosan elfogadott, hogy a madár és emlős embryokban a plexus pelvicut a lumbo-sacralis ganglionléc eredetű sejtek hozzák létre (Yntema és Hammond, 1954; Catala et al., 1995; Kapur, 2000; Nagy et al., 2012). A ganglionléc eredetű sejtek kimutatására a csirkében a P75, az egérben a Wingless MMTV integrációs hely faktor család 1 (Wnt1) és a humán embryóban a HNK1 (human natural killer glycoprotein-1, CD57) konstitutívan expresszáló faktorokat alkalmaztuk. Feltételeztük, hogy a Remak-ganglionhoz hasonlóan a plexus pelvicus is kifejezi a CXCR4 receptort. A pelvis ganglionok fejlődése során a CXCR4 expressziójának értékeléséhez kettős immuncitokémiát végeztünk E8 korú csirke embryok sorozat-keresztmetszetein a farokbimbó magasságában. A P75+ plexus pelvicus ganglionjai a cloacát körülvevő páros struktúrákként jelennek meg (12. ábra, A; B). A kettős immunfluoreszcencia azt mutatta, hogy a 8. embryonális napon (E8) CXCR4+ sejtek voltak jelen a P75+ plexus pelvicusban (12. ábra, B-B’). A P75+ sejtek immunfenotípusának további jellemzésére kettős immunfestéseket végeztünk. A HU ellenanyag immuncitokémiája nagyszámú neuron jelenlétét mutatta ki (13. ábra, A, B-B’). Továbbá a plexus pelvicus ganglionjai neurofilamentumot (NF) expresszáltak (13. ábra, C, D-D’), azonban nem tartalmaztak neuronális nitrogén-monoxid-szintáz (nNOS; 13. ábra, E, F-F’). Differenciált nNOS immunreaktív neuronok jelen voltak az utóbél plexus myentericusában (13. ábra, G-G’).

Ezt követően vizsgálatainkat kiterjesztettük egér- és humán embryokra is. A fejlődő ganglionléc eredetű sejtek nyomon követésére transzgenikus egereket alkalmaztunk. A $Wnt1^{Cre/+}$ $Rosa26^{flox-mTRed-Stop-flox-mGFP}$ (a továbbiakban $Wnt1;GFP$) transzgenikus egerek Cre rekombinázt expresszáltak az egér Wnt1 promóterének és enhancerének kontrollja alatt és a Wnt1 faktort kifejező sejtekben a működő Cre enzim hatására átíródott a GFP gén, amelynek eredményeként minden ganglionlécből származó sejt zöld fluoreszcenciát mutatott. A 13.5 napos egér embryóban a bélidegrendszer fejlődése során a Wnt1-jelölt ganglionléc sejtek eléri az utóbél proximalis szakaszát, ahol myentericus ganglionokká differenciálódnak. Az utóbél distalis szegmense még ganglionmentes, a ganglionléc sejtek kolonizációja a 14-15. nap végére fejeződik be. Ebben a stádiumban a distalis utóbél és a húgyhólyag között páros struktúráként fejlődnek ki a lumbo-sacralis ganglionlécből származó pelvis ganglionok (12. ábra, C, D-D’), amelyek kifejezik a CXCR4-et (12. ábra, D’, D’). Ezzel ellentétben a plexus

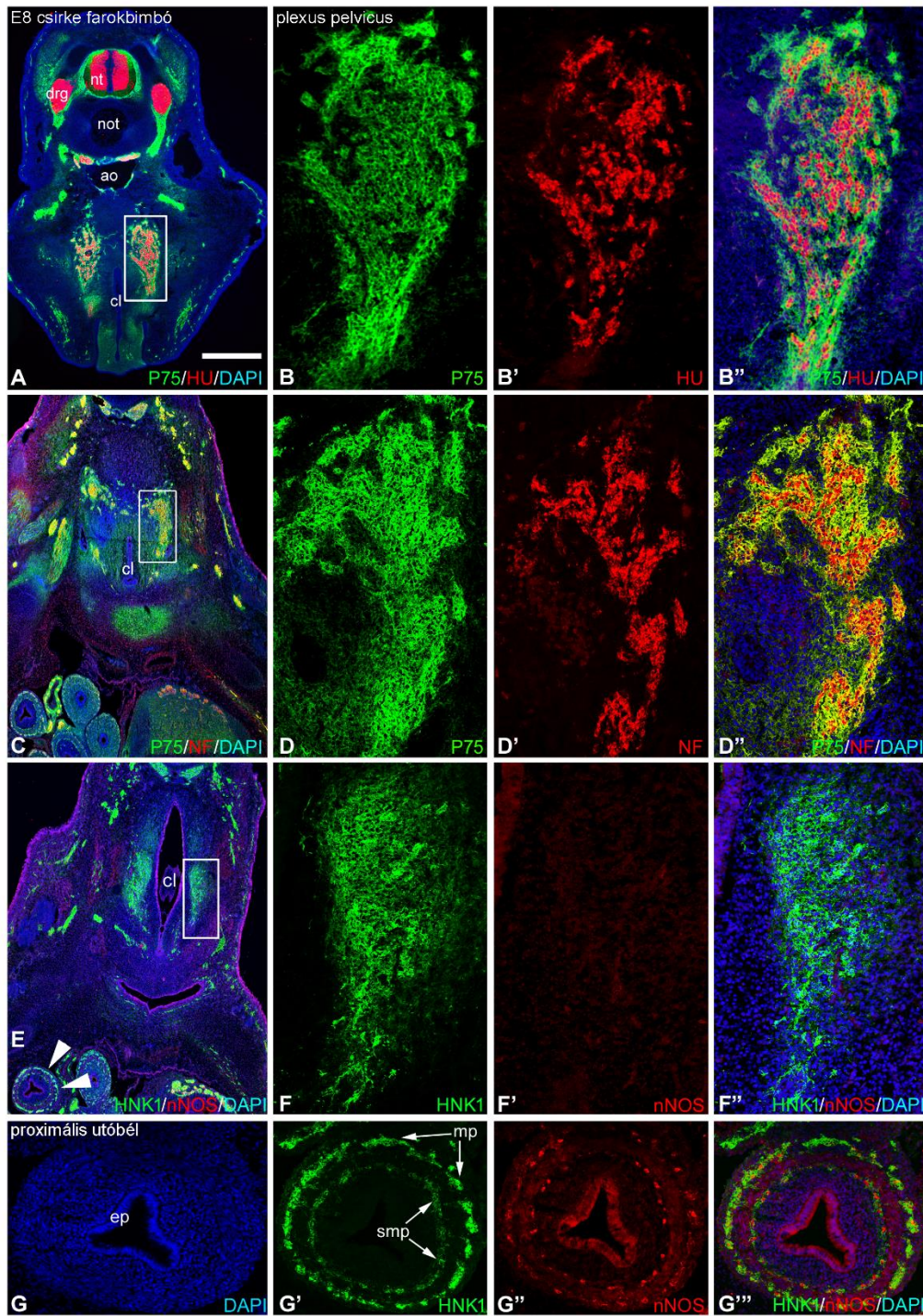
myentericusban a cervicalis ganglionléc-eredetű sejtek (5. ábra, E) nem expresszálnak CXCR4 receptort (12. ábra, E', E'').

Az egérhez hasonló képet kaptunk a humán embryo vizsgálatokor is (12. ábra, F, H-H''). A ganglionléc sejtekre specifikus HNK1 ellenanyag alkalmazásával kimutatott plexus pelvicius (12. ábra, F, G) ganglion sejtei hordozzák felszínükön a CXCR4 receptort (12. ábra, G', G''). A bélidegrendszer intrinsic elemei itt is CXCR4 negativitást mutattak (12. ábra, H-H''). A csirke embryohoz hasonlóan emlős embryokban a CXCR4 a nagyobb véregek endothel sejtjein is detektálható volt (nyílhegyek mutatna rá az 12. ábra B', D', E' G',H' képein).

Eredményeink alapján elmondható, hogy a CXCR4 kifejeződése általánosan jellemző a madár és az emlős embryok lumbo-sacralis ganglionléc-eredetű pelvicius ganglionjaiban.



12. ábra: A pelvicus ganglionok CXCR4 expressziót mutatnak csirke és emlős embryokban. 8 napos csirke, 13,5 napos egér és 8 hetes humán embryo farokbimbó keresztmetszetein fluoreszcens immuncitokémiát végeztünk. **A, B**) Az E8 korú csirke embryo farokbimbójának keresztmetszetében P75+ sejtcsoportok tűnnek fel a cloaca két oldalán, amelyek **B', B''**) CXCR4 expressziót mutatnak. Az **A** kép bekeretezett területe **B-B''** képeken látható nagyítva. Egér- és humán embryokban a pelvicus ganglionok az utóbél és a húgyhólyag között helyezkednek el. A **C-E''** ábrák az E13,5 korú *Wnt1:GFP* egér embryo farokbimbó keresztmetszeteit mutatják a pelvicus ganglionok magasságában, ahol a ganglionléc sejteket jelölő **C, D**) *Wnt1:GFP* kolokalizációt mutat a **D', D''**) CXCR4 receptorral. A **C** kép bekeretezett területe **D-D''** képeken látható kinagyítva. **E-E''**) A *Wnt1:GFP*+ enterális ganglionléc sejtek nem fejezik ki CXCR4 molekulát az utóbélben. **F, G**) A 8hetes (8W) humán embryóban a pelvicus ganglionok HNK1+ ganglionléc eredetű sejtjei **G', G''**) felszínükön hordozzák a CXCR4 receptort. Az **F** kép bekeretezett területe a **G-G''** képeken kinagyítva van feltüntetve. **H-H''**) Az utóbélben az enterális ganglionléc sejtek negatívak a CXCR4 specifikus ellenanyagra. A **B', D', E', G'** felvételeken nyílhegyekkel jelöltük a CXCR4+ véreket. A méretarányt jelölő vonal az **A** képen található: **A)** 450µm; **B-B''**) 110 µm; **C)** 350 µm; **D-D''**) 180 µm; **E-E''**) 90 µm; **F)** 350 µm; **G-G''**) 150 µm; **H-H''**) 120 µm. *cl*, cloaca; *drg*, dorsalis érző ganglion; *E*, embryonális nap; *ep*, utóbél epithelium; *hg*, utóbél; *nt*, velőcső; *pg*, pelvicus ganglion; *pp*, plexus pelvici; *ves.urin*, vesica urinaria; *W*, posztnatális hetek száma.



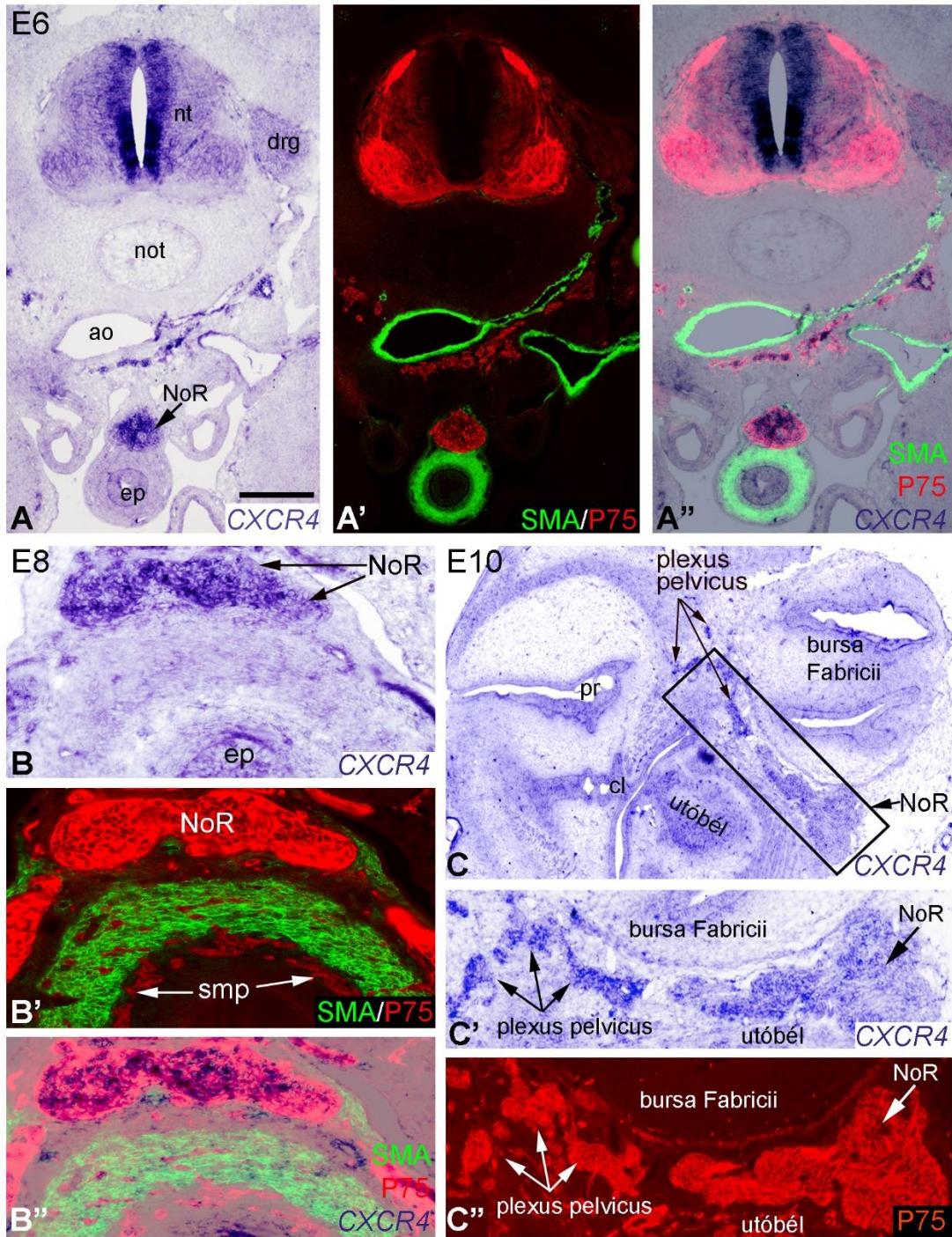
13. ábra. A plexus pelvicius ganglionjainak immunfenotípusa 8 napos csirke embrióban. 8 napos (E8) csirke embrió farokbimbó sorozatmetszeteit immunfluoreszcens jelöléssel láttuk el a pelvicius ganglionok szintjében. **A-B''**) A P75/HU kettős immunjelölés neuronális sejttestek jelenlétét mutatja a pelvicius ganglionokban (az **A** kép bekeretezett területe a **B-B''** ábrákon látható kinagyítva). **C-D''**) A plexus pelvicius P75+ sejtei neurofilamentumot (NF) expresszálnak (az **C** képen lévő bekeretezett terület a **D-D''** ábrákon látható kinagyítva). **E-F''**) A plexus pelvicius nem mutatja a nitrogén-oxid-szintáz (nNOS) expresszióját a HNK1+ ganglionléc sejtekben. Az **E** ábrán látható bekeretezett terület kinagyítva látható az **F-F''** képeken és a nyílhegygel jelölt utóbél metszetet a **G-G''** ábrásorozat tartalmazza nagyítva. **G-G''**) Az utóbél HNK1+ enterális ganglionléc sejtei nNOS-t fejeznek ki. A méretarányt jelölő vonal az **A** képen található: **A, C, E**) 450 μ m; **B-B'', D-D'', F-F''**) 110 μ m; **G-G''**) 100 μ m. *ao*, aorta; *cl*, cloaca; *drg*, dorsalis érző ganglion; *E*, embryonális nap; *ep*, utóbélhám; *pg*, pelvicius ganglion; *mp*, plexus myentericus; *not*, notochord; *nt*, velőcső; *smp*, plexus submucosus.

4.2.3. A *CXCR4* receptor és a *CXCL12* ligand mRNS expressziója csirke embryóban

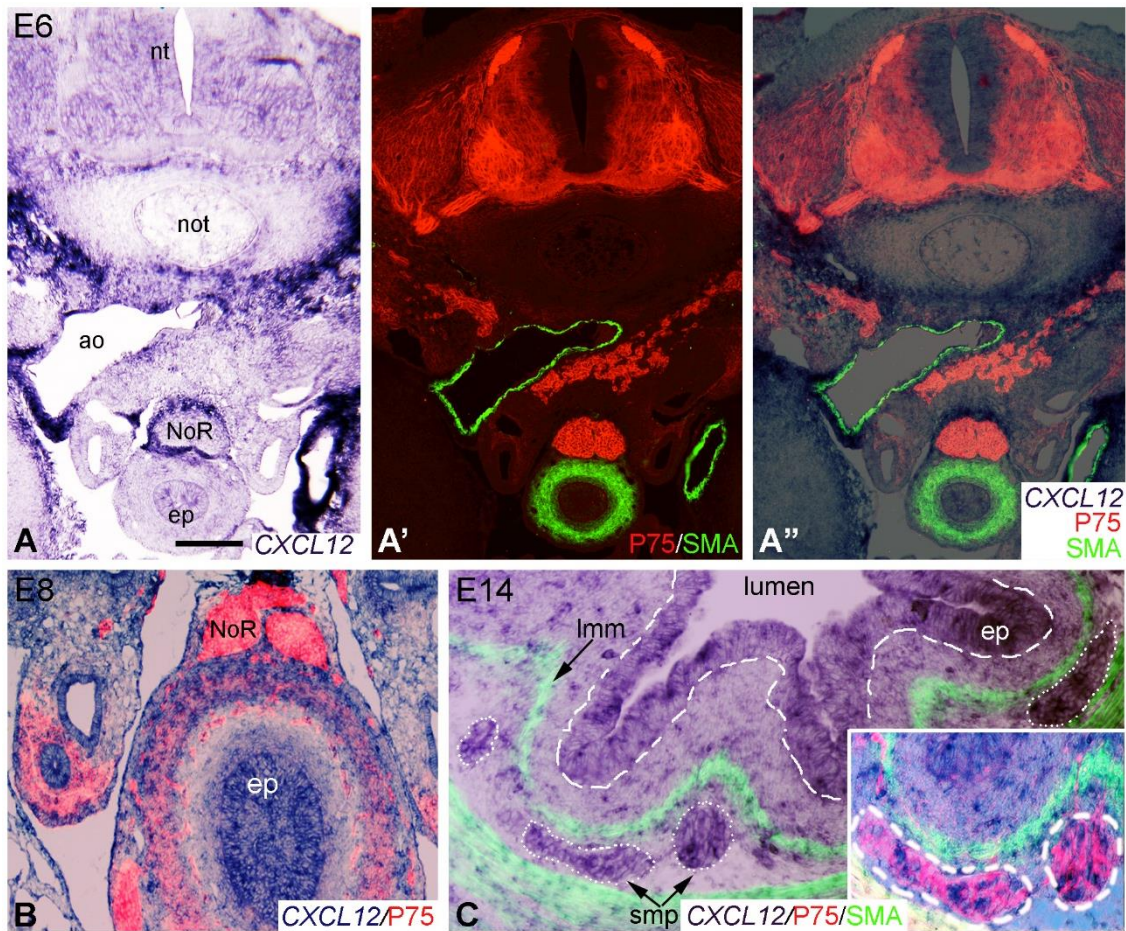
In situ hibridizációval vizsgáltuk a *CXCR4* és *CXCL12* térbeli és időbeli expresszióját a fejlődő utóbélben és a cloacában. 6 napos (E6) csirke embryóban a *CXCR4* transzkriptum a velőcső ventriculáris rétegében és az utóbél dorsalis részén lokalizálódik a P75+ Remak-ganglion területén (14. ábra, A-A”). A fejlődés előrehaladtával a 8. (E8, 14. ábra, B-B”) és a 10. (E10, 14. ábra, C-C”) embryonális napon a *CXCR4* expresszió a P75+ plexus pelviciusban és a Remak-ganglionban egyaránt megfigyelhető. A 10 napos csirke embryo farokbimbójának sagittalis sorozatmetszete a Remak-ganglion és a plexus pelvicius ganglionjait mutatja a proctodeum és a bursa Fabricii szintjében (14. ábra, C). A *CXCR4* mRNS kifejeződése nem figyelhető meg a P75+ enterális ganglionléc sejtek utóbélbe történő vándorlása során (14. ábra, B), hasonlóan a korábban látott immuncitokémiai eredményeinkhez.

A *CXCR4 in situ* hibridizációval párhuzamosan megnéztük a *CXCL12* ligand expresszióját a fejlődő utóbélben. 6 napos (E6) csirke embryóban a *CXCL12* expresszió a Remak-gangliont körülvevő mesenchymális sejtekben detektálható, az utóbél viscerális simaizomsejtjeiben nem fejeződik ki (15. ábra, A-A”). Figyelemreméltó, hogy a *CXCR4* és a *CXCL12* mRNS szintje magas volt a Remak-ganglion területén. *CXCL12* expressziót találtunk a fejlődő utóbél más régióiban is, beleértve a bélhámot (15. ábra, B, C) és a muscularis externa szövetét (15. ábra, B). A későbbi embryonális stádiumokban (E14) a *CXCL12* kifejeződése fokozatosan lecsökkent a Remak-gangliont körülvevő mesenchymában, és az mRNS expressziója az enterális ganglionok területére lokalizálódott (15. ábra, C, kinagyított terület).

Összefoglalva eredményeink azt mutatják, hogy a *CXCR4* a Remak-ganglionban és az utóbélben a *CXCL12* expressziójával komplementer mintázattal fejeződik ki, és összefüggésben van az utóbél extrinsic beidegzésének kialakulásával.



14. ábra. A *CXCR4* kifejeződik a Remak-ganglionban és a plexus pelviciusban. A) A 6. embryonális napon (E6) a *CXCR4* erősen expresszálódik a velőcső ventrikuláris zónájában és a Remak-ganglionban. A', A'') Az E6 utóbél hármass jelölése *CXCR4 in situ* hibridizációval, P75 ganglionléc, valamint alfa-simaizom aktin (SMA) specifikus ellenanyaggal azt mutatja, hogy a *CXCR4* P75+ Remak-ganglionban expresszálódik, azonban a zsigeri simaizom nem fejezi ki a receptort. B-B'') A *CXCR4*, P75 és SMA festett E8 utóbél keresztmetszete a P75+ Remak-ganglionban erősen kifejeződő *CXCR4*-et mutat, ellentétben az enterális ganglionléc sejtekkel, ahol a plexus submucosus (smp) sejtjei P75+/CXCR4- fenotípussal jellemezhetők. C-C'') Az E10 korú farokbimbó sagittális metszetén a *CXCR4* mRNA intenzív expressziója figyelhető meg a Remak-ganglion distalis részén és a plexus pelviciusban. A C kép bekeretezett területe a C', C''-ben látható kinagyítva, P75 immunfestéssel. A méretarány az A képen található: A-A'') 350µm; B-B'') 120 µm; C) 370 µm; C', C'') 180 µm. ao, aorta; drg, dorsalis gyökér ganglion; E, embryonális nap; ep, utóbél epithelium; not, chorda dorsalis; nt, velőcső; NoR, Remak-ganglion; pr, proctodeum.



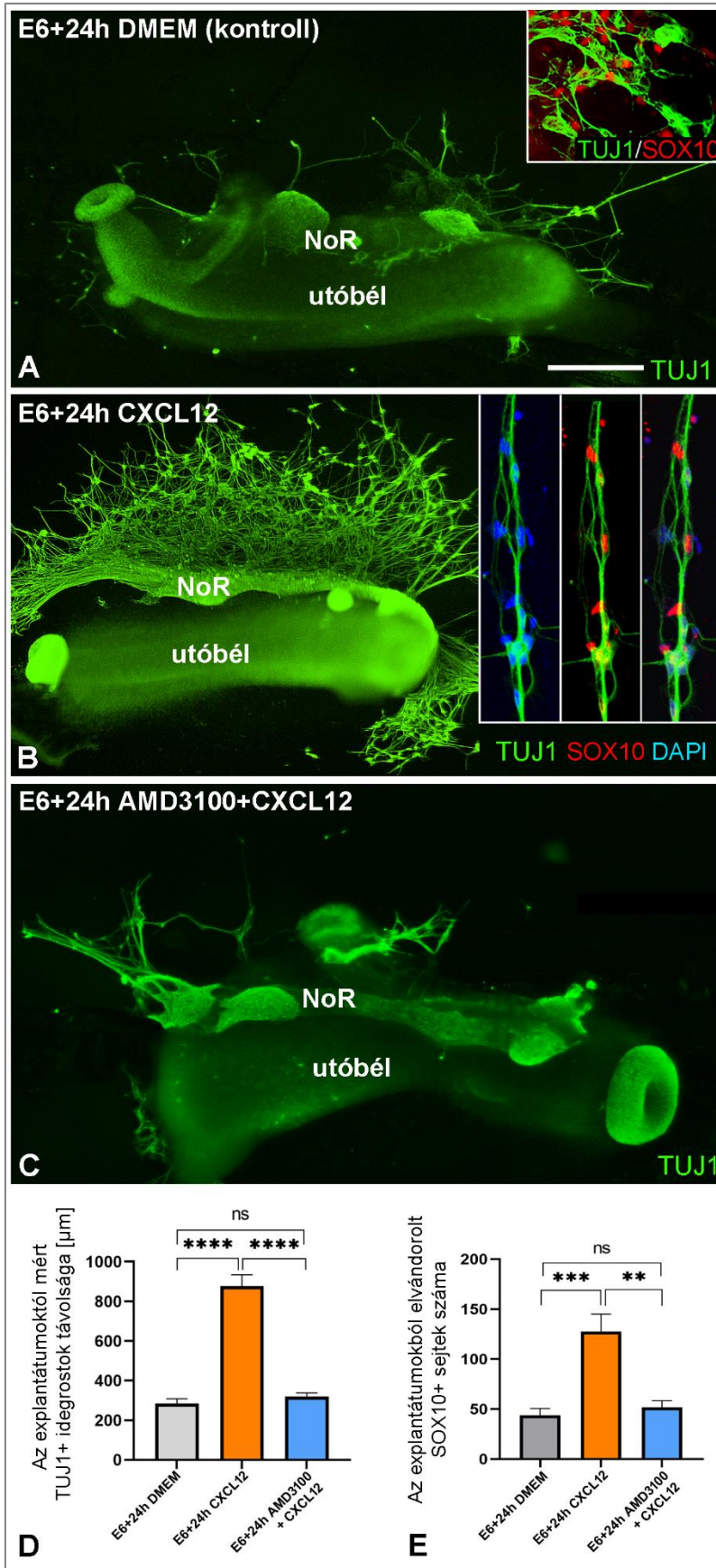
15. ábra: A CXCL12 mRNS expressziója fejlődő csirke utóbélben. A CXCL12 mRNS expresszióját A-A'') E6, B) E8 és C) E14 korú utóbélben vizsgáltuk. A) A Remak-ganglion körüli mesenchymában intenzív CXCL12 expresszió figyelhető meg. A'', B) Az E6 és E8 utóbél CXCL12 *in situ* hibridizáció és a P75 immunfluoreszcencia kettős jelölése szerint a CXCL12 kifejeződése nem érinti a P75+ Remak-ganglion területét. A', A'') A 6. embryonális napon a CXCL12 expresszió nem figyelhető meg az SMA+ muscularis régióban. B) Két nappal később már az epithelium és a simaizom is CXCL12+. C, bekeretezett terület) Az E14 korú utóbél CXCL12 *in situ* hibridizáció és P75 immunfluoreszcencia kombinált festése jelzi, hogy a CXCL12 az utóbélhamban és az enterális ganglionokban fejeződik ki. A méretarányt jelölő vonal az A képen található: A, A', A'') 250µm; B) 170 µm; C) 80 µm; C, bekeretezett terület) 50 µm. ao, aorta; E, embryonális nap; ep, utóbél epithelium; lmm, lamina muscularis mucosae; not, chorda dorsalis; nt, velőcső; NoR, Remak-ganglion; smp, plexus submucosus.

4.2.4. A CXCL12 elősegíti a Remak-ganglionból eredő neuritok növekedését *in vitro*.

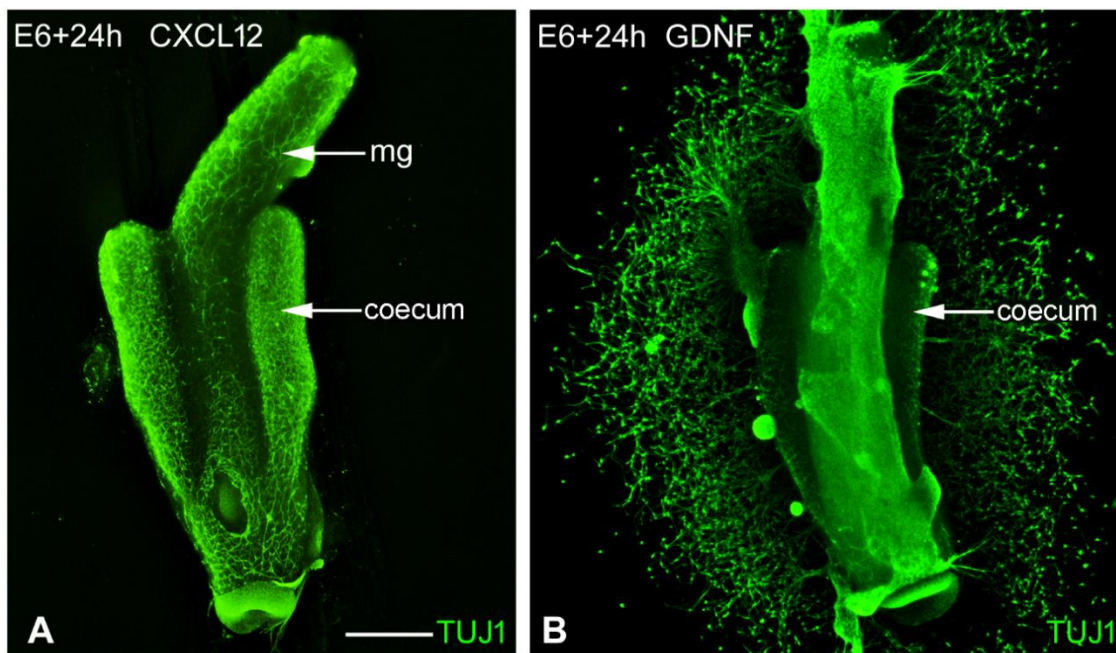
A közelmúltban rágszáló neuronokon végzett *in vitro* vizsgálatok szerint a CXCL12 részt vesz az idegrostok növekedésében és elágazásában (Bhardwaj et al., 2013; Hilla et al., 2021). A Remak-ganglion és a bélidegrendszer eredetű neuritok növekedésének tanulmányozásához 6 napos csirke középbél, coecum és utóbél szakaszokat tenyésztettünk fibronectinnel bevont felületen 24 órán keresztül

rekombináns CXCL12 fehérje hiányában (DMEM, 16. ábra, A) vagy jelenlétében (16. ábra, B). 100 ng/ml CXCL12 hozzáadása a tenyésztő médiumhoz erőteljes neurit növekedést eredményezett a Remak-ganglionból (16. ábra, B). Ezzel ellentétben a CXCL12 nem volt hatással a velőcső cervicalis szakaszából eredő intesztinális ganglionléc sejtek vándorlására (17. ábra, A), míg a glia eredetű növekedési faktor (GDNF) 10 ng/ml koncentrációban történő alkalmazása erőteljes sejt migrációt indukált a kiültetett bélszakaszból (17. ábra, B). A 200 μ M AMD3100 (CXCL12 antagonist) kezelés 100 ng/ml CXCL12 fehérjével kombinálva a Remak-ganglion eredetű axonhálózat kialakulásának gátlásához vezetett az utóbélben (16. ábra, C). A Remak-ganglionból származó neuritnövekedés és a ganglionléc sejtek migrációjának kvantitatív meghatározáshoz neuron specifikus TUJ1 és ganglionléc sejtekre jellemző SOX10 transzkripciós faktor immunfestéssel elemeztük a CXCL12 és az AMD3100 kezelt tenyészeteket, utóbelenként 4-5 adatpontot mérve (n=5 bél, kezelési csoportonként). A CXCL12 kezelés szignifikánsan nagyobb mértékű Remak-ganglion eredetű neurális kinövést indukált a fibronektinnel bevont felületre (16. ábra, B). Ebben az esetben az explantátumtól mért TUJ1+ idegrostok átlagos távolsága $876,50 \pm 57,09 \mu\text{m}$ volt, összehasonlítva a nem kezelt (DMEM, $284,10 \pm 23,41 \mu\text{m}$) és az AMD3100 ($319,50 \pm 17,99 \mu\text{m}$) kezelt idegrostok hosszával (16. ábra, D). A sejtszám vizsgálathoz minden bél esetében két darab, a Remak-ganglionra merőleges $300 \times 900 \mu\text{m}$ méretű területen kvantifikáltuk a kivándorolt SOX10+ sejt magokat. A CXCL12 kezelés hatására számottevően több ganglionléc eredetű sejt vándorolt ki a bélből ($127,7 \pm 17,33$), mint a kontroll ($43,66 \pm 6,878$), valamint az AMD3100 kezelt ($51,7 \pm 6,723$) tenyészetek esetében (16. ábra, E). A Remak-ganglionból kivándorolt SOX10+ sejtek, minden kísérletben a TUJ1+ idegrostok növekedésével jártak együtt (16. ábra, B, nagyított felvételek). Összehasonlítva a három csoportot, a kontroll (DMEM) és az AMD3100 reagenssel kezelt tenyészetekkel szemben, a CXCL12 kezelés szignifikánsan nagyobb számú és nagyobb távolságra elvándorló SOX10+ sejtet eredményezett (16. ábra, D, E).

In vitro kísérletes eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az exogén módon hozzáadott CXCL12 kemokin nagymértékű Remak-ganglion eredetű neurit növekedést eredményezett *in vitro* és a jelátvitel gátlása felfüggesztette az idegrostok projekciós képességét.



16. ábra: A CXCL12 intenzív idegrost kinövést indukál a csirke Remak-ganglionból *in vitro*. Az idegrostok növekedésének vizsgálatához E6 korú utóbeleket fibronektinnel bevont felületen tenyésztettük 24 órán keresztül **B**) Cxc12, **C**) Cxcl12+AMD3100 jelenlétében vagy **A**) hiányában. **B**) Az exogén CXCL12 fehérje hozzáadása jelentős TUJ1+ neurit kinövést indukált a Remak-ganglionból, amely **C**) folyamatot az AMD3100 erősen gátolta. A nagyított felvételeken SOX10 transzkripciós faktort hordozó ganglionléc sejtek láthatók a TUJ1+ idegrostok mentén. **D** és az **E** jelzésű ábrán a **D**) TUJ1+ rostok hosszát (µm) és az **E**) explantátumokból kivándorló SOX10+ sejtek számát kvantifikáltuk. A statisztikai analízist Kruskal–Wallis teszttel végeztük, posthoc Dunn-próbával kiegészítve. A szignifikancia szintek: ns: nem szignifikáns, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001. Az adatok az átlagértékeket mutatják (± standard hiba). A méretarányt jelölő vonal az **A** képen található: **A-C**) 400 µm; **A, B, bekeretezett terület**) 50 µm. **E**, *embryonális nap; NoR, Remak-ganglion.*



17. ábra. A CXCL12 nem kemoattraktáns a cervicalis velőcső eredetű enterális ganglionléc sejtekre. E6 korú középbél és a coecumot fibronectin felszínen tenyésztettük 24 órán keresztül **A)** 100 ng/ml CXCL12 vagy **B)** 10 ng/ml GDNF jelenlétében, majd teljes szöveti TUJ1 fluoreszcens festést végeztünk. A méretarányt jelölő vonal az **A** képen található: **A, B)** 200 μ m. *E, embryonális nap; mg, középbél.*

4.2.5. A CXCR4 jelátvitel gátlásakor nem alakul ki a bél extrinsic beidegzése

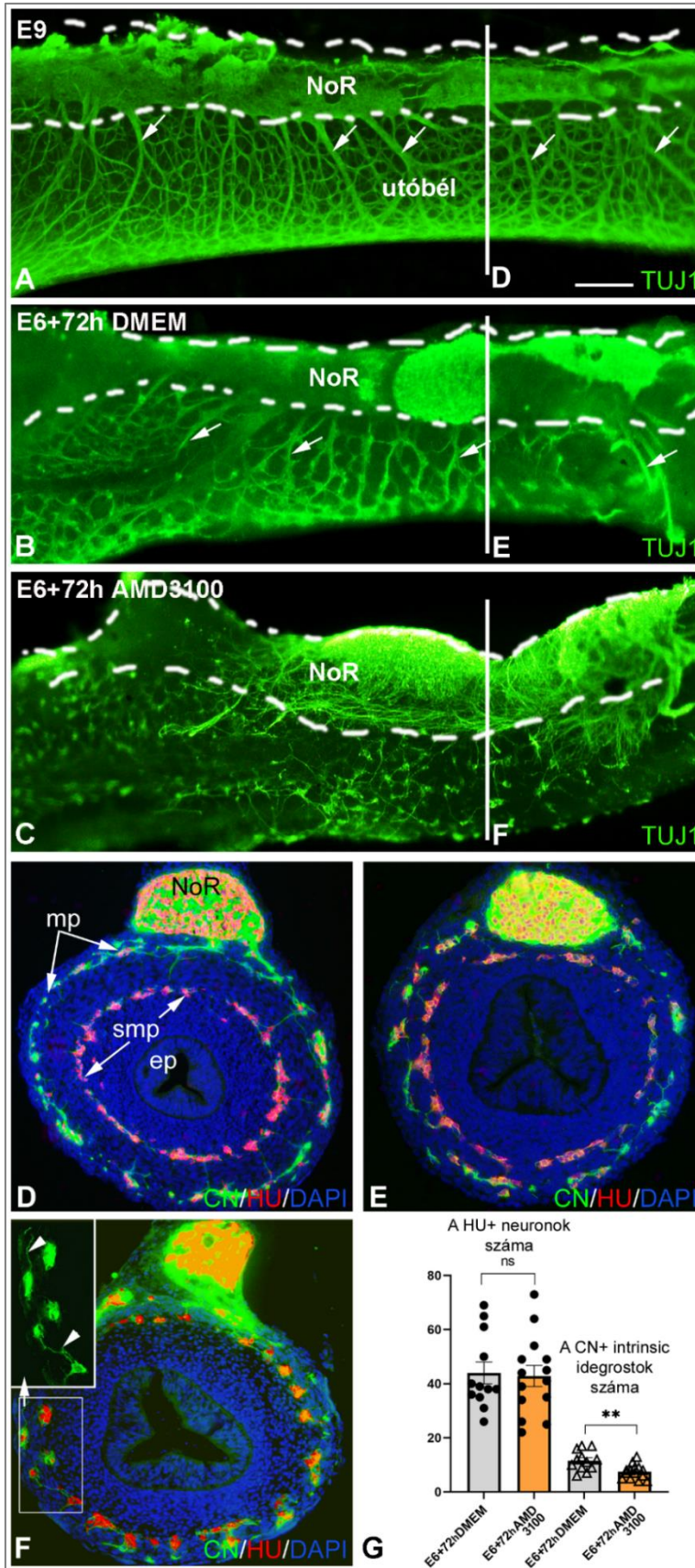
A CXCR4-CXCL12 jelátvitel vizsgálatának érdekében függesztett szervtenyészetekben vizsgáltuk a TUJ1 antigént expresszáló idegrostok fejlődését az utóbél külső beidegzésének kialakulása során. 6 napos (E6) csirke embryoból középbél, coecum és utóbél szakaszokat izoláltuk és 72 óráig tenyésztettük 200 μ M AMD3100 jelenlétében vagy hiányában (n=5 bél/kezelési csoport). A kontroll tenyésztési-körülmények között (E6+72h DMEM) tartott utóbélbe vándorolt enterális ganglionléc sejtek eloszlási mintázata a 9 napos (E9) embryonális stádiumhoz hasonlít (18. ábra, A), és TUJ1+ Remak-ganglion-eredetű külső idegrostok hatoltak a bélfalba (18. ábra, B, nyilak). Az AMD3100 hozzáadása nem zavarta meg az enterális ganglionléc sejtek migrációját (18. ábra, C), azonban gátolta az idegrostok Remak-ganglionból kiinduló projekcióját, ahogyan azt a TUJ1-et expresszáló rostok hiánya is mutatja (18. ábra, C).

A statisztikai elemzéshez minden csoportban megmértük az utóbelek teljes szöveti TUJ1 immunfestésein a láthatóvá tett Remak-ganglionból kiinduló idegrostjainak

tulajdonságait. Szignifikáns különbségeket találtunk a rostok számát, hosszát és vastagságát illetően: a 9 napos utóbél TUJ1+ idegrostjainak átlagos száma ($12,00 \pm 0,8367$) számottevően magasabb értékeket mutatott az AMD3100 inhibitorral kezelt utóbelekben mért adatokhoz ($7,00 \pm 0,8944$) képest, azonban nem különbözött szignifikánsan a kontroll DMEM tenyészetektől ($10,00 \pm 0,4082$). A Remak-ganglionból az utóbél faláig nyúló rostok átlagos hossza szignifikánsan csökkent az AMD3100-zal kezelt csoportban ($179,1 \pm 28,06 \mu\text{m}$), összehasonlítva a kontroll (E6+72h DMEM, $403,2 \pm 26,77 \mu\text{m}$) és az E9 napos ($499,2 \pm 29,32 \mu\text{m}$) utóbelekkel. Az inhibitor hatására a rövidebb rostok jelentősen vékonyabbak is voltak ($8,899 \pm 0,8527 \mu\text{m}$) az E9 korú ($31,86 \pm 1,113 \mu\text{m}$) és a kontroll (E6+72h DMEM, $29,86 \pm 4,214$) átlagos rostvastagsághoz viszonyítva.

A neuronspecifikus CN és HU immunfestések azt mutatják, hogy az intrinsic bélidegrendszer CXCR4 gátlás jelenlétében is zavartalanul fejlődik (18. ábra, D, E, F). Az plexusokat összekötő CN+ idegrostok, valamint a HU+ neuronok számának meghatározásához minden tenyésztési körülményben megmértük a HU+ sejtek és a CN+ plexusokat összekötő rostok számát. Abban az esetben, amikor AMD3100-at adunk a tápoldathoz, azt tapasztaltuk, hogy a HU+ sejtek kolonizálják a teljes utóbelet (18. ábra, F); a HU+ sejtek számában a kontroll (E6+72h DMEM, $44,00 \pm 4,02$) és az AMD3100 ($42,86 \pm 3,89$) kezelés között nem volt mérhető különbség. Ezzel szemben a CN+ idegrostok száma szignifikánsan csökkent a AMD3100-zal kezelt utóbelekben ($7,43 \pm 2,59$) az E6+72h DMEM kontroll tenyészetekhez képest ($11,58 \pm 3,76$) (18. ábra, G).

Összefoglalva, a CXCR4-CXCL12 jelátvitel zavara jelentősen gátolja az utóbél extrinsic rostjainak kialakulását *ex vivo*, azonban a cervicalis velőcső eredetű enterális ganglionléc sejtek migrációját nem befolyásolja.



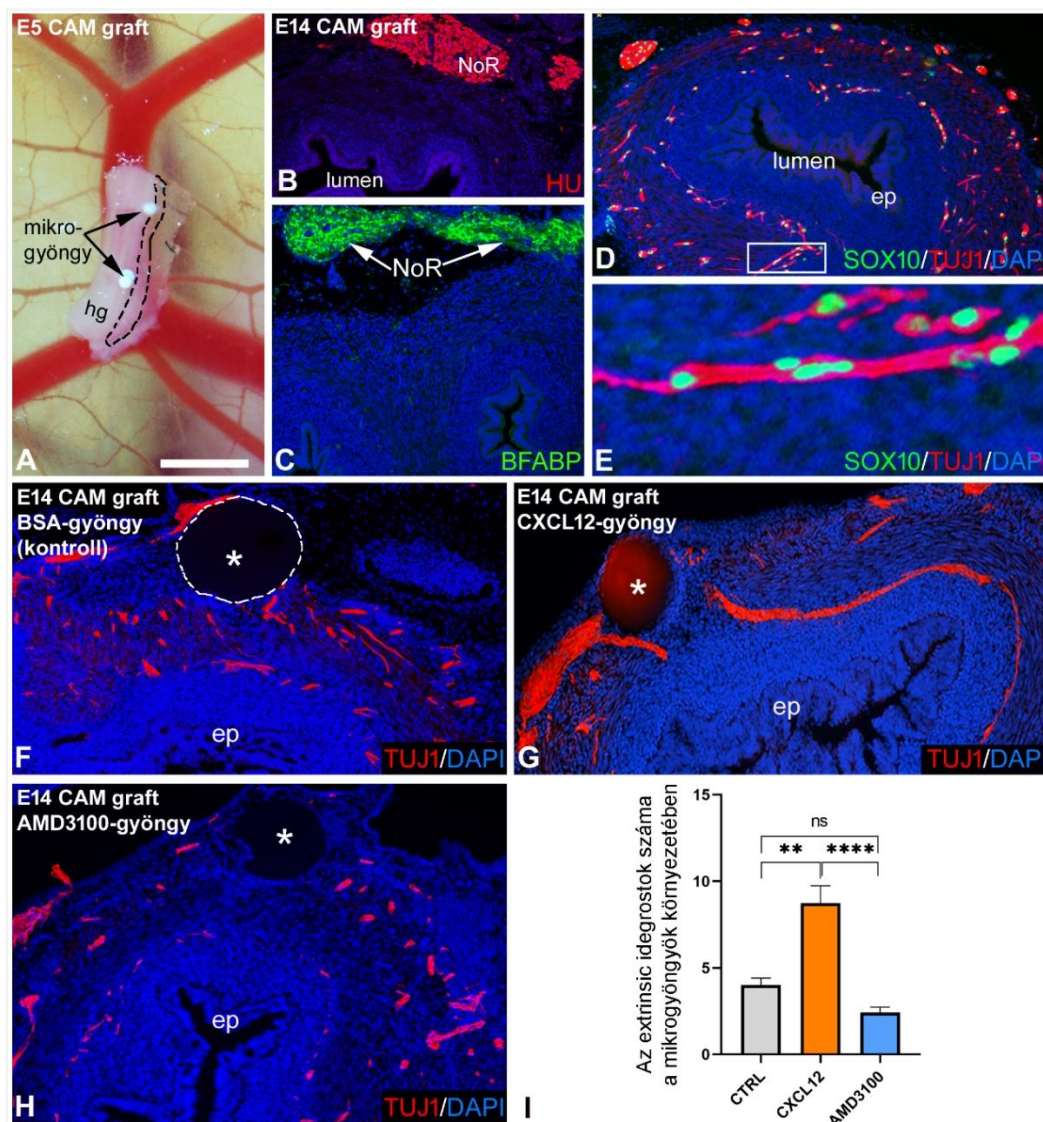
18. ábra: A CXCR4-CXCL12 jelátvitel gátlása az utóbél külső beidegzésének zavarát eredményezi. A kísérlet során 6 napos csirke embryo utóbélét izoláltuk, majd függesztett szervtenyészetben tartottuk 72 órán keresztül **B)** DMEM vagy **C)** AMD3100 jelenlétében. **A)** A 9 napos csirke embryo utóbélének teljes szöveti TUJ1 immunfluoreszcens jelölése számos idegrostot (nyílak) mutat, amelyek a Remak-ganglionból a bélfalba projektálódnak. A Remak-ganglion határát fehér szaggatott vonal jelöli az **A**, **B** és **C** képen. **C)** Az AMD3100 kezelés blokkolta az utóbél Remak-ganglion eredetű extrinsic beidegzését. Az **A**, **B**, **C** képeken az ábrázolt szintekből (függőleges vonalak) vett keresztmetszeteken HU+ perikaryonok és CN+ neuronhálózat látható az **D)** E9 korú, a **E)** DMEM kontroll és az **F)** AMD3100 kezelt utóbelekben. **F**, **nyílhegyek a bekeretezett területen)** A bélfalból kiinduló CN+ idegrostok kötik össze az enterális plexusokat. **F)** Az AMD3100 inhibitor jelenlétében, a HU+ sejtek képesek a teljes utóbél kolonizációjára. A myentericus és plexus submucosusok közötti CN+ rostok mennyiségének és a HU+ enterális neuronok számának átlagát a **G** ábrán mutatjuk be. **G)** A statisztikai analízishez Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk post-hoc Dunn-teszttel kiegészítve. A szignifikancia szintek mértéke: ns: nem szignifikáns, ** $P < 0,01$. Az adatok az átlagokat (\pm standard hiba) mutatják. A méretarányt jelölő vonal az **A** képen található: **A**, **B**, **C**) 200 μ m; **D**, **E**, **F**) 100 μ m; **F** bekeretezett terület) 30 μ m. **Rövidítések:** *E*, embryonális nap; *ep*, utóbél epithelium; *mp*, plexus myentericus; *NoR*, Remak-ganglion; *smp*, plexus submucosus.

4.2.6. A CXCL12 chemoattraktáns faktorként hat az extrinsic idegrostokra *ex vivo*

CXCL12-vel, AMD3100-zal vagy BSA-val (szarvasmarha szérum albumin, kontroll) bevont 70-100 μm átmérőjű heparingyöngyöket ültettünk 5 napos (E5) ganglionmentes utóbelek falába, amelyek tartalmazták a Remak-gangliont, majd a graftokat E9 korú csirke chorioallantois membránján (CAM) tenyésztettük (n=5/kezelési csoport). (19. ábra, A). A gyöngyök beültetése előtt a coecumot és a cloacát eltávolítottuk, így kizártuk a cervicalis és a lumbo-sacralis ganglionléc sejtek kolonizációját. A 9 napos CAM inkubációt követően a transzplantált vastagbelek sorozatmetszeteiben vizsgáltuk a bélidegrendszer és a külső idegrostokat. A CAM graftban normál simaizomréteg és Remak-ganglion alakult ki minden esetben, azonban az enterális ganglionok hiányoztak (19. ábra, B, C). Míg az immunfestés HU+ neuronokat (19. ábra, B) és BFABP+ gliasejteket (19. ábra, C) mutat a bélfalon kívül, addig a bélben nem találhatóak intrinsic neuronok vagy gliasejtek. A bélidegrendszer hiányának ellenére a TUJ1+ rostok jelenléte a graftokban (19. ábra, D) a Remak-ganglion eredetét bizonyítja. A SOX10 és TUJ1 kettős immunfluoreszcenciája az idegrostokhoz kapcsolódó SOX10+ sejteket mutatott ki (19. ábra, D, E).

Az 30 μm -nél nagyobb átmérőjű extrinsic idegrostok száma jelentősen megnőtt a fejlődő Remak-ganglion közelében elhelyezett 20 $\mu\text{g/ml}$ CXCL12-vel bevont gyöngyök környezetében (19. ábra, G), a 0,1% BSA-val (19. ábra, F) vagy a 1 mM AMD3100-zal (19. ábra, H) kezelt gyöngyökhöz viszonyítva. Az AMD3100 inhibitor lokális alkalmazása nem zavarta meg a bélfal fejlődését, viszont gátolta a külső idegrostok képződését, ahogyan azt a gyöngyök körüli TUJ1-et expresszáló neurális nyúlványok alacsony száma is mutatta (19. ábra, H). A CXCL12, AMD3100 és BSA gyöngyökkel kezelt utóbelekben kvantifikált idegrostok átlagos számát a 19. ábra, I szemlélteti. A TUJ1+ rostsűrűség szignifikánsan magasabb volt a CXCL12-gyöngyök mellett ($8,750 \pm 0,9857$), összehasonlítva a kontroll ($4,00 \pm 0,4082$) vagy az inhibitorral átítatott gyöngyök környezetével ($2,417 \pm 0,3128$), amely utóbbi két csoport értékei között nem volt szignifikáns eltérés. A CXCL12-gyöngy beültetését követően a gyöngy közelében lévő TUJ1+ idegrostok vastagsága jelentősen megnőtt: a CXCL12-gyöngyök körüli átlagos vastagság $20,44 \mu\text{m}$ ($\pm 3,28$), míg a kontroll gyöngyök körüli: $11,50 \mu\text{m}$ ($\pm 2,57$), az AMD3100-zal bevont gyöngyök mellett $9,9 \mu\text{m}$ ($\pm 2,58$) volt.

Összefoglalva, eredményeink azt mutatják, hogy a CXCL12-CXCR4 jelátvitel szükséges a Remak-ganglion-eredetű külső rostok kialakulásához az utóbélben.



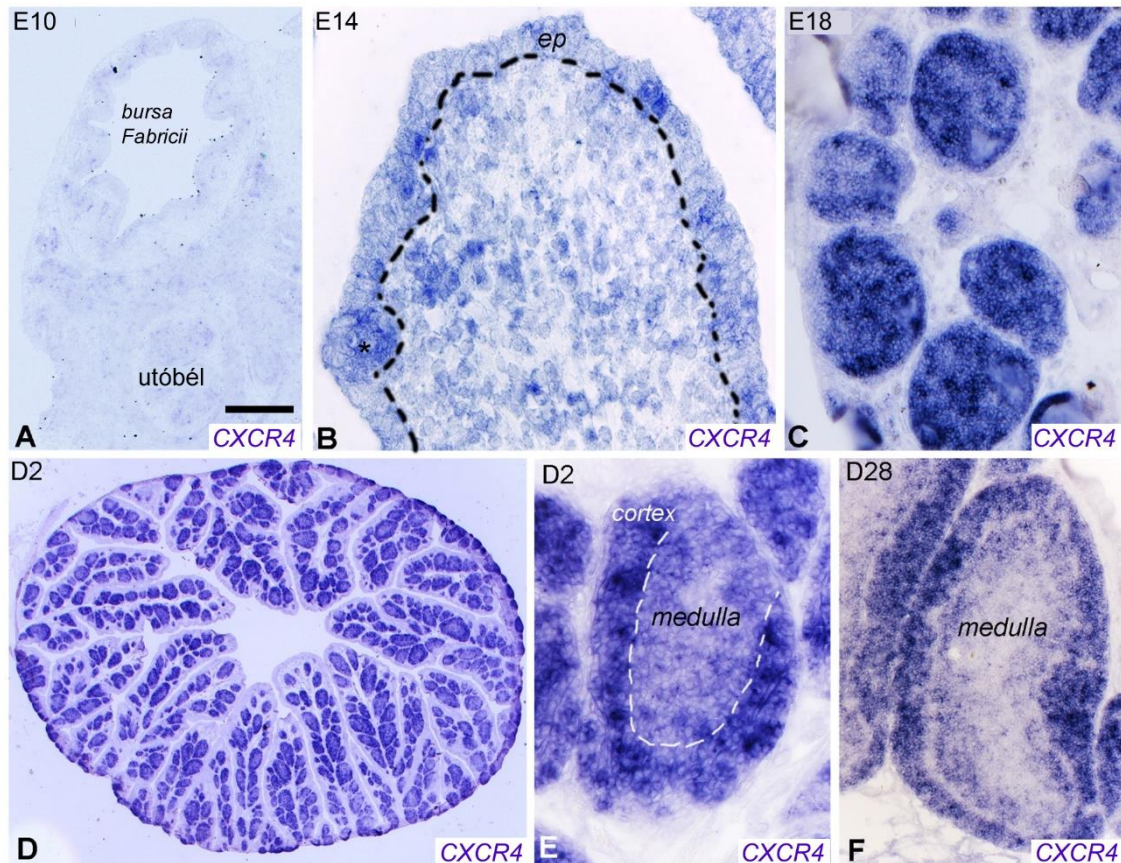
19. ábra: A megnövekedett CXCL12 koncentráció hypertrophias axonképződést indukál a fejlődő utóbélben. A kísérletben **G**) CXCL12, **H**) AMD3100 és **F**) BSA oldatban áztatott heparin mikrogyöngyöket ültettünk E5 korú csirke embryoból izolált ganglionmentes utóbelek falába a Remak-ganglion közelébe, és a gyöngyöket tartalmazó beleket (graft) E9 stádiumú csirke chorioallantois membránján (CAM) tenyésztettük 9 napig. **A**) szaggatott vonalak jelölik a Remak-ganglion határát. A 14 napos kontroll CAM graft immunfestése **B**) HU+ neuronokat és **C**) BFABP+ gliasejteket mutat a Remak-ganglionban, azonban a bélfalon belül nem találhatóak meg ezek a sejtípusok. **D**, **E**) TUJ1 immunfestéssel számos neuronális rost található a graft keresztmetszetében, a SOX10+ sejtekkel asszociáltan. A **D** kép bekeretezett területe az **E** ábrán látható kinagyítva. A **G**) CXCL12 lokális alkalmazásának eredményeként a külső rostok száma jelentősen megnőtt az **H**) AMD3100 vagy **F**) BSA-kezelt kontroll gyöngyök hatásához képest, a kvantifikált adatokat az **I** ábra szemlélteti. A statisztikai elemzéshez Kruskal–Wallis tesztet alkalmaztunk posthoc Dunn tesztel. A szignifikancia szintek: ns: nem szignifikáns, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$. Az oszlopdiaagram átlag (\pm standard hiba) adatokat mutat. A méretarányt jelölő vonal az **A** képen található: **A**) 600 μm ; **B**, **C**, **D**) 150 μm ; **E**) 60 μm ; **F**, **G**, **H**) 100 μm . CAM: chorioallantois membrán, hg: utóbél, NoR: Remak-ganglion; E, embryonális nap; ep, utóbélhám.

4.3. A CXCR4-CXCL12 expressziójának elemzése a bursa Fabricii fejlődésében részt vevő sejt vándorlási folyamatokban

4.3.1. CXCR4 mRNS lokalizációja a bursa Fabricii fejlődése során

A fejlődő csirke embryo utóbelének részletes *in situ* hibridizációs és immuncitokémiai elemzése során megfigyeltük, hogy az utóbélhez asszociált primer nyirokszervben, a bursa Fabricii-ben a B-sejtek fejlődése idején kifejeződik a *CXCR4* receptor. Kutatócsoportunk több évtizede foglalkozik a primer és szekunder nyirokszervek embryonális fejlődésével (Oláh & Nagy, 2013; Nagy et al., 2016b; Dora et al., 2017; Nagy et al., 2022; Fejszák et al., 2022). Az utóbélhez asszociált nyirokszervek (bursa Fabricii; coecalis tonsilla) lymphomyeloid sejtjeinek karakterizálása olyan makrofág populáció felfedezését tette lehetővé, amely a bélidegrendszer ganglionjaiban található és a nyirokszervek szöveti makrofágjaihoz hasonlít (Dora et al., 2018; 2021). Korábbi *in vitro* és FACS (fluorescence-activated cell sorting) analízisek szerint a B-sejt prekurzorok bursába való belépése előtt *CXCR4*-et fejeznek ki és a *CXCR4* később a B-sejtek perifériára történő emigrációjában is fontos szerepet játszik, ami azt mutatja, hogy a lymphocyták nyirokszervek közötti migrációjának molekuláris szabályozása evolúciósan konzervált az emlősök és a madarak között (Laparidou et al., 2020). PhD munkám második részében ezért a *CXCR4* receptor expresszióját *in situ* hibridizációs technika és immuncitokémia módszerek ötvözésével követtük nyomon.

A bursa Fabricii ontogenezise során az első, *CXCR4 in situ* hibridizációval kimutatható sejtek a 10. embryonális napon (E10) detektálhatók a bursa előtelepének hám alatti mesenhymájában (20. ábra, A). A következő fejlődési stádiumban (E14) a *CXCR4*+ sejtek a bursa mesenchymáján kívül, a fejlődő folliculusbimbókban is azonosíthatók (20. ábra, B). A 18. embryonális napra (E18) a *CXCR4* mRNS-ének kifejeződése felerősödik a folliculusbimbók területén a nagyszámban jelen lévő B-sejtek miatt (20. ábra, C). A kikelés környékén a *CXCR4 in situ* hibridizációs jelöléssel már jól elkülöníthető a folliculusok kéreg- és velőállománya, viszont a velőállomány halványabb jelölést mutat (20. ábra, D, E). A kikelést követő 28. napra (D28) a *CXCR4* jel főként a folliculusok kéregállományi területén válik kifejezettebbé (20. ábra, F).



20. ábra. A CXCR4 expressziós mintázata a bursa Fabricii ontogenezise során. A CXCR4 receptor transzkriptumát *in situ* hibridizációs eljárással mutattuk ki. **A)** A 10. embryonális napon (E10) a bursa előtelepe az utóbélhez asszociáltan elhelyezkedő, a farokbimbó mesenchymája által körülvevett, hólyagos szerkezetű képlet, amelyben csak elvétve található CXCR4+ sejt. **B)** Az E14. napon a CXCR4 pozitív sejtek a fejlődő folliculusbimbókban (csillag) lokalizálódnak. **C)** E18-ra a CXCR4 tartalmú folliculusbimbók száma tovább nő. **D)** A kikelés idején a bursa keresztmetszeti képén nagyszámú CXCR4+limfoid folliculus látható, **E)** a CXCR4 receptort kifejező sejtek a két napos kikelt csirke (D2) bursalis cortexében jelentős mértékben feldúsulnak (szaggatott vonal jelzi a cortico-medullaris határt). **F)** A kikelést követő 28. napon (D28) a bursai folliculusok kéregállománya erős CXCR4 pozitívitással jellemezhető. A méretarányt jelölő vonal az A képen található: **A)** 400 μm ; **B)** 50 μm ; **C)** 130 μm ; **D)** 70 μm ; **E)** 100 μm ; **F)** 200 μm . *E*, embryonális nap; *ep*, bursa epithelium; *D*, kikelés után eltelt napok száma.

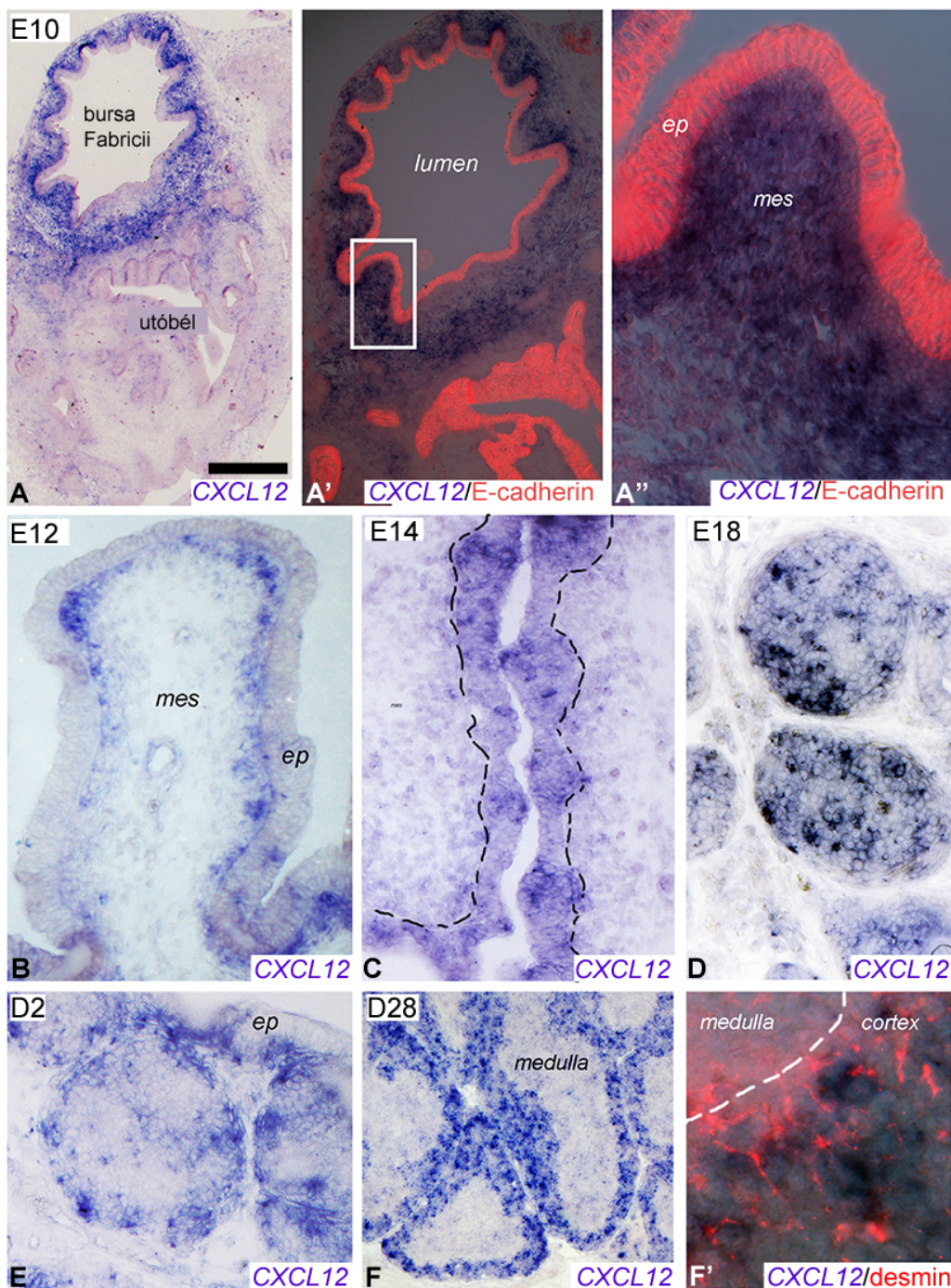
4.3.2. CXCL12 mRNS expressziója a bursa Fabricii különböző fejlődési stádiumaiban.

A CXCR4 receptor mRNS-ének kifejeződésével párhuzamosan megvizsgáltuk a receptor ligandjának, a CXCL12 mRNS-ének bursa Fabricii-n belüli megjelenését is. A 10. embryonális napon a CXCL12 kiterjedt expressziót mutatott a bursa előtelep hám alatti mesenchymális részében a (21. ábra, A-A’). A 12-14.. embryonális napra a CXCL12 kifejeződése a fejlődő folliculusbimbók területére korlátozódott (21. ábra, B, C). A 18.

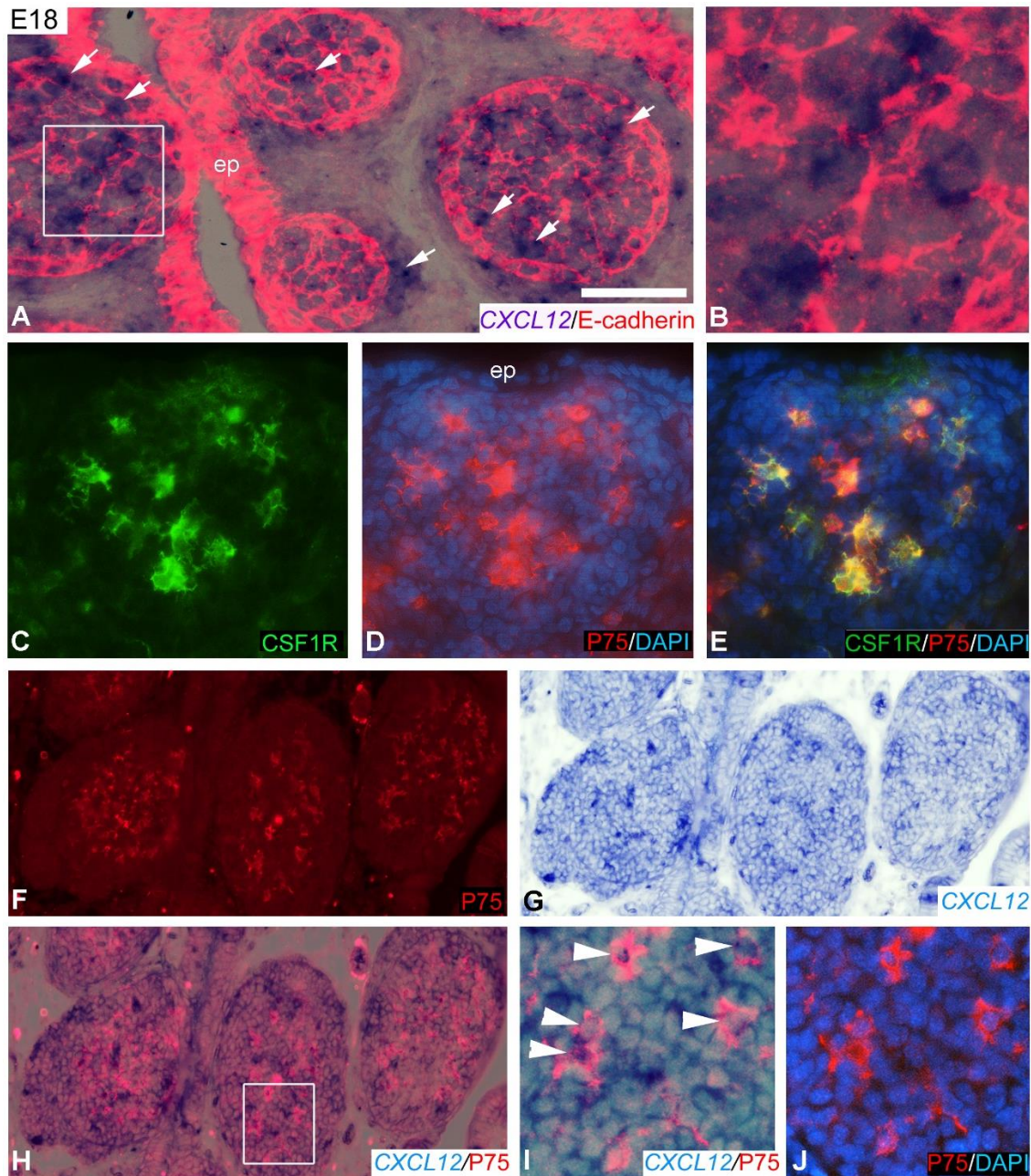
embryonális napon a mesenchymális expresszió szinte teljesen eltűnt és a *CXCL12* pozitivitás az egyre nagyobb számban megjelenő folliculusbimbókra volt jellemző (21. ábra, D). Kikelés után, a bursai folliculusok kéregállományának differenciálódásával párhuzamosan, a *CXCL12* jel a folliculusok külső részén kondenzálódott (21. ábra, E). A kikelést követő 28. napon, a *CXCL12* transzkriptum az érett bursai folliculusok kéregállományában volt jelen (21. ábra, F, F'), ahol expressziója a desmin pozitív mesenchymális reticulum sejteket jellemezte (21. ábra F').

Korábbi publikációk (Nagy et al., 2004; Dora et al., 2017) beszámoltak arról, hogy a kolónia stimuláló faktor 1 receptort (CSF1R) kifejező bursai szekréciós dendritikus sejtek (BSDC) megjelenése megelőzi a B-sejtek belépését a fejlődő folliculusokba, így arra voltunk kíváncsiak, hogy a BSDC sejtek szolgálhatnak-e a *CXCL12* forrásaként (22. ábra, A, B). Az E18 stádiumú bursa metszeteken végzett kettős immuncitokémiai jelöléssel igazoltuk, hogy a CSF1R+ BSDC sejtek (22. ábra, C) kifejezik a P75 antigént is (22. ábra, D, E), amely azért volt számunkra fontos, mert ellentétben a CSF1R ellenanyaggal, a P75 jól alkalmazható az *in situ* hibridizációt követően a BSDC sejtek kimutatására. A BSDC specifikus P75 antigén immuncitokémiai (22. ábra, F, J) és a *CXCL12* transzkriptum *in situ* hibridizációs jelölésével (22. ábra, G) igazoltuk, hogy a késői embryogenezis során (E18) a CSF1R+/P75+ BSDC-k expresszálják a *CXCL12* mRNS-ét (22. ábra, H, I). A velőállományi BSDC sejtek *CXCL12* expressziója csak átmeneti folyamat, amelyet a kikelést követően a kéregállományi desmin pozitív mesenchymális retikuláris sejtek vesznek át (22. ábra F').

Összefoglalva, a *CXCR4* expressziója komplementer módon a *CXCL12* ligand kifejeződését követi az embryonális és a kikelést követő fejlődési stádiumokban. Az a megfigyelés, hogy a *CXCL12* expressziós mintázata korlátozott, és idővel változik, ahhoz a hipotézishez vezetett, hogy a *CXCL12* fontos szerepet játszik a B-sejt vándorlás minden szakaszában, beleértve a bursa előtelepének kolonizációját (első migrációs lépés), a folliculus bimbókba történő homingot (második migrációs lépés), majd a B-sejtek cortex területére lépésével a folliculusokban kialakuló kéreg és velőállomány elválását (harmadik migrációs lépés) is támogatja.



21. ábra. A *CXCL12* expressziója a bursa Fabricii fejlődése során. A különböző fejlődési stádiumokból készült bursa Fabricii metszetek *CXCL12 in situ* hibridizációját immuncitokémiával kombináltuk. **A-A'')** A 10. embryonális napon (E10) a subepiteliális mesenchyma erősen *CXCL12* pozitív. **B)** A 12. napos embryóban (E12) a *CXCL12* közvetlenül az epithelium alatt mutatható ki, ami **C)** a 14. embryonális napra már a fejlődő folliculusbimbók területén jelenik meg (szaggatott vonal jelzi az epithelium alatt húzódó basalis membránt). **D)** Kikelés előtt (E18) a kialakuló folliculusbimbók nagy mennyiségben termelik a *CXCL12*-t. **E)** A kikelést követő 2. napon (D2) a differenciálódó cortex területére korlátozódik a *CXCL12* expresszió, amely **F)** a kikelés utáni 28. napra válik egyértelművé, amikor **F')** a kéregállományi desmin pozitív retikuláris sejtek *CXCL12* mRNS-t fejeznek ki (a szaggatott vonal a cortico-medullaris határt jelöli). A méretarányt jelölő vonal az A képen található: **A)** 300 µm; **A')** 200 µm; **A'')** 60 µm; **B)** 100 µm; **C, D, E)** 80 µm; **F)** 150 µm; **F')** 40 µm. *E*, embryonális nap; *ep*, epithelium; *D*, kikelés utáni napok száma; *mes*, mesenchyma.



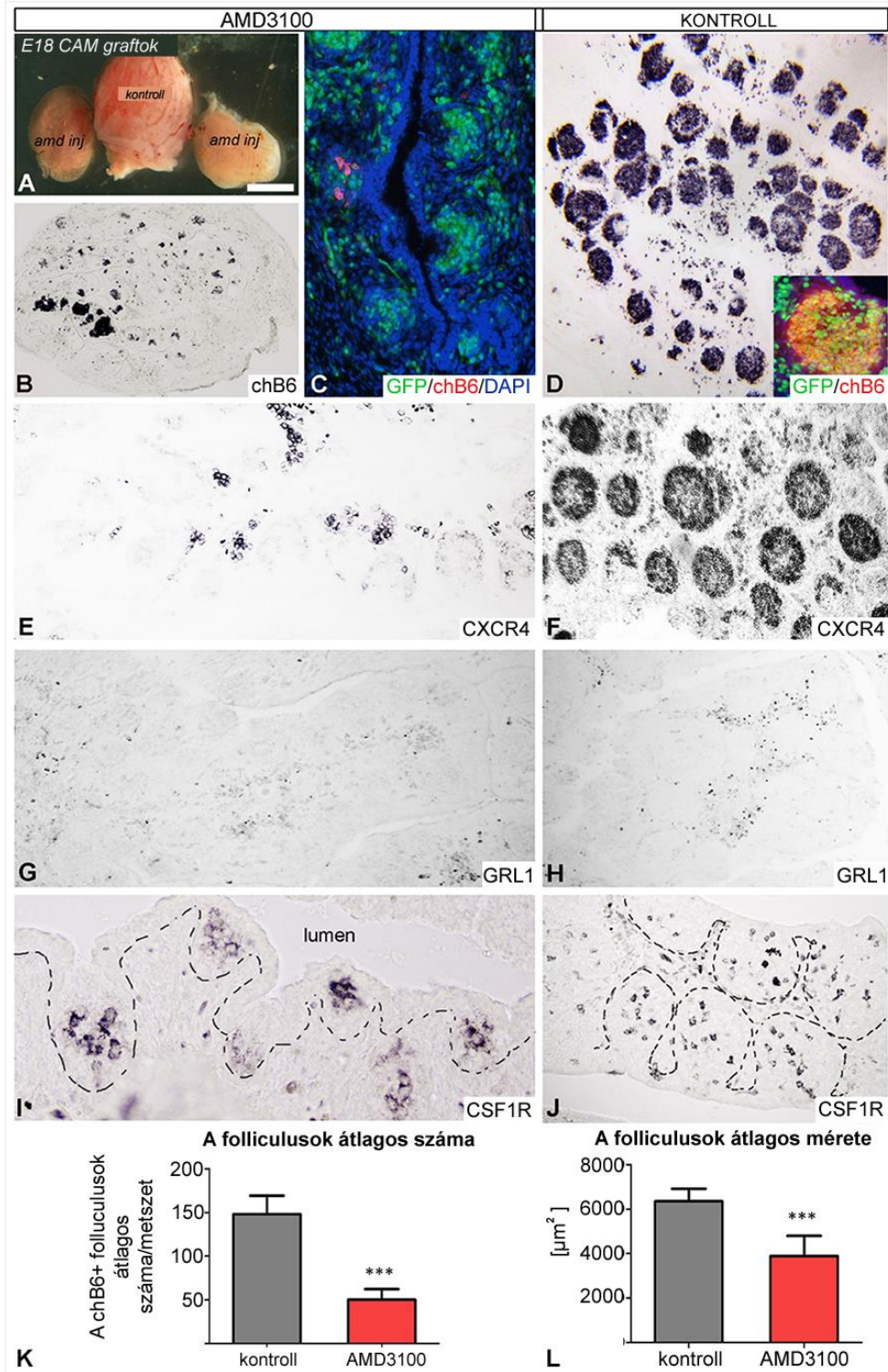
22. ábra. A *CXCL12* elsődleges forrása a bursai dendritikus sejtek (BSDC) és a cortikális mesenchymális sejtek. A *CXCL12*-t termelő sejteket *in situ* hibridizáció és fluoreszcens immunfestés együttes alkalmazásával karakterizáltuk a 18 napos (E18) embryonális bursa metszeteken. **A, B)** Az epitheliális eredetű E-cadherin immunpozitív hámretikulum sejtek nem vesznek részt a *CXCL12* termelésében (nyilak). **C)** A CSF1R-t hordozó BSDC-k kifejezik a **D, E)** P75 antigént is. **F)** A P75+ BSDC-k a 18 napos bursa velőállományában helyezkednek el és **G)** a *CXCL12* mRNS is a BSDC sejtekben detektálható. A **H)** kép a *CXCL12* *in situ* hibridizációs jel és a P75 immunreaktivitás együttes jelenlétét mutatja a BSDC sejteken. Az **I** és **J** képek a **H** kép bekeretezett területének kinagyított felvételei, ahol a *CXCL12*+P75+ BSDC sejteket mutatja. A méretarányt jelölő vonal az **A** képen található: **A, C, D, E)** 80 μ m; **B)** 25 μ m; **F, G, H)** 75 μ m; **I, J)** 40 μ m. *E, embryonális nap.*

4.3.3. A CXCR4-CXCL12 jelátvitel funkciója a bursa Fabricii fejlődésében

In vitro vizsgálatok szerint a CXCL12 kemoattraktáns hatást fejt ki a csirke B-sejtek vándorlására. Annak bizonyítására, hogy *ex vivo* a CXCR4+ bursai B-sejtek migrációját a CXCL12 kemokin irányítja, embryomanipulációs vizsgálatokat végeztünk. A kísérlet során először normál 9 napos csirke embryóból izoláltuk a bursa telepét. Ez a stádium a B-sejtes kolonizáció előtti fejlődési szakasz. Ezután sztereomikroszkóp alatt mikroinjektor segítségével 1 μ l 200 μ M AMD3100 oldatot juttattunk a bursa mesenchymába. Az injektált bursakezdeményeket 9 napos zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) expresszáló, transzgenikus csirke embryok chorioallantois membránjára (CAM) transzplantáltuk és további 9 napig tenyésztettük. Az inkubációs idő alatt a kiültetett szervek vaszkularizálódtak és a szerveket a fogadó GFP+ embryo vérképző őssejtjei kolonizálták.

Az izolált graftok komparatív elemzése az AMD3100-kezelt bursák jelentősen kisebb méretét mutatta a kontrollhoz viszonyítva (23. ábra, A.). Míg a kontroll csoportokban (PBS injektált) az anti-chB6 (23. ábra, D), illetve az anti-CXCR4 ellenanyaggal (23. ábra, F) a B-sejteket tartalmazó folliculusbimbók homogéneen jelölődtek, addig az AMD3100 nagy mértékben gátolta a folliculusok kifejlődését (23. ábra, B, C, E), amelyekben csak néhány elszórt chB6+ sejt (23. ábra, B), illetve CXCR4+ sejt (23. ábra, E) volt látható. A donor szervezetből bevándorló sejteket GFP fluoreszcenciájuk alapján azonosítottuk. A kontroll és a kezelt bursákat is nagyszámú GFP pozitív sejt népesítette be, azonban az AMD3100-injektált szervekben csak kevés GFP+ sejt hordozta a chB6 antigént is (23. ábra, C). A CXCR4 immunpozitív sejtek eloszlása hasonló volt az anti-chB6 festéshez: kisszámú intrafolliculáris CXCR4 pozitív sejtet azonosítottunk az AMD3100-injektálás után (23. ábra, E). A kvantitatív elemzés (n=6 bursa/kezelési csoport, n=6 metszet/bursa) szerint több, mint 60%-os csökkenést figyeltünk meg a folliculusok átlagos számában (23. ábra, K), és az AMD3100 injektált bursákban megmaradt folliculusok 40%-kal voltak kisebb méretűek a kontroll bursákhoz képest (23. ábra, L, n=6). A CXCR4-CXCL12 szignalizáció gátlása nem befolyásolta a granulopoesist (23. ábra, G, H) és dendritikus-prekursorok bevándorlását a folliculusbimbókba, mivel számos GRL1+ sejt volt jelen a graftokban, illetve a CSF1R festés nyúlványos immunreaktív sejteket mutatott ki a vizsgált folliculusokban (23. ábra, I, J).

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a CXCR4–CXCL12 jelátvitel gátlása megakadályozta a B-sejt prekursorok bevándorlását a folliculusbimbókba, ami B-sejtmentes folliculusok kialakulásához vezetett, és a bursa Fabricii csökevényes fejlődését idézte elő.



23. ábra. A CXCR4-CXCL12 jelátvitel blokkolása a bursa Fabricii B-sejtes kolonizációját gátolta. E9 bursa Fabricii kezdeményeket injektáltunk AMD3100-zal (AMD inj.) vagy kontrollként, PBS-oldattal, majd 9 napos zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) expresszáló csirke embryo chorioallantois membránjára (CAM) ültettük és 9 napig tenyésztettük a kiméra szerveket, majd **B-J**) chloronaphtolos és fluoreszcens immuncitokémiát végeztünk. **A**) A CXCR4 jelátvitel blokkolása AMD3100 kezeléssel a bursa méretének és **B**) lymphoid folliculusok képződésének csökkenését eredményezte, amelynek oka, hogy **B, C, E**). kisszámú chB6+/CXCR4+/GFP+ B-sejt kolonizálta a fejlődő folliculusbimbókat **D**) A kontroll bursa jól fejlett lymphoid folliculáris szerkezetet mutat, amelyekben chB6+ és **F**) CXCR4+ B-sejtekkel kolonizált folliculusok detektálhatók. **G**) A folliculusok között elszórtan GRL1+ granulocyták a kezelt és **H**) a kontroll csoportban is jelen vannak. **I**) A CSF1R+ dendritikus sejt prekursorok képesek voltak megtelepedni a felszíni hámban és folliculus képződést indukáltak az AMD3100 kezelt és **J**) a kontroll szervekben egyaránt (szaggatott vonal jelzi felszíni epithelium alatt majd később a cortico-medullaris határon húzódó basalis membránt). **K**) Az AMD3100 *ex vivo* hatásainak kvantitatív meghatározásához megmértük a chB6 antigént expresszáló (kolonizált) folliculusok méretét és **L**) számát. Az AMD3100-kezelt szervekben az „üres” kezdetleges folliculusok közül csak azokat tekintettük folliculusbimbónak, ahol a chB6+ sejtek epitheliumhoz kapcsolódó aggregátumai legalább 5 db sejtet tartalmaztak. A statisztikai elemzéséhez ANOVA T- tesztet használtunk, az adatok az átlagértékeket mutatják (\pm standard hiba). A szignifikancia szint mértéke: *** $P < 0,001$. A méretarányt jelölő vonal az **A** képen található: **A**) 300 μm ; **B, D**) 80 μm ; **C**) 50 μm ; **E, F, G, H, J**) 70 μm ; **I**) 40 μm . *amd*, AMD3100; *CAM*, chorioallantoris membrán; *E*, embryonális nap; *inj*, injektált.

5. MEGBESZÉLÉS

Az organogenezist célzó kutatások kardinális pontja a sejtváándorlási folyamatokat irányító molekuláris szabályozások feltárása, amelyek zavarai több szervrendszert érintő fejlődési defektusokat okozhatnak a születés előtti és utáni időszakban. Az embryóban az egyik legintenzívebb sejt migrációs tevékenységet a ganglionléc sejtek és a lymphocyták végzik, amelynek populációi az utóbél területén igen közel kerülnek egymáshoz és különböző, egymáshoz asszociált szervek kialakulásához járulnak hozzá. A vándorlás központi irányítása a CXCL12 kiemokin és receptorának (CXCR4) térben és időben precízen elválasztott expressziója által meghatározott.

Magzatburkos embryókban az utóbél beidegzésének neuronokból és gliasejtekből álló komplex hálózata különböző forrásokból származik. A bélidegrendszer jelentős részét a velőcső cervicalis szakaszából delaminálódó ganglionléc sejtek adják, amelyek belépnek az előbél mesenchymájába, caudális irányba vándorolnak egészen a cloacaig, ahol enterális neuron- és glia fenotípust vesznek fel (első vándorlási lépés; Yntema & Hammond, 1954; Le Douarin & Teillet, 1973). A colorectalis bélszakasz neurális plexusaihoz – kisebb arányban – a lumbo-sacralis ganglionléc sejtek is hozzájárulnak, amelyek először a dorsalis mesenteriumban és a farokbimbó mesenchymájában telepednek meg, majd a bélcsőben rostrális irányba haladva ganglionsejteké differenciálódnak (második migrációs lépés; Nagy et al, 2007; Wang et al., 2011a) (24. ábra, A, B). Ezen kívül a lumbo-sacralis ganglionléc sejtek létrehozzák a distalis bélszakasz külső beidegzéséért felelős Remak-gangliont (24. ábra) és a plexus pelvicust (24. ábra, A-B) (Burns & Le Douarin, 1998; Nagy et al., 2007, 2012). Korábbi publikációk beszámoltak arról, hogy egérben a posztnatális fejlődés során a külső idegek mentén Schwann-sejt prekursorok is elérik az utóbelet (harmadik vándorlási lépés; Uesaka et al., 2015). Az említett sejt migrációs folyamatokban bekövetkező hibák veleszületett neurointesztinális rendellenességeket eredményeznek, beleértve a Hirschsprung-kórt (HSCR), amelyre a distalis bélszakasz bélidegrendszerének hiánya jellemző. Érdekes módon a HSCR gyakran összefüggésbe hozható a hypertrophias extrinsic idegrostok jelenlétével is a ganglionmentes szegmensben (Kapur, 2016). Az enterális ganglionléc sejtek migrációjával, proliferációjával és differenciálódásával kapcsolatos kiterjedt kutatások ellenére (Heanue et al., 2016; Nagy & Goldstein, 2017),

a colorectum külső beidegzésének háttérében álló fejlődési mechanizmusok kevésbé ismertek (Uesaka et al., 2015).

Az embryonális csirke utóbélbe ültetett mikroyöngy technika és a szövetrekombinációs chorioallantois membrán (CAM) tenyészetek vizsgálati eredményei alapján megfigyeltük, a CXCL12 kemokin a CXCR4 receptort expresszáló külső idegrostokra kemoattraktáns hatással bír, ami új információval szolgál a bélbeidegzést érintő fontos kérdések megválaszolásában. A CXCR4 és a CXCL12 molekulapáros ganglionléc fejlődésben betöltött szerepe jól ismert (Shellard & Mayor, 2016). Korábbi eredmények azt mutatják, hogy a csirke embryokban a CXCR4-et a cardialis ganglionléc sejtek expresszálják, amelyek a garatívek ectodermája és mesenchymája által termelt CXCL12 gradiens felé vándorolnak (Escot et al., 2013, 2016). Csirke- és egér szervezetben a CXCR4 jelátvitel megzavarásának következményeként a szív ganglionléc sejtjei hibás útvonalon vándorolnak, ami összetett congenitalis szívproblémákat eredményez (Escot et al., 2016). A csirke embryóban leírták, hogy a CXCR4-CXCL12 szignalizáció szerepet játszik a szimpatikus ganglionokat kialakító ganglionléc sejtek migrációjában, de nem vesz részt a dorsalis érző ganglionok képzésében (Kasemeier-Kulesa et al., 2010). Ezzel ellentétben *Cxcr4* mutáns egértörzsekben ektopikus helyzetű dorsalis érző ganglionokat találtak (Belmadani et al., 2005). Érdekes módon zebradánióban a CXCR4 fontos a craniofacialis fejlődés során a cranialis ganglionléc irányítása által, de a törzsi régió ganglionléc sejtjei nem fejezik ki a receptort. Ezek alapján a CXCR4 expresszió csak bizonyos ganglionléc populációkra korlátozott (Olesnicky Killian et al., 2009). Bár számos tanulmány feltárta a CXCR4-CXCL12 jelátvitel sokrétű szerepét a ganglionléc migrációban és a neurális differenciálódásban, keveset tudunk ezeknek a molekuláknak a bélidegrendszer fejlődésében betöltött funkciójáról.

Megvizsgálva a CXCR4 és a CXCL12 expresszióját a különböző ganglionléc populációkban a csirke bélidegrendszer kialakulása során, azt találtuk, hogy a CXCR4 kifejezetten a velőcső cervicalis szakaszából származó ganglionléc sejtekben mutatható ki, hasonlóan azokhoz a tanulmányokhoz, amelyekben a garatívek felé vándorló cardialis ganglionléc sejtek molekuláris szabályozásait tárták fel (Escot et al., 2013, 2016). Megfigyeléseink alapján a CXCR4 dinamikus expressziót mutat a cervicalis ganglionléc sejtek migrációja során: a sejtek velőcsőből való kilépésének időpontjában (a 3.

embryonális nap előtt) átmenetileg hordozzák felszínükön a CXCR4 receptort. Miután ezek a ganglionléc sejtek ventrálisan az aorta szintje alá vándorolnak, fokozatosan csökkentik a CXCR4 receptoruk mennyiségét, majd belépve az előbél mesenchymájába, nem mutatnak további CXCR4 expressziót. Ennek alapján erős CXCR4 immunreaktivitást (CXCR4^{high}) mértünk az első három szomita magasságában, éppen a cervicalis ganglionléc cardialis subpopulációjának dorsolateralis irányú vándorlása során, míg caudalisan, a 4-7. szomitapár magasságából kilépő sejtcsoport csökkenő CXCR4 immunfluoreszcenciát mutatott (CXCR4^{low}). Feltételezzük, hogy a CXCR4^{high} és a CXCR4^{low} fenotípussal rendelkező cervicalis ganglionléc sejtek eltérően válaszolnak a CXCL12-re, és csak a legcranialisabb helyzetű, CXCR4-et magas szinten expresszáló sejtek képesek reagálni a ligand kemoattraktáns hatására. Escot és munkatársai (2013) szerint a 3. szomitától caudálisan kivándorló ganglionléc sejtek nem mutatnak CXCR4 expressziót. A korai stádiumú csirke embryok CXCR4 expressziós mintázata közötti eltérés az általunk alkalmazott érzékenyebb immunjelölési módszerrel magyarázható. Eredményeink felvetik annak lehetőségét, hogy a cardialis ganglionléc sejtek elkülönülnek az enterális ganglionléc populációtól a CXCR4 expresszió szintje alapján.

Korábbi munkák leírták, hogy a csirke bélidegrendszerének fejlődése során a cervicalis ganglionléc sejtek a 8. embryonális napra érik el a gasztrointesztinális traktus legdistalisabb pontját, majd ezt követően a 10. embryonális napon a lumbo-sacralis eredetű ganglionléc sejtek is kolonizálják a colorectumot (Burns & Le Douarin, 1998; Burns et al., 2000; Nagy et al., 2007). A lumbo-sacralis ganglionléc sejtek utóbélbe való bevándorolása előtt, a Remak-ganglion-eredetű idegrostok már E7-E8 körül belenőnek a bélfalba (Teillet, 1978; Catala et al, 1995; Burns & Le Douarin, 1998) (24. ábra, C). Immunfluoreszcens és *in situ* hibridizációs technikák alkalmazásával azt találtuk, hogy E6 és E12 között a CXCR4 a Remak-ganglionban és a plexus pelviciusban expresszálódik (24. ábra, B-D). A CXCL12 eloszlása komplementer mintázatot mutat a fejlődő utóbélben, ahol a CXCL12 a CXCR4+ idegrostokat körülvevő mesenchymában halmozódik fel nagy mennyiségben (24. ábra, B). Amint a CXCR4+ Remak-ganglion eredetű idegrostok belépnek az utóbélbe, a CXCL12 expressziója először a külső izomréteg felé tolódik el (24. ábra, C), majd az enterális ganglionok veszik át a ligand termelését (24. ábra, D). A CXCL12 dinamikus expressziós mintázata adhat magyarázatot

arra, hogy a Remak-ganglionból érkező idegrostok először az utóbél muclusaris externa rétegét, majd később a belső plexus ganglionjait innerválják.

Annak bizonyítására, hogy a Remak-ganglion eredetű külső idegrostok hozzájárulnak a distalis bélszakasz bélidegrendszeréhez, Remak-ganglion-utóbél és velőcső kimérákat, valamint CAM tenyészeteket hoztunk létre. Abban az esetben, amikor zöld fluoreszcens fehérjét (green fluorescent protein, GFP) expresszáló csirkéből származó Remak-gangliont ültettünk vad típusú csirke preganglionált utóbelére, azt tapasztaltuk, hogy az utóbél mesenchymája számos extrinsic forrásból származó GFP+ idegrostot tartalmazott, ami összhangban van a Remak-ganglion szerepével a colorectum külső beidegzésében (Aisa et. al., 1998; Shepherd & Raper, 1999), azonban a kimérákban nem találtunk GFP+ neurális sejttesteket (hasonlóan a korábbi munkákhoz: Le Douarin & Teillet, 1973; Catala et al., 1995; Nagy et al., 2007). Ugyan a ganglionmentes utóbél CAM tenyészetei nem mutattak az E14 stádiumban Remak-ganglion eredetű ganglionsejteket, a graftokban kiterjedt extrinsic TUJ1+ idegrost hálózat alakult ki, amelyek mentén nagyszámú SOX10+ prekursor sejt kolonizálta az utóbelet. Ezek az eredmények alátámasztják azt az elképzelést, hogy a Remak-ganglionból származó CXCR4+ idegrostok áthatolnak az izomfalán, elérik az enterális ganglionokat, és a lumbo-sacralis ganglionléc-eredetű prekursorok ezen külső idegrostok mentén vándorolnak a bélbe (Teillet, 1978; Burns & Le Douarin, 1998; Nagy et al., 2007).

Eredményeink alapján a CXCR4 és a CXCL12 akkor fejeződik ki az utóbelben, amikor a Remak-ganglion eredetű axonok belépnek a bélfalba. Ismert, hogy a korai fejlődési fázisban a Remak-ganglion axonjainak utóbél irányú projekcióját a collapsin-1/semaphorin-D akadályozza meg (Shepherd & Raper, 1999). Később a bél külső rétegében a kemorepellens collapsin-1 mennyiségének csökkenése segíti elő az idegrostok benövését az izomrétegek közé. Ezzel párhuzamosan a kemoattaktív CXCL12 dinamikus expressziója valószínűsíthetően együtt működik a collapsin-1 molekulával a colorectum külső beidegzésének kialakításában. Az említett modell emlősök esetén is releváns lehet, mivel immunfluoreszcens festéseink alapján a pelvicus ganglionok is expresszálják a CXCR4 receptort, a semaphorin-3A molekulát pedig a distalis utóbél mesenchymájában mutatták ki (Anderson et al., 2007). Korábbi tanulmányok szerint a CXCL12 moduláló hatást fejt ki az axonnövekedésre azáltal, hogy csökkenti a slit-2, a semaphorin-3A és a semaphorin-3C molekulák kemorepellens hatását (Chalasan et al.,

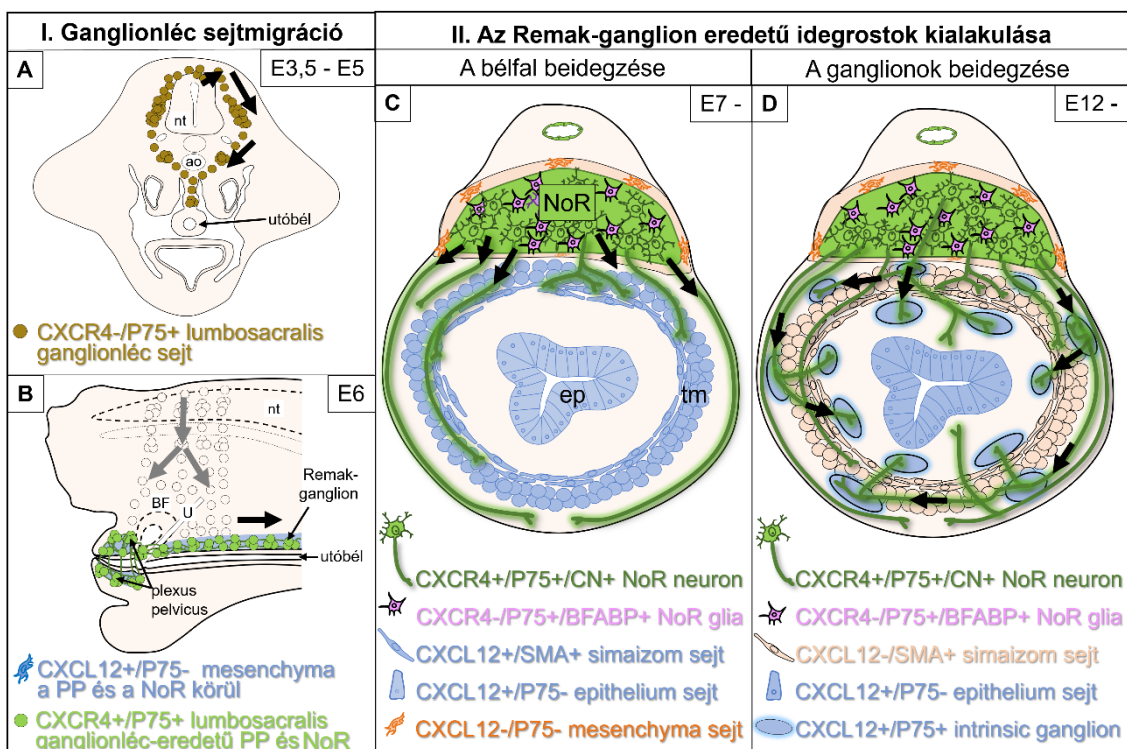
2007). Mindezekon felül a CXCL12 mintázata hasonló a kemoattraktív netrin molekulához, ami az utóbél külső mesenchymális rétegében és a nyálkahártya epitheliumában detektálható (Jiang et al., 2003) (24. ábra, B, C). Ezek az eredmények egy lehetséges molekuláris kölcsönhatásra utalnak, amelyeken keresztül a CXCR4-CXCL12 jelátvitel más kemorepellens és kemoattraktív molekulákkal együtt szabályozza a colorectumba vetülő extrinsic idegi pályák mintázatának kialakulását.

A *Cxcl12* és a *Cxcr4* mutáns egerek praenatalisan elpusztulnak, és sejtmigrációs rendellenességeket mutatnak a vérerek képződésében, a primordiális csírasejt-vándorlásban, a lymphopoesisben, a gasztrointesztinális rendszer és az idegrendszer fejlődésében (Nagasawa et al., 1996, 1998; Tachibana et al., 1998; Zou et al. 1998). A kóros CXCR4 jelátvitel a szenzoros neuronok számos típusát, a szimpatikus neuronokat és azok prekursorait is érinti (Belmadani et al., 2005; Kasemeier-Kulesa et al., 2010). A domináns-negatív (DN) *Cxcr4*-et magas szinten expresszáló rekombináns vírussal végzett perturbációs kísérletekben megfigyelték, hogy a kezelés a bélidegrendszer fejlődését nem befolyásolta, azonban a *DN-Cxcr4* sejtek nem tudták kialakítani a szív interventricularis septumát (Escot et al., 2013; Tang et al., 2021). Érdekes módon a *DN-Cxcr4* -fertőzött csirke embryok némelyikében a Remak-ganglion-eredetű külső beidegzés hiányát is megfigyelték az utóbél területén (Escot et al., 2013). A CXCR4-CXCL12 szignalizáció bélidegrendszer fejlődést irányító lehetséges szerepére a közelmúltban végzett egysejt RNS szekvenálás (RNA-Seq) elemzések is utaltak, ahol a CXCR4 és CXCL12 molekulák expresszió növekedéséről számoltak be egérben (Memić et al., 2018) és madárembryokban (Jacobs-Li et al., 2023). Figyelemre méltó észrevétel az utóbbi vizsgálatban, hogy a postumbilicalis szegmensben a *CXCL12* transzkriptum nagyobb mennyiségben fordult elő a bélidegrendszer lumbo-sacralis, mint a cervicalis velőcső szakaszból származó enterális ganglionléc-eredetű populációjában (Jacobs-Li et al., 2023).

Mikrogyöngy transzplantációs és *in vitro* kísérleteinkben a CXCL12 rekombináns fehérje hozzáadása hypertrophicus TUJ1+ Remak-ganglion eredetű idegrostokat eredményezett az utóbél-explantátumokban. További bizonyítékok szolgálnak arra, hogy a kemokinnek nagy jelentősége van az utóbél külső beidegzésének fejlődésében, ugyanis az AMD3100 gátló hatással bír az extrinsic idegrostok növekedésére. Az AMD3100 a CXCR4 kismolekulájú antagonistájaként ismert, ami megzavarja a cranialis ganglionléc

sejtek migrációját madárembryokban (Rezzoug et al., 2011). Hasonló hatást figyeltünk meg a Remak-ganglionban *ex vivo*, ahol a kiültetett csirke utóbélének AMD3100 kezelése megakadályozta a Remak-ganglion eredetű axonok projekcióját a colorectumba. Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy az utóbélben expresszált CXCL12 szabályozza a külső idegek bejutását a vastagbélbe a CXCR4 receptoron keresztül.

Az utóbél extrinsic beidegzésének hátterében álló mechanizmusok megértése jelentős transzlációs jelentőséggel bír, különös tekintettel a székletürítés normális szabályozásában betöltött alapvető szerepére. Ennek a külső beidegzésnek a veleszületett vagy szerzett rendellenességei, például spina bifida vagy traumás sérülés, neurogén bélrendszert eredményeznek, és jelentős hatással vannak az életminőségre, így a fejlődést irányító jelátviteli útvonalak meghatározása fontos terápiás célpontként szolgálhat a jövőben (Butler Tjaden & Trainor, 2013).



24. ábra. A CXCR4-CXCL12 molekulapáros dinamikus expresszója az utóbél külső beidegzésének fejlődése során csirke embryóban. **A)** E3,5-5 napos embryo keresztmetszet az utóbél magasságában. **B)** Az E6 korú embryo farokbimbójának saggitalis ábrázolása. A szürke nyilak a lumbo-sacralis ganglionléc sejtek vándorlásának korábbi útvonalára utalnak. **C-D)** Az utóbél középső részének keresztmetszete. A vastag fekete nyilak a migráció, illetve az idegrostok projekciójának irányát jelölik. *ao*, aorta dorsalis; *BF*, bursa Fabricii; *ep*, utóbél epithelium; *nt*, velőcső; *pp*, plexus pelvicius; *NoR*, Remak-ganglion; *tm*, tunica muscularis, *U*, ureter. Saját készítésű ábra.

A Hirschsprung-kórban leírt specifikus génhibák olyan receptorok és növekedési faktorok diszfunkcióját okozzák, amik a különböző szövetek organogenezisében jelentősek (a CXCR4-CXCL12 molekulapárhoz hasonlóan), befolyásolva a bélidegrendszer fejlődésén kívül például a bél immunológiáját is (Heanue & Pachnis, 2007; Heuckeroth, 2018). Régóta ismert, hogy a RET receptor a GFR α 1-GDNF-hez való kapcsolódása révén nélkülözhetetlen az enterális ganglionléc sejtek megfelelő migrációjában, differenciációjában és proliferációjában (Hearn et al., 1998; Young et al., 2001; Gianino et al., 2003; Nagy & Goldstein, 2006b). A RET receptornak azonban egy másik fontos funkcióját is feltárták. A lymphoid szövet indukáló sejtek szükségesek a Peyer-plakkok (PP) képződéséhez, amely folyamat RET-GFR α 3-ARTN (artemin) jelátvitel függő (Veiga-Fernandes et al., 2007; Patel et al., 2012). Míg egerekben a GDNF faktor vagy a GFR α 1 koreceptor null mutációja következtében a plexus myentericus nem alakult ki és a PP-ok képződése zavartalan volt, addig a GFR α 3 vagy ARTN mutációnál a bélidegrendszer fejlődésének hibája mellett kevesebb PP-t figyeltek meg, a RET homozigóta mutáció pedig jelentősen lecsökkentette a PP-ok számát a bél aganglionózisán felül (Veiga-Fernandes et al., 2007), bizonyítva a RET sokrétű szerepét a bélel kapcsolatos szövetek kialakulásában. A HSCR mutációk másodlagos immunrendszeri hatására példa, hogy bél ganglionmentességének következményeként fellépő enterocolitis idő előtti thymus involúciót, lép lymphopeniat és csökkent B-sejt lymphopoesist okoz Ednr β -/- és Edn3 -/- null mutáns egerekben. A bél immunitásának változásai adhatnak magyarázatot a Hirschsprung-kórban szenvedő gyerekeknél előforduló életveszélyes fertőzések fokozott kockázatára, amik alapján kiemelkedően fontos a bélhez asszociált nyirokszövetek fejlődéstani vizsgálata (Frykman et al., 2015; Heuckeroth, 2018).

A farokbimbóban nem csak a bélidegrendszer fejlődése kapcsán jelenik meg a sejt-vándorlás mechanizmusa, hanem az utóbélhez asszociált primer nyirokszerv, a bursa Fabricii kialakulása is több sejt-migrációs lépésből tevődik össze. Emlősökben a kemokin modulált sejt-vándorlásra egy másik példa a központi és a perifériás B-sejtek vándorlásának mechanizmusa, ahol leírták a CXCR4-CXCL12 alapvető szerepét (Liang et al., 2001; Read et al., 2005). Régóta ismert, hogy a B-sejt érés madár embriókban a bursa Fabricii-ben zajlik (Glick, 1994), de a migrációt irányító molekuláris

mechanizmusokról kevés ismerettel rendelkezünk. *In situ* hibridizációval ötvözött immunfluoreszcens technikák, valamint a kiméra rendszerek kísérletes eredményei alapján azt találtuk, hogy a CXCR4-CXCL12 jelátvitel a csirke B-sejt vándorlás lépéseit is irányítja és ezáltal fontos szerepet játszik a primer nyirokszervek organogenezisében.

A bursa Fabricii kivezető csövén keresztül az utóbél proctodeumával állandó összeköttetésben van és kifejlett állapotban 12-20 hosszirányú redőt tartalmaz, amelyben B-sejtekkel teli lymphoid folliculusok találhatóak (Nagy et al., 2022). A bursa Fabricii-ben a B-sejtek fejlődése térben és időben eltérő, több egymást követő lépésből álló sejtvándorlási folyamatot foglal magában (Ratcliffe, 1985). Az első, ún. prebursalis migrációs lépés a 10. embrionális nap körül kezdődik, amikor a B-sejtek a bursa előtelepébe vándorolnak, ahol az *in situ* hibridizációs festéseink szerint magas, homogén CXCL12 expresszió mutatható ki (25. ábra, A). Az áramlási citometria adatok alapján ebben a stádiumban a prebursalis B-sejtek CXCR4-et fejeznek ki, amely arra enged következtetni, hogy a magas CXCL12 szint vonzza a hám alatti mesenchymába a lépből és a csontvelőből érkező éretlen B-sejt prekurzorokat.

Az E10 után a bursalis szekréciós dendritikus sejtek (BSDC) vérképző prekurzorai a bursa mesenchymából felszíni epitheliumba lépnek, ahol hámmal való kölcsönhatás révén folliculusképződést indukálnak (Nagy et al., 2004; Dóra et al., 2017). Ennek megfelelően a CXCL12 expressziós mintázatában is változás következik be. A homogén kifejeződés kondenzált jellé alakul a folliculusbimbók subepithelialis régiójában, majd az E14. napra az intraepithelialis CXCL12 a folliculusbimbók területén válik kifejezetté. Ezzel párhuzamosan a CXCR4+ bursalis B-sejtek a mesenchymából a folliculusbimbókba vándorolnak, így elindul a második (bursalis) migrációs lépés (25. ábra, B).

A bursa előtelepének a CXCR4 antagonistával, az AMD3100-zal való injektálása a B-sejtes folliculusok számának drasztikus csökkenéséhez vezetett az E18 korú GFP-CAM vad típusú bursa kimérákban, bizonyítva a CXCR4-CXCL12 kölcsönhatás fontosságát a B-sejtes kolonizációban és a folliculusképződésben. Míg az AMD3100 a kezdeti folliculus indukciót nem befolyásolta, amint azt a CSF1R+ BSDC-k jelenléte is bizonyított, addig a kezelés szinte teljes mértékben megakadályozta a B-sejtek bevándorlását a képződő folliculusokba és B-sejt mentes folliculus-primordiumok kialakulásához vezetett. Mivel az AMD3100 kezelés a teljes E9 korú bursa előtelepét

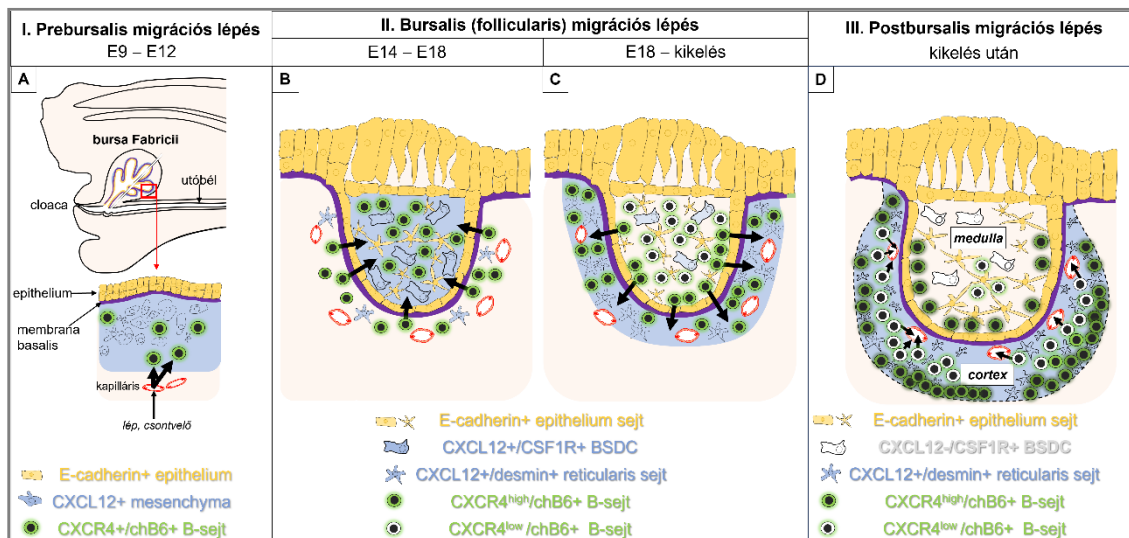
érintette, ezért ez a kísérleti beállítás nem teszi lehetővé annak a pontos megkülönböztetését, hogy az inhibitor pontosan melyik B-sejt migrációs lépést befolyásolja, a prebursalis B-sejtek bevándorlását a bursalis mesenchymába vagy további migrációt a folliculusokba. AMD3100-zal kezelt szervekben nem figyelhető meg a chB6+ B-sejtek felhalmozódás az intrafolliculáris mesenchymában, ami arra utal, hogy a CXCL12 kötődése szükséges az első migrációs lépéshez, hogy a prebursalis B-sejt prekursorok eljussanak és megtelepedjenek a bursa-kezdeményben. Hipotézisünk szerint, ha a CXCL12-CXCR4 tengelyre csak a folliculusokba való második migrációs lépéshez lenne szükség, akkor a kezelt szervekben magasabb B-sejt számra számíthatunk volna az interfolliculáris mesenchymában. Laparidou és munkatársai megfigyelték, hogy a AMD3100-zal előkezelt prebursalis B-sejtek adaptív átültetése csirke embryokba a lymphoid folliculusok kolonizációjának csökkenését eredményezte, (Laparidou et al., 2020), ami alátámasztja észrevételeinket. Az inhibitor alkalmazása nem érintette a CXCR4+ granulociták belépését a bursa előtelepébe, ami arra enged következtetni, hogy további molekuláris szignálokra van szükség a granulociták vándorlásához. A folyamatban szerepet játszhatnak a CXCL13 vagy a CCL20, valamint kemokin receptoraik, a CXCR5 és CCR6, mivel mindkét kemokint leírták csirkékben (Kaiser et al., 2005), és fontosak a csíracentrumokban történő B-sejt migrációban, valamint a GALT-struktúrák (bélhez kapcsolódó lymphoid szövet; gut-associated lymphoid tissue) kialakulásához egerekben és emberekben (Allen et al., 2004; Reboldi et al., 2016).

Miután a bursális B-sejtek benépesítik a folliculusbimbókat, osztódnak, és génonverzióval diverzifikálják BCR-repertoárjukat (B-cell receptor) (Mansikka et al., 1990). E18 stádiumban a folliculusbimbókra intenzív CXCR4 receptor és CXCL12 ligand expresszió jellemző, ami valószínűsíthetően szükséges a fejlődő B-sejtek bursában való megtartásáért, amely a szignalizáció humán csontvelőhöz hasonló funkciójára utal (Ma et al., 1999). *In situ* hibridizációs és immunfluoreszcens eredményeink szerint a velőállományi BSDC-k felelősek a ligand termeléséért (25. ábra, B), hasonlóan a csontvelő mikrokörnyezetének biztosításáért felelős sztróma sejtekhez (Tashiro et al., 1993), ami tovább erősíti a bursa és a csontvelő közötti ekvivalenciát.

A kikelés időpontját megelőzően újabb drasztikus szerkezeti változás következik be a folliculusokban. A harmadik migrációs lépésben (posztbursalis) egyes B-sejtek visszavándorolnak a folliculust körülvevő alapmembránon keresztül, és tovább osztódnak

a vimentint és desmint expresszáló mesenchymális retikuláris sejtek között (Oláh & Glick, 1995; Korte et al., 2013). Ez a megfigyelés eredményeinkkel összefüggésbe hozható, ugyanis a CXCL12 kemokin ligand termelését a perifériás desmin+ retikuláris sejtek veszik át a kikelést követően. A harmadik migrációs lépés a folliculusok kompartmentalizációjához vezet, kialakul a kéreg- és velőállomány (25. ábra, D). Meglepő módon ez egy olyan szerkezetet eredményez, amely megjelenésében nagyon hasonlít a csirke csíracentrumaira: gömbölyű vagy tojásdad struktúrák, tömött, intenzíven osztódó kéreggel és lazább szerkezetű, szaporodó sejteket alig tartalmazó velővel, amely makrofágokat és folliculáris dendritikus sejteket (FDC) tartalmaz (Yasuda et al., 1998; Nagy et al., 2001). A kéreg és velőállomány elválását a CXCL12 emelkedettebb perifériás expressziója indukálja, amely a kialakuló kéregállományba vonzza az alapmembránon átlépő B-sejteket (25. ábra, C). Végül az érett bursális folliculusban a CXCL12 mRNS szinte kizárólag a kéregben volt kimutatható (25. ábra, D). *In situ* hibridizációs eredményeink alapján a kéregállomány perifériáján tartózkodó B-sejtek magas CXCR4 mRNS szintet mutatnak (CXCR4^{high}), míg a corticomedullaris határon elhelyezkedő erek körül a B-sejtekre csökkenő CXCR4 expresszió volt jellemző (CXCR4^{low}) (25. ábra, D). Ez az eloszlás szintén hasonlóságot mutat a csontvelői B-sejtek emigrációs mechanizmusával. Emellett jól ismert, hogy emlős csíracentrumokban a CXCL12-CXCR4 tengely dinamikus modulálása elengedhetetlen ahhoz, hogy a B-sejteket a CXCL12-ben gazdag sötét zónából a CXCL12-t gyengén expresszáló világos zónába irányítsák a szelekcióhoz, majd vissza a sötét zónába további proliferációs lépésekhez és az affinitás éréshez (Allen et al., 2004). A nyúl appendixben hasonló B-sejtes irányítási mechanizmus történik. A nyulak a csirkékhez hasonlóan bélhez asszociált limfoid szövetet használnak B-sejt-repertoárjuk diverzifikálására (Weinstein et al., 1994, Zhai & Lanning, 2013). Az a megfigyelés, hogy a csirke bursális folliculusok az emlős csíracentrumokhoz és a nyúl appendixhez hasonló CXCL12 expressziós mintázatot mutatnak, erősíti azt az elképzelést, hogy a CXCL12 irányítja a bursális B-sejtek harmadik lépését az alapmembránon keresztül a folliculusok kéregállományának kialakításához (25. ábra, C). Annak ellenére, hogy a különböző fajok eltérő stratégiákat alkalmaznak a B-sejtek fejlődésére, a CXCL12-CXCR4 tengely által szabályozott B-sejt vándorlás egy erősen konzervált mechanizmust képvisel a fajok között. Összefoglalásul elmondhatjuk, hogy a CXCR4 és a CXCL12 molekulapáros részt vesz a B-sejt vándorlás

minden szakaszában a bursa fejlődése során, és elengedhetetlenül fontos a prebursalis B-sejtek bursa előtelepbe történő korai migrációs lépéseihez.



25. ábra. A CXCR4-CXCL12 molekulapáros által irányított sejtmigrációs lépések a bursa Fabricii embryonális fejlődése során csirke embryóban. A vastag fekete nyilak B-sejtek migrációjának irányát szemléltetik. **A)** A 9 napos csirke embryo farokbimbójának saggitalis állású metszete, az alsó nagyított kép a pirossal bekeretezett területről származik. *BSDC*, *bursai szekrécións dendritikus sejt*. Saját készítésű ábra.

A farokbimbóban az utóbél idegrendszeréhez kapcsolódó Remak-ganglion és a plexus pelvicus, valamint a bursa Fabricii sejtvándorlási folyamataiban is kulcsszerepet játszik a CXCL12 kemokin, és receptora, ami bizonyítékul szolgál arra, hogy a CXCR4 jelátvitelnek összetett, stádiumspecifikus szerepe van az embryonális folyamatokban, az őssejtek migrációjának szabályozásában játszott kezdeti funkciójától a differenciált sejtekre gyakorolt szövetspecifikus hatásokig (Miller et al., 2008).

6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Igazoltuk, hogy a CXCR4 kemokin receptor intenzíven kifejeződik a cardialis ganglionléc sejtekben, de a bélidegrendszer kialakító cervicalis és lumbo-sacralis sejteken nem mutatható ki a gasztrointesztinális traktus kolonizációja során.
2. Immunfluoreszcens és *in situ* hibridizációs eredményeink azt bizonyítják, hogy a humán, egér és csirke embryokban az utóbél külső beidegzéséért felelős lumbo-sacralis ganglionléc eredetű plexus pelvicus és a Remak-ganglion neuronjai CXCR4 pozitívak. Továbbá meghatároztuk, hogy a CXCR4 receptor ligandja (CXCL12) a fejlődő bél simaizomzatában, epitheliumában és később az instinsic ganglionokban termelődik.
3. Az általunk kifejlesztett Remak-ganglion rekombinációs kísérletekkel és velőcső transzplantációval igazoltuk a Remak-ganglion eredetű idegrostok és az intrinsic ganglionok kapcsolatát. Ezekkel a módszerekkel bizonyítottuk azt is, hogy az enterális plexusok jelenléte nélkül is végbemegy a bél extrinsic beidegzése.
4. Szervtenyészetekkel, valamint mikrogyöngy implantációs kísérletekkel kimutattuk, hogy a CXCR4 és a CXCL12 molekulák irányítják az utóbél extrinsic beidegzésének fejlődését. A CXCR4-CXCL12 jelátvitel bökölése megakadályozta a Remak-ganglion idegrostjainak utóbél irányú növekedését.
5. *In situ* hibridizációs eredményeink alapján azt találtuk, hogy az utóbélhez asszociált primer nyirokszerv, a bursa Fabricii B-sejt kolonizációs folyamataiban is részt vesz a CXCR4-CXCL12 molekulapáros. Kimutattuk, hogy a CXCR4-CXCL12 mRNS-tartalom dinamikusán változik a bursa Fabricii fejlődésének különböző stádiumai között.
6. Embriomanipulációs vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a CXCR4-CXCL12 kölcsönhatás nélkülözhetetlen a bursa Fabricii B-sejtekkel történő benépesüléséhez, a szervben belüli migrációjához, illetve az érett B-sejtek perifériára történő kivándorlásához.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A CXCL12 kemokin és receptorának (CXCR4) esszenciális szerepét számos sejttípus vándorlásában leírták. Ezek a molekulák irányítják a lymphocyták, a cranialis- és cardialis ganglionléc sejtek migrációját, részt vesznek az axon növekedésben, de a bélidegrendszer létrehozó cervicalis- és lumbo-sacralis ganglionléc sejtek vándorlásában betöltött szerepére csak indirekt bizonyítékok, feltételezések vannak. Csirke embryokban írták le először a bélidegrendszer ganglionléc eredetét, amelyekhez a perifériás ganglionokból származó külső idegrostok kapcsolódnak. Az emlősökben és a madarakban egyaránt megtalálható plexus pelvicus, valamint a madárspecifikus Remak-ganglion a lumbo-sacralis ganglionlécből származnak és a distalis bélszakasz extrinsic beidegzését biztosítják, de a fejlődésüket szabályozó molekuláris mechanizmusok nem ismertek.

Immunfluoreszcens elemzéseink alapján a CXCR4 receptor nem vesz részt a velőcsőből kilépő bélidegrendszer kialakító ganglionléc sejtek bél irányú kolonizációjában, de a CXCR4 specifikusan a Remak-ganglion és a plexus pelvicus idegrostjaiban expresszálódik, míg a CXCL12 az utóbél mesenchymájában és a belső neurális plexusokban mutatható ki. *In vitro* és *ex vivo* függesztett szervtenyészetekkel, valamint szövetrekombinációs és mikrogyöngy implantációs kísérletekkel vizsgáltuk a CXCR4 és a CXCL12 molekulák szerepét az utóbél idegrendszerének fejlődésében. Kimutattuk, hogy a CXCL12 fokozott expressziója megnövekedett Remak-ganglion eredetű axonális projekciót eredményez, míg a jelátvitel gátlása megzavarja az extrinsic idegrostok bél irányú növekedését. Eredményeink fontos információkkal szolgálnak a Hirschspung-kór (az 1:5000 előfordulású veleszületett neurointesztinális betegség) patogenezisének megértéséhez, ahol a distalis bélszakasz belső- és a külső innervációja is egyaránt érintett. A bélidegrendszer célzó vizsgálataink mellett kimutattuk, hogy a csirke embryóban az utóbélhez kapcsolódó primer nyirokszerv, a bursa Fabricii B-sejt kolonizációs folyamataiban is nélkülözhetetlen a CXCR4-CXCL12 jelátvitel. A CXCR4-CXCL12 sejtvándorlást irányító központi szerepe rávilágít az utóbélhez asszociált különböző szervek embryonális fejlődésének térben és időben szétválasztott precíz szabályozásának jelentőségére.

8. SUMMARY

The key role of the CXCL12 chemokine and its receptor, CXCR4 has been reported in the migration of multiple cell types. The migration of lymphocytes, cranial- and cardiac neural crest cells, and the mechanism of axon growth are regulated by this chemokine signaling. However, there is only indirect evidence and speculation regarding the role of CXCR4-CXCL12 of cervical- and lumbo-sacral neural crest cell movement for the establishment of the enteric nervous system (ENS). It was first observed in chicken embryos that the neurons and glial cells in the gastrointestinal tract, connected to extrinsic nerve fibers from peripheral ganglia, originate from the neural crest. The pelvic plexus, found in both mammals and avian, along with the avian-specific Remak ganglion, derive from the lumbo-sacral neural crest and contribute to the extrinsic innervation of the distal colon. Despite these insights, our understanding of the regulatory molecular mechanism involved in their development is still limited.

Our immunofluorescence analyses suggest that CXCR4 is not involved in the colonization processes of neural crest cells forming the ENS, but the CXCR4 receptor is specifically expressed in the Remak ganglion and pelvic plexus nerve fibers, whereas CXCL12 is detected in the smooth muscle, epithelium and the intrinsic neural plexuses of the hindgut. Using *in vitro* and *ex vivo* organ cultures, tissue recombination, and microbead implantation experiments, we have examined the roles of CXCR4 and CXCL12 in the development of the hindgut ENS. Increased doses of CXCL12 recombinant protein enhances axonal projection from the Remak-ganglion, whereas inhibiting CXCR4-CXCL12 signaling disrupts the growth of extrinsic nerve fibers towards the gut. Our results provide important insights into the pathogenesis of Hirschsprung-disease, a relatively common (1 in 5000) congenital neurointestinal disease where both intrinsic and extrinsic innervation of the distal colon are affected. In addition to our focus on colorectal ENS development, we demonstrated that CXCR4-CXCL12 signaling is also crucial for B-cell migration in the hindgut-associated primary lymphoid organ, the bursa of Fabricius, in chicken embryos. The central role of CXCR4-CXCL12 in neural crest and lymphoid precursor cell migration underscores the importance of precise spatio-temporal regulation of the chemokines in the development of hindgut-associated organs.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Aisa, J., Lahoz, M., Serrano, P.J., Castiella, T., Junquera, C., Azanza, M.J. & Vera-Gil, A. (1998). Histochemical, immunohistochemical, and electron microscopy study of the caudal portion of the chicken intestinal nerve of Remak. *Neurochemical Research*. 23(6):845-53. doi: 10.1023/a:1022454827533.
- Akbareian, S. E., Nagy, N., Steiger, C. E., Mably, J. D., Miller, S. A., Hotta, R., Molnar, D., & Goldstein, A. M. (2013). Enteric neural crest-derived cells promote their migration by modifying their microenvironment through tenascin-C production. *Developmental Biology*, 382(2), 446–456. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.08.006>
- Allan, I. J., & Newgreen, D. F. (1977). Catecholamine accumulation in neural crest cells and the primary sympathetic chain. *American Journal of Anatomy* 149(3), 413–421.
- Allan, I.J. & Newgreen, D.F. (1980). The origin and differentiation of enteric neurons of the intestine of the fowl embryo. *The American Journal of Anatomy* 157(2):137-54. doi: 10.1002/aja.1001570203.
- Allen, S.J, Crown, S.E. & Handel, T.M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annual Review of Immunology* 25:787-820. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090529.
- Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N. & Cyster, J.G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature Immunology* 5:943–52. doi: 10.1038/ni1100
- Amiel, J., Sproat-Emison, E., Garcia-Barcelo, M., Lantieri, F., Burzynski, G., Borrego, S., Pelet, A., Arnold, S., Miao, X., Griseri, P., Brooks, A.S., Antinolo, G., de Pontual, L., Clement-Ziza, M., Munnich, A., Kashuk, C., West, K., Wong, K.K., Lyonnet, S., Chakravarti, A., Tam, P.K., Ceccherini, I., Hofstra, R.M. & Fernandez, R.; Hirschsprung Disease Consortium (2008). Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: A review. In *Journal of Medical Genetics* (Köt. 45, Szám 1, o. 1–14). <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.053959>
- Anderson, R.B., Bergner, A.J., Taniguchi, M., Fujisawa, H., Forrai, A., Robb, L. & Young, H.M. (2007). Effects of different regions of the developing gut on the migration of enteric neural crest-derived cells: a role for Sema3A, but not Sema3F. *Developmental Biology* 305(1):287-99. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.02.020.

- Anderson, R. B., Stewart, A. L., & Young, H. M. (2006). Phenotypes of neural-crest-derived cells in vagal and sacral pathways. *Cell and Tissue Research*, 323(1), 11–25. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0047-6>
- Arellano, J., Xelhuantzi, N., Mirto, N., Hernández, M. E., & Cruz, Y. (2019). Neural interrelationships of autonomic ganglia from the pelvic region of male rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 217, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2018.12.005>
- Artinger, K. B., & Bronner-Fraser, M. (1992). Partial Restriction in the Developmental Potential of Late Emigrating Avian Neural Crest Cells. *Developmental Biology*, 149(1), 149–157.
- Bagyánszki, M., Román, V. & Fekete, E. (2000). Quantitative distribution of NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons in different segments of the developing chicken small intestine and colon. *The Histochemical Journal* 32(11):679-84. doi: 10.1023/a:1004167416731.
- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K. Y. C., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., & Bachelier, F. (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35760–35766. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508234200>
- Barshack, I., Fridman, E., Goldberg, I., Chowers, Y., & Kopolovic, J. (2004). The loss of calretinin expression indicates aganglionosis in Hirschsprung's disease. *Journal of Clinical Pathology*, 57(7), 712–716. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.016030>
- Bayliss, W. M. (1899). The movements and innervation of the small intestine. *The Journal of Physiology* 24(2), 99–143.
- Beck, T. C., Gomes, A. C., Cyster, J. G., & Pereira, J. P. (2014). CXCR4 and a cell-extrinsic mechanism control immature B lymphocyte egress from bone marrow. *Journal of Experimental Medicine*, 211(13), 2567–2581. <https://doi.org/10.1084/jem.20140457>
- Belmadani, A., Tran, P. B. & Ren, D., Assimacopoulos, S., Grove, E. A., & Miller, R. J. (2005). The chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates the migration of sensory neuron progenitors. *Journal of Neuroscience*, 25(16), 3995–4003. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4631-04.2005>

- Bennett, T., & Malmfors, T. (1970). The adrenergic nervous system of the domestic fowl (*Gallus domesticus* (L.)). *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, *106*(1), 22–50. <https://doi.org/10.1007/BF01027715>
- Bhardwaj, D., Náger, M., Camats, J., David, M., Benguria, A., Dopazo, A., Cantí, C. & Herreros, J. (2013). Chemokines induce axon outgrowth downstream of Hepatocyte Growth Factor and TCF/ β -catenin signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience* *7*, 52. doi:10.3389/fncel.2013.00052
- Bianchi, M. E., & Mezzapelle, R. (2020). The Chemokine Receptor CXCR4 in Cell Proliferation and Tissue Regeneration. In *Frontiers in Immunology* (Köt. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02109>
- Bleul, C. C., Fuhlbrigge, R. C., Casasnovas, J. M., Aiuti, A., & Springer, T. A. (1996). A Highly Efficacious Lymphocyte Chemoattractant, Stromal Cell-derived Factor 1 (SDF-1). *Journal of Experimental Medicine* *184*(3), 1101–1109.
- Blixt, M.K.E., Hellsand, M., Konjusha, D., Zhang, H., Stenfelt, S., Åkesson, M., Rafati, N., Tararuk, T., Stålhammar, G., All-Eriksson, C., Ring, H. & Hallböök, F. (2022). MYCN induces cell-specific tumorigenic growth in RB1-proficient human retinal organoid and chicken retina models of retinoblastoma. *Oncogenesis*. *11*(1):34. doi: 10.1038/s41389-022-00409-3.
- Bódi, I., Nagy, N., Sinka, L., Igyártó, B. Z., & Oláh, I. (2009). Novel monoclonal antibodies recognise guinea fowl thrombocytes. *Acta Veterinaria Hungarica*, *57*(2), 239–246. <https://doi.org/10.1556/AVet.57.2009.2.5>
- Bondurand, N., Natarajan, D., Barlow, A., Thapar, N., & Pachnis, V. (2006). Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Development*, *133*(10), 2075–2086. <https://doi.org/10.1242/dev.02375>
- Bronner-Fraser M. (1993) Mechanisms of neural crest cell migration. *Bioessays*. *15*(4):221-30. doi: 10.1002/bies.950150402.
- Bronner, M. E., & LeDouarin, N. M. (2012). Development and evolution of the neural crest: An overview. In *Developmental Biology* (Köt. 366, Szám 1, o. 2–9). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.12.042>
- Brookes, S. J., Dinning, P. G., & Gladman, M. A. (2009). Neuroanatomy and physiology of colorectal function and defaecation: From basic science to human clinical studies. In

- Neurogastroenterology and Motility* (Köt. 21, Szám SUPPL. 2, o. 9–19).
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01400.x>
- Brookes, S. J. H. (2001). Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *The Anatomical Record*, 262(1), 58–70. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20010101\)262:1<58::AID-AR1011>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20010101)262:1<58::AID-AR1011>3.0.CO;2-V)
- Browne, M. J. (1953). A study of the sacral autonomic nerves in a chick and a human embryo. *The Anatomical Record* 116(2), 189–203.
- Browning, K. N., & Travagli, R. A. (2014). Central nervous system control of gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions. *Comprehensive Physiology*, 4(4), 1339–1368. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130055>
- Burger, J. A., & Bürkle, A. (2007). The CXCR4 chemokine receptor in acute and chronic leukaemia: A marrow homing receptor and potential therapeutic target. In *British Journal of Haematology* (Köt. 137, Szám 4, o. 288–296). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06590.x>
- Burns, A. J. (2005). Migration of neural crest-derived enteric nervous system precursor cells to and within the gastrointestinal tract. In *International Journal of Developmental Biology* (Köt. 49, Szám 2-3 SPEC. ISS., o. 143–150). <https://doi.org/10.1387/ijdb.041935ab>
- Burns, A. J., Champeval, D., & Le Douarin, N. M. (2000). Sacral neural crest cells colonise aganglionic hindgut in vivo but fail to compensate for lack of enteric ganglia. *Developmental Biology*, 219(1), 30–43. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9592>
- Burns, A. J., & Le Douarin, N. M. (2001). Enteric nervous system development: Analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. *Anatomical Record*, 262(1), 16–28. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20010101\)262:1<16::AID-AR1007>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20010101)262:1<16::AID-AR1007>3.0.CO;2-O)
- Burns, A.J. & Le Douarin, N.M. (1998). The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut spatiotemporal analysis of the development of the enteric. *Development*, 125(21), 4335–4347.
- Burns, J. M., Summers, B. C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M. E. T., Sunshine, M. J., Littman, D. R., Kuo, C. J., Wei, K., McMaster, B. E., Wright, K., Howard, M. C., & Schall, T. J. (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *Journal of Experimental Medicine*, 203(9), 2201–2213. <https://doi.org/10.1084/jem.20052144>

- Bussmann, J., Wolfe, S. A., & Siekmann, A. F. (2011). Arterial-venous network formation during brain vascularization involves hemodynamic regulation of chemokine signaling. *Development*, *138*(9), 1717–1726. <https://doi.org/10.1242/dev.059881>
- Butler Tjaden, N.E & Trainor, P.A. (2013). The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Translational Research* 162(1):1-15. doi: 10.1016/j.trsl.2013.03.001.
- Cacheux, V., Dastot-Le Moal, F., Kääriäinen, H., Bondurand, N., Rintala ,R., Boissier, B., Wilson, M., Mowat, D. & Goossens, M. (2001). Loss-of-function mutations in SIP1 Smad interacting protein 1 result in a syndromic Hirschsprung disease. *Human Molecular Genetics* *10*(14):1503-10. doi: 10.1093/hmg/10.14.1503.
- Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, & Butcher EC. (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*, *279*(5349), 381–384.
- Caocci, G., Greco, M., & La Nasa, G. (2017). Bone marrow homing and engraftment defects of human hematopoietic stem and progenitor cells. In *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* (Köt. 9, Szám 1). Università Cattolica del Sacro Cuore. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2017.032>
- Catala, M., Teillet, M.-A., & Le Douarin, N. M. (1995). Organization and development of the tail bud analyzed with the quail-chick chimera system. *Mechanisms of Development*, *51*(1), 51–65. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(95\)00350-A](https://doi.org/10.1016/0925-4773(95)00350-A)
- Cha, Y. R., Fujita, M., Butler, M., Isogai, S., Kochhan, E., Siekmann, A. F., & Weinstein, B. M. (2012). Chemokine Signaling Directs Trunk Lymphatic Network Formation along the Preexisting Blood Vasculature. *Developmental Cell*, *22*(4), 824–836. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.01.011>
- Chalasan, S.H., Sabol, A., Xu, H., Gyda, M.A., Rasband, K., Granato, M., Chien, CB. & Raper J.A. (2007). Stromal cell-derived factor-1 antagonizes slit/robo signaling in vivo. *Journal of Neuroscience* *27*(5):973-80. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4132-06.2007.
- Chalasan, S. H., Sabelko, K. A., Sunshine, M. J., Littman, D. R., & Raper, J. A. (2003). A Chemokine, SDF-1, Reduces the Effectiveness of Multiple Axonal Repellents and Is Required for Normal Axon Pathfinding. *Journal of Neuroscience* *23*(4), 1360–1371.

- Chalazonitis, A., D'Autréaux, F., Pham, T. D., Kessler, J. A., & Gershon, M. D. (2011). Bone morphogenetic proteins regulate enteric gliogenesis by modulating ErbB3 signaling. *Developmental Biology*, 350(1), 64–79. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.11.017>
- Chalazonitis, A., Pham, T. D., Li, Z., Roman, D., Guha, U., Gomes, W., Kan, L., Kessler, J. A., & Gershon, M. D. (2008). Bone morphogenetic protein regulation of enteric neuronal phenotypic diversity: Relationship to timing of cell cycle exit. *Journal of Comparative Neurology*, 509(5), 474–492. <https://doi.org/10.1002/cne.21770>
- Cheng, X., Wang, H., Zhang, X., Zhao, S., Zhou, Z., Mu, X., Zhao, C., & Teng, W. (2017). The role of SDF-1/CXCR4/CXCR7 in neuronal regeneration after cerebral ischemia. In *Frontiers in Neuroscience* (Köt. 11, Szám OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00590>
- Cimpean, A. M., Ribatti, D., & Raica, M. (2008). The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. In *Angiogenesis* (Köt. 11, Szám 4, o. 311–319). <https://doi.org/10.1007/s10456-008-9117-1>
- Clark, M. R., Mandal, M., Ochiai, K., & Singh, H. (2014). Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. In *Nature Reviews Immunology* (Köt. 14, Szám 2, o. 69–80). <https://doi.org/10.1038/nri3570>
- Cojoc, M., Peitzsch, C., Trautmann, F., Polishchuk, L., Telegeev, G. D., & Dubrovskaya, A. (2013). Emerging targets in cancer management: Role of the CXCL12/CXCR4 axis. In *Oncotargets and Therapy* (Köt. 6, o. 1347–1361). <https://doi.org/10.2147/OTT.S36109>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Conner, P. J., Focke, P. J., Noden, D. M., & Epstein, M. L. (2003). Appearance of neurons and glia with respect to the wavefront during colonization of the avian gut by neural crest cells. *Developmental Dynamics*, 226(1), 91–98. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10219>
- Cooper, M., Peterson, R., & Good, R. (1965). Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken. *Nature*, 205, 143–146.
- Cooper MD, Perey DY, McKneally MF, Gabrielsen AE, Sutherland DE, & Good RA. (1966). A mammalian equivalent of the avian bursa of Fabricius. *Lancet*, 1(7452), 1388–1391.
- Costa, M. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut*, 47(90004), 15iv–1519. https://doi.org/10.1136/gut.47.suppl_4.iv15

- Danielian, P. S., Muccino, D., Rowitch, D. H., Michael, S. K. & McMahon, A. P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Current Biology* 8, 1323-1326. doi:10.1016/S0960-9822(07)00562-3
- da Silva, P. H. R., Borges, B. C., Uehara, I. A., Soldi, L. R., de Araújo, R. A., & Silva, M. J. B. (2021). Chemokines and the extracellular matrix: Set of targets for tumor development and treatment. *Cytokine*, 144, 155548. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155548>
- Dar, A., Schajnovitz, A., Lapid, K., Kalinkovich, A., Itkin, T., Ludin, A., Kao, W. M., Battista, M., Tesio, M., Kollet, O., Cohen, N.N., Margalit, R., Buss, E.C., Baleux, F., Oishi, S., Fujii, N., Larochelle, A., Dunbar, C.E., Broxmeyer, H.E., Frenette, P.S. & Lapidot, T. (2011). Rapid mobilization of hematopoietic progenitors by AMD3100 and catecholamines is mediated by CXCR4-dependent SDF-1 release from bone marrow stromal cells. *Leukemia*, 25(8), 1286–1296. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.62>
- Das, R. M., Van Hateren, N. J., Howell, G. R., Farrell, E. R., Bangs, F. K., Porteous, V. C., Manning, E. M., McGrew, M. J., Ohyama, K., Sacco, M. A., Halley, P.A., Sang, H.M., Storey, K.G., Placzek, M., Tickle, C., Nair, V.K. & Wilson, S.A. (2006). A robust system for RNA interference in the chicken using a modified microRNA operon. *Developmental Biology*, 294(2), 554–563. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.02.020>
- De Clercq, E. (2003). The bicyclam AMD3100 story. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(7), 581–587.
- De La Luz Sierra, M., Yang, F., Narazaki, M., Salvucci, O., Davis, D., Yarchoan, R., Zhang, H. H., Fales, H., & Tosato, G. (2004). Differential processing of stromal-derived factor-1 and stromal-derived factor-1 explains functional diversity. *Blood*, 103(7), 2452–2459. <https://doi.org/10.1182/blood-2003>
- Delalande, J.-M., Thapar, N., & Burns, A. J. (2015). Dual Labeling of Neural Crest Cells and Blood Vessels Within Chicken Embryos Using Chick(GFP) Neural Tube Grafting and Carbocyanine Dye DiI Injection. *Journal of Visualized Experiments*, 99. <https://doi.org/10.3791/52514>
- Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Köprunner, M., Dörries, J., Meyer, D., Esguerra, C.V., Leung, T., & Raz E. (2002). Guidance of Primordial Germ Cell Migration by the Chemokine SDF-1. *Cell*, 111(5), 647–659. <http://www.cell.com/cgi/content/full/111/5/>

- Dora, D., Arciero, E., Hotta, R., Barad, C., Bhave, S., Kovacs, T., Balic, A., Goldstein, A. M., & Nagy, N. (2018). Intraganglionic macrophages: a new population of cells in the enteric ganglia. *Journal of Anatomy*, 233(4), 401–410. <https://doi.org/10.1111/joa.12863>
- Dora, D., Fejszak, N., Goldstein, A. M., Minko, K., & Nagy, N. (2017). Ontogeny of ramified CD45 cells in chicken embryo and their contribution to bursal secretory dendritic cells. *Cell and Tissue Research*, 368(2), 353–370. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2595-y>
- Dora, D., Ferenczi, S., Stavely, R., Toth, V. E., Varga, Z. V., Kovacs, T., Bodi, I., Hotta, R., Kovacs, K. J., Goldstein, A. M., & Nagy, N. (2021). Evidence of a Myenteric Plexus Barrier and Its Macrophage-Dependent Degradation During Murine Colitis: Implications in Enteric Neuroinflammation. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 12(5), 1617–1641. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.07.003>
- Eisen, J. S., & Smith, J. C. (2008). Controlling morpholino experiments: Don't stop making antisense. In *Development* (Köt. 135, Szám 10, o. 1735–1743). <https://doi.org/10.1242/dev.001115>
- Epstein, M. L., & Poulsen, K. T. (1991). Appearance of Somatostatin and Vasoactive Intestinal Peptide Along the Developing Chicken Gut. In *The Journal Of Comparative Neurology* (Köt. 311).
- Erickson, C. S., Lee, S. J., Barlow-Anacker, A. J., Druckenbrod, N. R., Epstein, M. L., & Gosain, A. (2014). Appearance of cholinergic myenteric neurons during enteric nervous system development: Comparison of different ChAT fluorescent mouse reporter lines. *Neurogastroenterology and Motility*, 26(6), 874–884. <https://doi.org/10.1111/nmo.12343>
- Erickson, C. S., Zaitoun, I., Haberman, K. M., Gosain, A., Druckenbrod, N. R., & Epstein, M. L. (2012). Sacral neural crest-derived cells enter the aganglionic colon of Ednrb^{-/-} mice along extrinsic nerve fibers. *Journal of Comparative Neurology*, 520(3), 620–632. <https://doi.org/10.1002/cne.22755>
- Escot, S., Blavet, C., Faure, E., Zaffran, S., Duband, J.L. & Fournier-Thibault, C. (2016). Disruption of CXCR4 signaling in pharyngeal neural crest cells causes DiGeorge syndrome-like malformations. *Development*. 143(4):582-8. doi: 10.1242/dev.126573.
- Escot, S., Blavet, C., Härtle, S., Duband, J. L., & Fournier-Thibault, C. (2013). Misregulation of SDF1-CXCR4 signaling impairs early cardiac neural crest cell migration leading to conotruncal defects. *Circulation Research*, 113(5), 505–516. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301333>

- Espinosa-Medina, I., Outin, E., Picard, C. A., Chettouh, Z., Dymecki, S., Consalez, G. G., Coppola, E., & Brunet, J.-F. (2014). Parasympathetic ganglia derive from Schwann cell precursors. *Science*, *345*(6192), 87–90. <https://doi.org/10.1126/science.1253286>
- Espinosa-Medina, I., Saha, O., Boismoreau, F., Chettouh, Z., Rossi, F., Richardson, W. D., & Brunet, J. F. (2016). The sacral autonomic outflow is sympathetic. *Science*, *354*(6314), 893–897. <https://doi.org/10.1126/science.aah5454>
- Fejszák, N., Kocsis, K., Halasy, V., Szócs, E., Soós, Á., Roche, D.V., Härtle, S. & Nagy, N. (2022). Characterization and functional properties of a novel monoclonal antibody which identifies a B cell subpopulation in bursa of Fabricius. *Poultry Science* 101(4):101711. doi: 10.1016/j.psj.2022.101711.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, & Berger EA. (1996). HIV-1 Entry Cofactor_ Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. *Science*, *272*(5263), 872–877.
- Freitas, C., Bignon, A., Balabanian, K., & Dalloul, A. (2014). CXCR4 in Central and Peripheral Lymphoid Niches – Physiology, Pathology and Therapeutic Perspectives in Immune Deficiencies and Malignancies. In *Adult Stem Cell Niches*. InTech. <https://doi.org/10.5772/58699>
- Frykman, P.K., Cheng, Z., Wang, X. & Dhall, D. (2015) Enterocolitis causes profound lymphoid depletion in endothelin receptor B- and endothelin 3-null mouse models of Hirschsprung-associated enterocolitis. *European Journal of Immunology* 45(3):807-17. doi: 10.1002/eji.201444737.
- Fu, M., Tam, P. K. H., Sham, M. H., & Lui, V. C. H. (2004). Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: A topographical study. *Anatomy and Embryology*, *208*(1), 33–41. <https://doi.org/10.1007/s00429-003-0371-0>
- Fu, M., Vohra, B. P. S., Wind, D., & Heuckeroth, R. O. (2006). BMP signaling regulates murine enteric nervous system precursor migration, neurite fasciculation, and patterning via altered Ncam1 polysialic acid addition. *Developmental Biology*, *299*(1), 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.07.016>
- Fung, C., & Vanden Berghe, P. (2020). Functional circuits and signal processing in the enteric nervous system. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Köt. 77, Szám 22, o. 4505–4522). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03543-6>

- Furness, J. B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. In *Journal of the Autonomic Nervous System* (Köt. 81). www.elsevier.com/locate/jans
- Furness JB. (2006). The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections. *Autonomic Neuroscience* 130(1-2):1-5. doi: 10.1016/j.autneu.2006.05.003.
- Furness, J. B., Callaghan, B. P., Rivera, L. R., & Cho, H. J. (2014). The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: Integrated local and central control. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 817, 39–71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_3
- Gandhi, S., Piacentino, M. L., Vieceli, F. M., & Bronner, M. E. (2017). Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing for loss-of-function in the early chick embryo. *Developmental Biology*, 432(1), 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.08.036>
- Garceau, V., Balic, A., Garcia-Morales, C., Sauter, K. A., McGrew, M. J., Smith, J., Vervelde, L., Sherman, A., Fuller, T. E., Oliphant, T., Shelley, J. A., Tiwari, R., Wilson, T.L., Chintoan-Uta, C., Burt, D.W., Stevens, M.P., Sang, H.M. & Hume, D.A. (2015). The development and maintenance of the mononuclear phagocyte system of the chick is controlled by signals from the macrophage colony-stimulating factor receptor. *BMC Biology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0121-9>
- Gianino, S., Grider, J. R., Cresswell, J., Enomoto, H., & Heuckeroth, R. O. (2003). GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation. In *Development* (Köt. 130, Szám 10, o. 2187–2198). <https://doi.org/10.1242/dev.00433>
- Glick, B. (1994). The Bursa of Fabricius: The Evolution of a Discovery. *Poultry Science*, 73(7), 979–983.
- Goldstein, A. M., Brewer, K. C., Doyle, A. M., Nagy, N., & Roberts, D. J. (2005). BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mechanisms of Development*, 122(6), 821–833. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2005.03.003>
- Goldstein, A. M., Hofstra, R. M. W., & Burns, A. J. (2013). Building a brain in the gut: Development of the enteric nervous system. *Clinical Genetics*, 83(4), 307–316. <https://doi.org/10.1111/cge.12054>
- Goldstein, A. M., Thapar, N., Karunaratne, T. B., & De Giorgio, R. (2016). Clinical aspects of neurointestinal disease: Pathophysiology, diagnosis, and treatment. In *Developmental*

- Biology* (Köt. 417, Szám 2, o. 217–228). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.03.032>
- Gonella, J., Bouvier, M. & Blanquet F. (1987). Extrinsic nervous control of motility of small and large intestines and related sphincters. *Physiological Reviews* 67(3):902-61. doi: 10.1152/physrev.1987.67.3.902.
- Gosain, A., & Brinkman, A. S. (2015). Hirschsprung's associated enterocolitis. *Current Opinion in Pediatrics*, 27(3), 364–369. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000210>
- Graham, H. K., Maina, I., Goldstein, A. M., & Nagy, N. (2017). Intestinal smooth muscle is required for patterning the enteric nervous system. *Journal of Anatomy*, 230(4), 567–574. <https://doi.org/10.1111/joa.12583>
- Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*, 195(4), 231–272. <https://doi.org/10.1002/AJA.1001950404>
- Hartmann, T. N., Burger, J. A., Glodek, A., Fujii, N., & Burger, M. (2005). CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene*, 24(27), 4462–4471. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208621>
- Heanue, T. A., Shepherd, I. T., & Burns, A. J. (2016). Enteric nervous system development in avian and zebrafish models. In *Developmental Biology* (Köt. 417, Szám 2, o. 129–138). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.05.017>
- Heanue, T.A. & Pachnis, V. (2007). Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nature Reviews Neuroscience* 8(6):466-79. doi: 10.1038/nrn2137. Erratum in: *Nat Rev Neurosci.* 2007 Jul;8(7):568.
- Hearn, C. J., Murphy, M., & Newgreen, D. (1998). GDNF and ET-3 Differentially Modulate the Numbers of Avian Enteric Neural Crest Cells and Enteric Neurons *in vitro*. In *Developmental Biology* (Köt. 197).
- Heuckeroth, R.O. (2018). Hirschsprung disease - integrating basic science and clinical medicine to improve outcomes. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*.15(3):152-167. doi: 10.1038/nrgastro.2017.149.
- Heusinkveld, L. E., Majumdar, S., Gao, J. L., McDermott, D. H., & Murphy, P. M. (2019). WHIM Syndrome: from Pathogenesis Towards Personalized Medicine and Cure. In

- Journal of Clinical Immunology* (Köt. 39, Szám 6, o. 532–556). Springer New York LLC.
<https://doi.org/10.1007/s10875-019-00665-w>
- Hilla, A. M., Baehr, A., Leibinger, M., Andreadaki, A. & Fischer, D. (2021). CXCR4/CXCL12-mediated entrapment of axons at the injury site compromises optic nerve regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 118, e2016409118. doi:10.1073/pnas.2016409118
- Hirschsprung, H. (1888). StuhltragheitNeugeborener in Folge von Dilatation und Hypertrophie des Colons. *Jahrb. Kinder*. 27, 1–7.
- His, W. (1868). Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbelthierleibes. Die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei. *Leipzig: Vogel*. 237(12).
- Holland, S. K., Hessler, R. B., Reid-Nicholson, M. D., Ramalingam, P., & Lee, J. R. (2010). Utilization of peripherin and S-100 immunohistochemistry in the diagnosis of Hirschsprung disease. *Modern Pathology*, 23(9), 1173–1179.
<https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.104>
- Hughes, C. E., & Nibbs, R. J. B. (2018). A guide to chemokines and their receptors. In *FEBS Journal* (Köt. 285, Szám 16, o. 2944–2971). Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1111/febs.14466>
- Huynh, C., Dingemans, J., Meyer zu Schwabedissen, H. E., & Sidharta, P. N. (2020). Relevance of the CXCR4/CXCR7-CXCL12 axis and its effect in pathophysiological conditions. In *Pharmacological Research* (Köt. 161). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105092>
- Hwang, S. & Kapur, R.P. (2020). Advances and Pitfalls in the Diagnosis of Hirschsprung Disease. *Surgical Pathology Clinics* 13(4):567-579. doi: 10.1016/j.path.2020.07.001.
- Hynes, R. O., & Lander, A. D. (1992). Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell*, 68(2), 303–322.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90472-O](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90472-O)
- Ivins, S., Chappell, J., Vernay, B., Suntharalingham, J., Martineau, A., Mohun, T. J., & Scambler, P. J. (2015). The CXCL12/CXCR4 Axis Plays a Critical Role in Coronary Artery Development. *Developmental Cell*, 33(4), 455–468.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.03.026>

- Jacobs-Li, J., Tang, W., Li, C., & Bronner, M. E. (2023). Single-cell profiling coupled with lineage analysis reveals vagal and sacral neural crest contributions to the developing enteric nervous system. *eLife*, *12*. <https://doi.org/10.7554/eLife.79156>
- Jänig, W. (2022). The Enteric Nervous System. In: The Integrative Action of the Autonomic Nervous System: Neurobiology of Homeostasis. *Cambridge University Press*; 2022:134-164. <https://doi.org/10.1017/9781108778411>
- Jiang, Y., Liu, M. tsai, & Gershon, M. D. (2003). Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Developmental Biology*, *258*(2), 364–384. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00136-2](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00136-2)
- Kaelberer, M. M., Buchanan, K. L., Klein, M. E., Barth, B. B., Montoya, M. M., Shen, X., & Bohórquez, D. V. (2018). A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. *Science*, *361*(6408). <https://doi.org/10.1126/science.aat5236>
- Kaiser P, Poh TY, Rothwell L, Avery S, Balu S, Pathania US, Hughes, S., Goodchild, M., Morrell, S., Watson, M., Bumstead, N., Kaufman, J. & Young, J.R. (2005). A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. *Journal of Interferon & Cytokine Research* *25*:467–84. doi: 10.1089/jir.2005.25.467
- Kang, Y. N., Fung, C., & Berghe, P. Vanden. (2021). Gut innervation and enteric nervous system development: A spatial, temporal and molecular tour de force. In *Development (Cambridge)* (Köt. 148, Szám 3). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dev.182543>
- Kapur, R. P. (2000). Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: Experimental support for an evolutionarily conserved model. *Developmental Biology*, *227*(1), 146–155. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9886>
- Kapur, R. P. (2009). Practical pathology and genetics of Hirschsprung’s disease. *Seminars in Pediatric Surgery*, *18*(4), 212–223. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2009.07.003>
- Kapur, R.P. (2016). Histology of the Transition Zone in Hirschsprung Disease. *The American Journal of Surgical Pathology* *40*(12):1637-1646. doi: 10.1097/PAS.0000000000000711.
- Kasemeier-Kulesa, J. C., McLennan, R., Romine, M. H., Kulesa, P. M., & Lefcort, F. (2010). CXCR4 controls ventral migration of sympathetic precursor cells. *Journal of Neuroscience*, *30*(39), 13078–13088. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0892-10.2010>

- Keast, J. R. (1995). Visualization and immunohistochemical characterization of sympathetic and parasympathetic neurons in the male rat major pelvic ganglion. *Neuroscience*, 66(3), 655–662.
- Keast, J. R. (2006). Plasticity of pelvic autonomic ganglia and urogenital innervation. In *International Review of Cytology* (Köt. 248, o. 141–208). [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)48003-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)48003-7)
- Kirchgessner, A. L., & Gershon, M. D. (1990). Innervation of the Pancreas by Neurons in the Gut. In *The Journal of Neuroscience*. 10(5): 1626-1642
- Klein, R.S., Rubin, J.B., Gibson, H.D., DeHaan, E.N., Alvarez-Hernandez, X., Segal, R.A., & Luster, A.D. (2001). SDF-1 alpha induces chemotaxis and enhances Sonic hedgehog-induced proliferation of cerebellar granule cells. *Development* 128(11), 1971–1981.
- Komori, S., Kanamaru, Y., & Ohashi, H. (1984). A Smooth Muscle Excitatory Material from the Nerve of Remak of the Chicken Rectum. *The Japanese Journal of Pharmacology* 36(4), 431–440.
- Komori, S., Matsuo, K., & Ohashi, H. (1988). Development before and after hatching of non-cholinergic excitatory innervation to the rectum via Remak's nerve in the fowl. In *British Journal of Pharmacology* (Köt. 95).
- Komori, S., & Ohashi, H. (1982). Some characteristics of transmission from non-adrenergic, non-cholinergic excitatory nerves to the smooth muscle of the chicken. In *Journal of the Autonomic Nervous System* (Köt. 6).
- Korte J, Fröhlich T, Kohn M, Kaspers B, Arnold GJ & Härtle S. (2013). 2D DIGE analysis of the bursa of Fabricius reveals characteristic proteome profiles for different stages of chicken B-cell development. *Proteomics*. 13(1):119-33. doi: 10.1002/pmic.201200177.
- Kos, R., Tucker, R. P., Hall, R., Duong, T. D., & Erickson, C. A. (2003). Methods for introducing morpholinos into the chicken embryo. *Developmental Dynamics*, 226(3), 470–477. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10254>
- Kovács, T., Halasy, V., Pethő, C., Szőcs, E., Soós, Á., Dóra, D., de Santa Barbara, P., Faure, S., Stavely, R., Goldstein, A. M., & Nagy, N. (2023). Essential Role of BMP4 Signaling in the Avian Ceca in Colorectal Enteric Nervous System Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21), 15664. <https://doi.org/10.3390/ijms242115664>
- Kruepunga, N., Hikspoors, J. P. J. M., Hülsman, C. J. M., Mommen, G. M. C., Köhler, S. E., & Lamers, W. H. (2020a). Development of extrinsic innervation in the abdominal

- intestines of human embryos. *Journal of Anatomy*, 237(4), 655–671.
<https://doi.org/10.1111/joa.13230>
- Kruepunga, N., Hikspoors, J. P. J. M., Hülsman, C. J. M., Mommen, G. M. C., Köhler, S. E., & Lamers, W. H. (2020b). Extrinsic innervation of the pelvic organs in the lesser pelvis of human embryos. *Journal of Anatomy*, 237(4), 672–688.
<https://doi.org/10.1111/joa.13229>
- Kuo, B. R., & Erickson, C. A. (2010a). Regional differences in neural crest morphogenesis. In *Cell Adhesion and Migration* (Köt. 4, Szám 4, o. 567–585). Taylor and Francis Inc.
<https://doi.org/10.4161/cam.4.4.12890>
- Kuo, B. R., & Erickson, C. A. (2010b). Regional differences in neural crest morphogenesis. *Cell Adhesion & Migration*, 4(4), 567–585. <https://doi.org/10.4161/cam.4.4.12890>
- Kurtz, A., Zimmer, A., Schnütgen, F., Brüning, G., Spener, F. & Müller, T. (1994). The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development* 120, 2637–2649.
- Laddach, A., Chng, S. H., Lasrado, R., Progatzy, F., Shapiro, M., Erickson, A., Sampedro Castaneda, M., Artemov, A. V., Bon-Frauches, A. C., Amaniti, E. M., Kleinjung, J., Boeing, S., Ultanir, S., Adameyko, I., & Pachnis, V. (2023). A branching model of lineage differentiation underpinning the neurogenic potential of enteric glia. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41492-3>
- Laparidou, M., Schlickerieder, A., Thoma, T., Lengyel, K. & Schusser, B. (2020). Blocking of the CXCR4-CXCL12 Interaction Inhibits the Migration of Chicken B Cells Into the Bursa of Fabricius. *Frontiers in Immunology* 10:3057. doi: 10.3389/fimmu.2019.03057.
- Le Douarin, N. M., & Teillet, M.-A. (1973). The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. In *Embryol. exp. Morph* (Köt. 30).
- Leenders, E., & Sieber, W. K. (1970). Congenital Megacolon Observation by Frederick Ruysch-1691. In *Journal of Pediatric Surgery February* (Köt. 5, Szám 1).
- Levin, M. (1998). Left-right asymmetry and the chick embryo. In *Cell & Developmental Biology* (Köt. 9).
- Lewellis, S. W., & Knaut, H. (2012). Attractive guidance: How the chemokine SDF1/CXCL12 guides different cells to different locations. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Köt. 23, Szám 3, o. 333–340). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2012.03.009>

- Li, D. W., Liu, Z. Q., Wei, J., Liu, Y., & Hu, L. Sen. (2012). Contribution of endothelial progenitor cells to neovascularization (review). In *International Journal of Molecular Medicine* (Köt. 30, Szám 5, o. 1000–1006). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1108>
- Li, M.Z., & Masuko, S. (2001). Target specific organization and neuron types of the dog pelvic ganglia a retrograde-tracing and immunohistochemical study. *Archives of Histology and Cytology* 64(3), 267–280.
- Liang TS, Hartt JK, Lu S, Martins-Green M, Gao JL & Murphy PM. (2001). Cloning, mRNA distribution, and functional expression of an avian counterpart of the chemokine receptor/HIV coreceptor CXCR4. *Journal of Leukocyte Biology* 69:297–305. doi: 10.1189/jlb.69.2.297
- Lieberam, I., Agalliu, D., Nagasawa, T., Ericson, J., & Jessell, T. M. (2005). A Cxcl12-Cxcr4 chemokine signaling pathway defines the initial trajectory of mammalian motor axons. *Neuron*, 47(5), 667–679. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.011>
- Liu, J., Qin, J., Feng, Y., Bao, H., Zhou, Q., & Chen, Q. (2009). Distribution of vasoactive intestinal peptide and substance P messenger ribonucleic acid in intestinal nerve of Remak of chicken. *Poultry Science*, 88(7), 1421–1426. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00290>
- Liu, J., Wang, W., Feng, Y., Li, M., Bao, H., & Chen, Q. (2007). The sympathetic postganglionic and sensory innervation of oviducal magnum in hen: A cholera toxin subunit B-conjugated horseradish peroxidase study. *Journal of Anatomy*, 210(4), 439–448. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00706.x>
- Lu, M., Grove, E. A., & Miller, R. J. (2002). Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99(10), 7090–7095. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.092013799
- Lunam, C. A. (1993). Calbindin, tyrosine hydroxylase and opioid-like immunoreactivity in the intestinal nerve of Remak of the domestic fowl. In *Journal of the Autonomic Nervous System* (Köt. 44).
- Ma, Q., Jones, D., Borghesani † ‡, P. R., Segal, R. A., Nagasawa, T., Kishimoto ¶, T., Bronson, R. T., & Springer, T. A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. In *Immunology* (Köt. 95). www.pnas.org.

- Ma, Q., Jones, D., & Springer, T. A. (1999). The Chemokine Receptor CXCR4 Is Required for the Retention of B Lineage and Granulocytic Precursors within the Bone Marrow Microenvironment. In *Immunity* (Köt. 10). Berliner.
- Majumdar, R., Sixt, M., & Parent, C. A. (2014). New paradigms in the establishment and maintenance of gradients during directed cell migration. In *Current Opinion in Cell Biology* (Köt. 30, Szám 1, o. 33–40). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.010>
- Mansikka A, Sandberg M, Lassila O & Toivanen P. (1990). Rearrangement of immunoglobulin light chain genes in the chicken occurs prior to colonization of the embryonic bursa of Fabricius. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 87:9416– 20. doi: 10.1073/pnas.87.23.9416
- Mauroy, B., Demondion, X., Bizet, B., Claret, A., Mestdagh, P., & Hurt, C. (2007). The female inferior hypogastric (= pelvic) plexus: Anatomical and radiological description of the plexus and its afferences - Applications to pelvic surgery. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 29(1), 55–66. <https://doi.org/10.1007/s00276-006-0171-3>
- Mcgrath, K. E., Koniski, A. D., Maltby, K. M., Mcgann, J. K., & Palis, J. (1999). Embryonic Expression and Function of the Chemokine SDF-1 and Its Receptor, CXCR4. *Developmental Biology* 213(2), 442–456. <http://www.idealibrary.com>
- McGrew, M. J., Sherman, A., Ellard, F. M., Lillico, S. G., Gilhooley, H. J., Kingsman, A. J., Mitrophanous, K. A., & Sang, H. (2004). Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Reports*, 5(7), 728–733. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400171>
- McGrew, M. J., Sherman, A., Lillico, S. G., Ellard, F. M., Radcliffe, P. A., Gilhooley, H. J., Mitrophanous, K. A., Cambray, N., Wilson, V., & Sang, H. (2008). Localised axial progenitor cell populations in the avian tail bud are not committed to a posterior Hox identity. *Development*, 135(13), 2289–2299. <https://doi.org/10.1242/dev.022020>
- McKeown, S.J., Chow, C.W. & Young, H.M. (2001). Development of the submucous plexus in the large intestine of the mouse. *Cell and Tissue Research*. 303(2):301-5. doi: 10.1007/s004410000303.
- Memic F, Knoflach V, Morarach K, Sadler R, Laranjeira C, Hjerling-Leffler J, Sundström E, Pachnis V & Marklund U. (2018). Transcription and Signaling Regulators in Developing

- Neuronal Subtypes of Mouse and Human Enteric Nervous System. *Gastroenterology*. 154(3):624–636. doi: 10.1053/j.gastro.2017.10.005.
- Miller, R.J., Banisadr, G. & Bhattacharyya, B.J. (2008). CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development. *Journal of Neuroimmunology*. 198(1-2):31-8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.04.008.
- Milstein, C. (1999). The hybridoma revolution: an offshoot of basic research Cé sar Milstein. *Bioessays*, 21(11), 966–973.
- Monforte-Munoz, H., Gonzales-Gomez, I., Rowland, J., & Landing, B. (1998). Increased submucosal nerve trunk caliber in aganglionosis: a “positive” and objective finding in suction biopsies and segmental resections in Hirschsprung’s disease. *Arch Pathol Lab Med.*, 122(8), 721–725.
- Montalva, L., Cheng, L. S., Kapur, R., Langer, J. C., Berrebi, D., Kyrklund, K., Pakarinen, M., de Blaauw, I., Bonnard, A., & Gosain, A. (2023). Hirschsprung disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00465-y>
- Murdamoothoo, D., Sun, Z., Yilmaz, A., Riegel, G., Abou-Faycal, C., Deligne, C., Velazquez-Quesada, I., Erne, W., Nascimento, M., Mörgelin, M., Cremel, G., Paul, N., Carapito, R., Veber, R., Dumortier, H., Yuan, J., Midwood, K.S., Loustau, T. & Orend, G. (2021). Tenascin-C immobilizes infiltrating T lymphocytes through CXCL12 promoting breast cancer progression. *EMBO Molecular Medicine*, 13(6). <https://doi.org/10.15252/emmm.202013270>
- Muzumdar, M. D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L. & Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45, 593-605. doi:10.1002/dvg. 20335
- Mwizerwa, O., Das, P., Nagy, N., Akbareian, S. E., Mably, J. D., & Goldstein, A. M. (2011). Gdnf is mitogenic, neurotrophic, and chemoattractive to enteric neural crest cells in the embryonic colon. *Developmental Dynamics*, 240(6), 1402–1411. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22630>
- Nagasawa T, Tachibana K, Kishimoto T. (1998). A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection. *Seminars in Immunology* 10(3):179-85. doi: 10.1006/smim.1998.0128.
- Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H & Kishimoto T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow

- myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 382(6592):635-8. doi: 10.1038/382635a0.
- Nagy, N.; Oláh, I. & Vervelde, L.; (2022). Chapter 2 - Structure of the avian lymphoid system, Editor(s): Kaspers, B.; Schat, K. A.; Göbel, T. W.; Vervelde, L., *Avian Immunology* (Third Edition), *Academic Press*, Pages 11-44, ISBN 9780128187081, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818708-1.00027-0>.
- Nagy, N., Bódi, I., & Oláh, I. (2016b). Avian dendritic cells: Phenotype and ontogeny in lymphoid organs. *Developmental and Comparative Immunology*, 58, 47–59. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2015.12.020>
- Nagy, N., Barad, C., Graham, H., Hotta, R., Cheng, L., Fejszak, N., & Goldstein, A. M. (2016a). Sonic hedgehog controls enteric nervous system development by patterning the extracellular matrix. *Development*, 143(2), 264–275. <https://doi.org/10.1242/dev.128132>
- Nagy, N., Barad, C., Hotta, R., Bhawe, S., Arciero, E., Dora, D., & Goldstein, A. M. (2018). Collagen 18 and agrin are secreted by neural crest cells to remodel their microenvironment and regulate their migration during enteric nervous system development. *Development (Cambridge)*, 145(9). <https://doi.org/10.1242/dev.160317>
- Nagy, N., Brewer, K. C., Mwizerwa, O., & Goldstein, A. M. (2007). Pelvic plexus contributes ganglion cells to the hindgut enteric nervous system. *Developmental Dynamics*, 236(1), 73–83. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20933>
- Nagy, N., Burns, A. J., & Goldstein, A. M. (2012). Immunophenotypic characterization of enteric neural crest cells in the developing avian colorectum. *Developmental Dynamics*, 241(5), 842–851. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23767>
- Nagy, N., & Goldstein, A. M. (2006a). Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Developmental Biology*, 293(1), 203–217. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.01.032>
- Nagy, N., & Goldstein, A. M. (2006b). Intestinal coelomic transplants: A novel method for studying enteric nervous system development. *Cell and Tissue Research*, 326(1), 43–55. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0207-3>
- Nagy, N., & Goldstein, A. M. (2017). Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Köt. 66, o. 94–106). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.01.006>

- Nagy, N., Kovacs, T., Stavely, R., Halasy, V., Soos, A., Szocs, E., Hotta, R., Graham, H., & Goldstein, A. M. (2021). Avian ceca are indispensable for hindgut enteric nervous system development. *Development (Cambridge)*, *148*(22). <https://doi.org/10.1242/dev.199825>
- Nagy, N., Magyar, A., & Oláh, I. (2001). A novel monoclonal antibody identifies all avian embryonic myogenic cells and adult smooth muscle cells. *Anatomy and Embryology*, *204*(2), 123–134. <https://doi.org/10.1007/s004290100192>
- Nagy, N., Magyar, A., Tóth, M., & Oláh, I. (2004). Origin of the bursal secretory dendritic cell. *Anatomy and Embryology*, *208*(2), 97–107. <https://doi.org/10.1007/s00429-003-0378-6>
- Nagy, N., Mwiszerwa, O., Yaniv, K., Carmel, L., Pieretti-Vanmarcke, R., Weinstein, B. M., & Goldstein, A. M. (2009). Endothelial cells promote migration and proliferation of enteric neural crest cells via $\beta 1$ integrin signaling. *Developmental Biology*, *330*(2), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.03.025>
- Nakamura, H., & Funahashi, J. (2013). Electroporation: Past, present and future. In *Development Growth and Differentiation* (Köt. 55, Szám 1, o. 15–19). <https://doi.org/10.1111/dgd.12012>
- Nibbs, R. J. B., & Graham, G. J. (2013). Immune regulation by atypical chemokine receptors. In *Nature Reviews Immunology* (Köt. 13, Szám 11, o. 815–829). <https://doi.org/10.1038/nri3544>
- Niesler, B., Kuerten, S., Demir, I. E., & Schäfer, K. H. (2021). Disorders of the enteric nervous system — a holistic view. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Köt. 18, Szám 6, o. 393–410). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00385-2>
- Nishida, S., Yoshizaki, H., Yasui, Y., Kuwahara, T., Kiyokawa, E., & Kohno, M. (2018). Collagen VI suppresses fibronectin-induced enteric neural crest cell migration by downregulation of focal adhesion proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *495*(1), 1461–1467. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.184>
- Nishiyama, C., Uesaka, T., Manabe, T., Yonekura, Y., Nagasawa, T., Newgreen, D. F., Young, H. M., & Enomoto, H. (2012). Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system. *Nature Neuroscience*, *15*(9), 1211–1218. <https://doi.org/10.1038/nn.3184>
- Niu, X., Liu, L., Wang, T., Chuan, X., Yu, Q., Du, M., Gu, Y., & Wang, L. (2020). Mapping of Extrinsic Innervation of the Gastrointestinal Tract in the Mouse Embryo. *Journal of Neuroscience*, *40*(35), 6691–6708. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0309-20.2020>

- Nolf, P. (1934). Les nerfs extrinsiques de l'intestin chez l'Oiseau. Le neff de Remak. *Arch. int. Physiol.*, 39, 227–256.
- Nowak-Sliwinska, P., Segura, T., & Iruela-Arispe, M. L. (2014). The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. In *Angiogenesis* (Köt. 17, Szám 4, o. 779–804). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s10456-014-9440-7>
- Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, & Moser B. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR-fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, 382(6594), 833–835.
- Odani, N., Ito, K., & Nakamura, H. (2008). Electroporation as an efficient method of gene transfer. In *Development Growth and Differentiation* (Köt. 50, Szám 6, o. 443–448). <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01037.x>
- Oláh, I. & Nagy, N. (2013) Retrospection to discovery of bursal function and recognition of avian dendritic cells; past and present. *Developmental & Comparative Immunology* 41(3):310-5. doi: 10.1016/j.dci.2013.03.007.
- Olah, I. & Glick, B. (1995) Dendritic cells in the bursal follicles and germinal centers of the chicken's caecal tonsil express vimentin but not desmin. *The Anatomical Record* 243:384–9. doi: 10.1002/ar.1092430313
- Olesnicky Killian, E. C., Birkholz, D. A., & Artinger, K. B. (2009). A role for chemokine signaling in neural crest cell migration and craniofacial development. *Developmental Biology*, 333(1), 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.06.031>
- Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L., & Weinberg, R. A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121(3), 335–348. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.034>
- Ödemis, V., Lamp, E., Pezeshki, G., Moepps, B., Schilling, K., Gierschik, P., Littman, D. R., & Engele, J. (2005). Mice deficient in the chemokine receptor CXCR4 exhibit impaired limb innervation and myogenesis. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 30(4), 494–505. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.07.019>

- Pelletier, A. J., W van der Laan, L. J., Hildbrand, P., Siani, M. A., Thompson, D. A., Dawson, P. E., Torbett, B. E., & Salomon, D. R. (2000). Presentation of chemokine SDF-1 by fibronectin mediates directed migration of T cells. *Blood*, *96*(8), 2682–2690.
- Perris, R., Perissinotfo, D., Perry, Z., Bronner-Fraser, M., Morgelin\$ And, M., & Kimata, K. (1996). Inhibitory effects of PG-H/aggrecan and PG-M/versican on avian neural crest cell migration. *FASEB Journal* *10*(2), 293–301. www.fasebj.org
- Petit, I., Jin, D., & Rafii, S. (2007). The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends in Immunology*, *28*(7), 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.05.007>
- Pomeranz, H. D., Rothman, T. P., & Gershon, M. D. (1991). Colonization of the post-umbilical bowel by cells derived from the sacral neural crest: direct tracing of cell migration using an intercalating probe and a replication-deficient retrovirus. In *Development* (Köt. 111).
- Pomeranz, H. D., & Gershon, D. (1990). Colonization of the Avian Hindgut by Cells Derived from the Sacral Neural Crest. In *Developmental Biology* (Köt. 137).
- Pourquié, O. (2004). The chick embryo: A leading model in somitogenesis studies. In *Mechanisms of Development* (Köt. 121, Szám 9, o. 1069–1079). <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.05.002>
- Rao, M., & Gershon, M. D. (2018). Enteric nervous system development: what could possibly go wrong? In *Nature Reviews Neuroscience* (Köt. 19, Szám 9, o. 552–565). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0041-0>
- Ratcliffe, E. M. (2011). Molecular development of the extrinsic sensory innervation of the gastrointestinal tract. *Autonomic Neuroscience*, *161*(1–2), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2010.11.003>
- Ratcliffe MJ. (1985). The ontogeny and cloning of B cells in the bursa of fabricius. *Immunology Today*. *6*:223–27. doi: 10.1016/0167-5699(85)90039-8
- Raz, E. (2003). Primordial germ-cell development: The zebrafish perspective. In *Nature Reviews Genetics* (Köt. 4, Szám 9, o. 690–700). <https://doi.org/10.1038/nrg1154>
- Read LR, Cumberbatch JA, Buhr MM, Bendall AJ & Sharif S. (2005) Cloning and characterization of chicken stromal cell derived factor-1. *Developmental & Comparative Immunology* *29*:143–52. doi: 10.1016/j.dci.2004.06.010

- Reboldi A, Arnon TI, Rodda LB, Atakilit A, Sheppard D & Cyster JG. (2016). IgA production requires B cell interaction with subepithelial dendritic cells in peyer's patches. *Science*. 352:aaf4822. doi: 10.1126/science.aaf4822
- Rehimi, R., Khalida, N., Yusuf, F., Dai, F., Morosan-Puopolo, G., & Brand-Saberi, B. (2008). Stromal-derived factor-1 (SDF-1) expression during early chick development. *International Journal of Developmental Biology*, 52(1), 87–92. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072374rr>
- Rehimi, R., Khalida, N., Yusuf, F., Morosan-Puopolo, G., & Brand-Saberi, B. (2010). A novel role of CXCR4 and SDF-1 during migration of cloacal muscle precursors. *Developmental Dynamics*, 239(6), 1622–1631. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22288>
- Remak, R. (1847). *Ueber ein selbst/indiges Darmnervensystem*.
- Righetti, A., Giulietti, M., Šabanović, B., Occhipinti, G., Principato, G. & Piva, F. (2019). CXCL12 and Its Isoforms: Different Roles in Pancreatic Cancer? *Journal of Oncology* 2019:9681698. doi: 10.1155/2019/9681698.
- Rezzoug, F., Seelan, R. S., Bhattacharjee, V., Greene, R. M., & Michele Pisano, M. (2011). Chemokine-mediated migration of mesencephalic neural crest cells. *Cytokine*, 56(3), 760–768. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.09.014>
- Rocha, M., Singh, N., Ahsan, K., Beiriger, A., & Prince, V. E. (2020). Neural crest development: insights from the zebrafish. In *Developmental Dynamics* (Köt. 249, Szám 1, o. 88–111). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/dvdy.122>
- Rosenkilde, M. M., Gerlach, L. O., Jakobsen, J. S., Skerlj, R. T., Bridger, G. J., & Schwartz, T. W. (2004). Molecular mechanism of AMD3100 antagonism in the CXCR4 receptor: Transfer of binding site to the CXCR3 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(4), 3033–3041. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309546200>
- Rothstein, M., Bhattacharya, D. & Simoes-Costa M. (2018). The molecular basis of neural crest axial identity. *Developmental Biology* 444 Suppl 1(Suppl 1):S170-S180. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.07.026.
- Röthlisberger, R., Aurore, V., Boemke, S., Bangerter, H., Bergmann, M., Thalmann, G. N., & Djonov, V. (2018). The anatomy of the male inferior hypogastric plexus: What should we know for nerve sparing surgery. *Clinical Anatomy*, 31(6), 788–796. <https://doi.org/10.1002/ca.23079>

- Sachpatzidis, A., Benton, B. K., Manfredi, J. P., Wang, H., Hamilton, A., Dohlman, H. G., & Lolis, E. (2003). Identification of allosteric peptide agonists of CXCR4. *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 896–907. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204667200>
- Sato, Y., Kasai, T., Nakagawa, S., Tanabe, K., Watanabe, T., Kawakami, K., & Takahashi, Y. (2007). Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. *Developmental Biology*, 305(2), 616–624. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.01.043>
- Schemann, M., & Williams, L. (2005). Control of Gastrointestinal Motility by the ' „Gut Brain”’-The Enteric Nervous System. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. <http://journals.lww.com/jpgn>
- Schneider, S., Wright, C. M., & Heuckeroth, R. O. (2019). Unexpected Roles for the Second Brain: Enteric Nervous System as Master Regulator of Bowel Function. *Annual Review of Physiology*, 81(1), 235–259. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121515>
- Seaman, C., Anderson, R., Emery, B., & Cooper, H. M. (2001). Localization of the netrin guidance receptor, DCC, in the developing peripheral and enteric nervous systems. *Mechanisms of Development*, 103(1–2), 173–175. www.elsevier.com/locate/modo
- Scheuerer, L., M. & Raab, M. (2016). Neurovaskuläre Mobilisation des Plexus hypogastricus inferior, *Osteopathische Medizin*, Volume 17, Issue 3, Pages 4-11, [https://doi.org/10.1016/S1615-9071\(16\)30045-4](https://doi.org/10.1016/S1615-9071(16)30045-4).
- Seguella, L., & Gulbransen, B. D. (2021). Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Köt. 18, Szám 8, o. 571–587). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00423-7>
- Serbedzija, G. N., Burgan, S., Fraser, S. E., & Bronner-Fraser, M. (1991). Vital dye labelling demonstrates a sacral neural crest contribution to the enteric nervous system of chick and mouse embryos. In *Development* (Köt. 111).
- Sergi, C. (2015). Hirschsprung's disease: Historical notes and pathological diagnosis on the occasion of the 100 th anniversary of Dr. Harald Hirschsprung's death . *World Journal of Clinical Pediatrics*, 4(4), 120. <https://doi.org/10.5409/wjcp.v4.i4.120>
- Serra, A., Görgens, H., Alhadad, K., Ziegler, A., Fitze, G., & Schackert, H. K. (2009). Analysis of RET, ZEB2, EDN3 and GDNF Genomic Rearrangements in 80 Patients with

- Hirschsprung Disease (using multiplex ligation-dependent probe amplification). *Annals of Human Genetics*, 73(2), 147–151. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2008.00503.x>
- Shellard, A. & Mayor, R. (2016). Chemotaxis during neural crest migration. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 55:111-8. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.01.031.
- Shepherd, I. T., & Raper, J. A. (1999). Collapsin-1/Semaphorin D Is a Repellent for Chick Ganglion of Remak Axons. *Developmental Biology* , 212(1), 42–53. <http://www.idealibrary.com>
- Shihan, M. H., Novo, S. G., Le Marchand, S. J., Wang, Y. & Duncan, M. K. (2021). A simple method for quantitating confocal fluorescent images. *Biochemistry and Biophysics Reports* 25, 100916. doi:10.1016/j.bbrep.2021.100916
- Siekman, A. F., Standley, C., Fogarty, K. E., Wolfe, S. A., & Lawson, N. D. (2009). Chemokine signaling guides regional patterning of the first embryonic artery. *Genes and Development*, 23(19), 2272–2277. <https://doi.org/10.1101/gad.1813509>
- Sivori, M., Dempsey, B., Chettouh, Z., Boismoreau, F., Ayerdi, M., Eymael, A., Baulande, S., Lameiras, S., Couplier, F., Delattre, O., Rohrer, H., Mirabeau, O. & Brunet, J.F. (2024). The pelvic organs receive no parasympathetic innervation. *Elife*. 12:RP91576. doi: 10.7554/eLife.91576.
- Soret, R., Menetrey, M., Bergeron, K. F., Dariel, A., Neunlist, M., Grunder, F., Faure, C., Silversides, D. W., & Pilon, N. (2015). A collagen VI–dependent pathogenic mechanism for Hirschsprung’s disease. *Journal of Clinical Investigation*, 125(12), 4483–4496. <https://doi.org/10.1172/JCI83178>
- Southwell, B.R. (2006). Staging of intestinal development in the chick embryo. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 288(8):909-20. doi: 10.1002/ar.a.20349.
- Spencer, N. J., & Hu, H. (2020). Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Köt. 17, Szám 6, o. 338–351). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0271-2>
- Spinosa, P. C., Luker, K. E., Luker, G. D., & Linderman, J. J. (2017). The CXCL12/CXCR7 signaling axis, isoforms, circadian rhythms, and tumor cellular composition dictate gradients in tissue. *PLoS ONE*, 12(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187357>
- Srinivasan, A., & Toh, Y. C. (2019). Human pluripotent stem cell-derived neural crest cells for tissue regeneration and disease modeling. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Köt. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00039>

- Stebler, J., Spieler, D., Slanchev, K., Molyneaux, K. A., Richter, U., Cojocaru, V., Tarabykin, V., Wylie, C., Kessel, M., & Raz, E. (2004). Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: The role of the chemokine SDF-1/CXCL12. *Developmental Biology*, 272(2), 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.05.009>
- Stern, C. D. (2004). The chick embryo - Past, present and future as a model system in developmental biology. In *Mechanisms of Development* (Köt. 121, Szám 9, o. 1011–1013). <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.06.009>
- Stoller, J. Z., & Epstein, J. A. (2005). Cardiac neural crest. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Köt. 16, Szám 6, o. 704–715). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2005.06.004>
- Suzuki, M., Ohmori, Y., & Watanabe, T. (1996). Autonomic Nervous System Projections of neurons in the intestinal nerve of Remak to the chicken intestine. In *Journal of the Autonomic Nervous System* (Köt. 61).
- Szabó, A., Szabó, S., & Mayor, R. (2018). Mechanisms of Neural Crest Migration. *Annual Review of Genetics*, 52, 43–63. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417>
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., Kishimoto, T. & Nagasawa T. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, 393(6685), 591–594.
- Takabatake, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Matsusaka, T., Kurihara, H., Koni, P. A., Nagasawa, Y., Hamano, T., Matsui, I., Kawada, N., Imai, E., Nagasawa, T., Rakugi, H., & Isaka, Y. (2009). The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis is essential for the development of renal vasculature. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(8), 1714–1723. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008060640>
- Tanaka, D. H., Mikami, S., Nagasawa, T., Miyazaki, J. I., Nakajima, K., & Murakami, F. (2010). CXCR4 is required for proper regional and laminar distribution of cortical somatostatin-, calretinin-, and neuropeptide y-expressing gabaergic interneurons. *Cerebral Cortex*, 20(12), 2810–2817. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq027>
- Tanaka, H., Kinutani, M., Agata, A., Takashima, Y. & Obata, K. (1990). Pathfinding during spinal tract formation in the chick-quail chimera analysed by species-specific monoclonal antibodies. *Development* 110, 565–571.

- Tang, W., Li, Y., Li, A., & Bronner, M. E. (2021). Clonal analysis and dynamic imaging identify multipotency of individual *Gallus gallus* caudal hindbrain neural crest cells toward cardiac and enteric fates. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22146-8>
- Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. (1993). Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*. 261(5121):600-3. doi: 10.1126/science.8342023.
- Teillet, M. A. (1978). Evolution of the lumbosacral neural crest in the avian embryo: Origin and differentiation of the ganglionated nerve of Remak studied in interspecific quail-chick chimaerae. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, 184(3), 251–268. <https://doi.org/10.1007/BF00848257>
- Tekenaka, A., Kawada, M., Murakami, G., Hisasue, S., Tsukamoto, T., & Fujisawa, M. (2005). Interindividual variation in distribution of extramural ganglion cells in the male pelvis: A semi-quantitative and immunohistochemical study concerning nerve-sparing pelvic surgery. *European Urology*, 48(1), 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2005.02.010>
- Thakar, D., Dalonneau, F., Migliorini, E., Lortat-Jacob, H., Boturyn, D., Albiges-Rizo, C., Coche-Guerente, L., Picart, C., & Richter, R. P. (2017). Binding of the chemokine CXCL12 α to its natural extracellular matrix ligand heparan sulfate enables myoblast adhesion and facilitates cell motility. *Biomaterials*, 123, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.022>
- Theveneau, E., Marchant, L., Kuriyama, S., Gull, M., Moepps, B., Parsons, M., & Mayor, R. (2010). Collective Chemotaxis Requires Contact-Dependent Cell Polarity. *Developmental Cell*, 19(1), 39–53. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.06.012>
- Thomas, S., Thomas, M., Wincker, P., Babarit, C., Xu, P., Speer, M. C., Munnich, A., Lyonnet, S., Vekemans, M., & Etchevers, H. C. (2008). Human neural crest cells display molecular and phenotypic hallmarks of stem cells. *Human Molecular Genetics*, 17(21), 3411–3425. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn235>
- Tickle, C. (2004). The contribution of chicken embryology to the understanding of vertebrate limb development. In *Mechanisms of Development* (Köt. 121, Szám 9, o. 1019–1029). <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.05.015>
- Timmermans, J. P., Hens, J., & Adriaensen, D. (2001). Outer submucous plexus: An intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large

- mammals and humans. *Anatomical Record*, 262(1), 71–78.
[https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20010101\)262:1<71::AID-AR1012>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20010101)262:1<71::AID-AR1012>3.0.CO;2-A)
- Tobin, C. E., & Benjamin, J. A. (1945). Anatomical and surgical restudy of Denonvilliers' fascia. *Surgery Gynecology & Obstetrics*, 80, 373–388.
- Trainor, P. A. (2005). Specification of neural crest cell formation and migration in mouse embryos. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Köt. 16, Szám 6, o. 683–693). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.06.007>
- Uchikawa, M., Takemoto, T., Kamachi, Y., & Kondoh, H. (2004). Efficient identification of regulatory sequences in the chicken genome by a powerful combination of embryo electroporation and genome comparison. In *Mechanisms of Development* (Köt. 121, Szám 9, o. 1145–1158). <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.05.009>
- Uesaka, T., Nagashimada, M., & Enomoto, H. (2015). Neuronal differentiation in schwann cell lineage underlies postnatal neurogenesis in the enteric nervous system. *Journal of Neuroscience*, 35(27), 9879–9888. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1239-15.2015>
- Veiga-Fernandes, H., Coles, M., Foster, K., Atel A, Williams, A., Natarajan, D., Barlow, A., Pachnis, V. & Kioussis, D. (2007). Tyrosine kinase receptor RET is a key regulator of Peyer's Patch organogenesis. *Nature* 446, 547–551.
<https://doi.org/10.1038/nature05597>
- Wallace, A. S., & Burns, A. J. (2005). Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell and Tissue Research*, 319(3), 367–382. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-1023-2>
- Wang, X., Chan, A. K. K., Sham, M. H., Burns, A. J., & Chan, W. Y. (2011a). Analysis of the sacral neural crest cell contribution to the hindgut enteric nervous system in the mouse embryo. *Gastroenterology*, 141(3). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.002>
- Wang, Y., Li, G., Stanco, A., Long, J. E., Crawford, D., Potter, G. B., Pleasure, S. J., Behrens, T., & Rubenstein, J. L. R. (2011b). CXCR4 and CXCR7 Have Distinct Functions in Regulating Interneuron Migration. *Neuron*, 69(1), 61–76.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.005>
- Wanigasekara, Y., Kepper, M. E., & Keast, J. R. (2003). Immunohistochemical characterisation of pelvic autonomic ganglia in male mice. *Cell and Tissue Research*, 311(2), 175–185.
<https://doi.org/10.1007/s00441-002-0673-1>

- Warner, N., Szenberg, A., & Burnet, F. (1962). THE IMMUNOLOGICAL ROLE OF DIFFERENT LYMPHOID ORGANS IN THE CHICKEN. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 40(5), 373–388. <https://doi.org/10.1038/icb.1962.42>
- Weinstein, P.D., Mage, R.G. & Anderson, A.O. (1994). The appendix functions as a mammalian bursal equivalent in the developing rabbit. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 355:249-53. doi: 10.1007/978-1-4615-2492-2_42.
- Weskamp, G. & Reichardt, L. F. (1991). Evidence that biological activity of NGF is mediated through a novel subclass of high affinity receptors. *Neuron* 6, 649–663.
- Whitman, M. C., Nguyen, E. H., Bell, J. L., Tenney, A. P., Gelber, A., & Engle, E. C. (2018). Loss of CXCR4/CXCL12 signaling causes oculomotor nerve misrouting and development of motor trigeminal to oculomotor synkinesis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 59(12), 5201–5209. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-25190>
- Würth, R., Bajetto, A., Harrison, J.K., Barbieri, F. & Florio, T. (2014). CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8:144. doi: 10.3389/fncel.2014.00144.
- Xu, H., Lin, S., Zhou, Z., Li, D., Zhang, X., Yu, M., Zhao, R., Wang, Y., Qian, J., Li, X., Li, B., Wei, C., Chen, K., Yoshimura, T., Wang, J.M. & Huang, J. (2023) New genetic and epigenetic insights into the chemokine system: the latest discoveries aiding progression toward precision medicine. *Cellular & Molecular Immunology* 20(7):739-776. doi: 10.1038/s41423-023-01032-x.
- Yanagawa, Y., Iwabuchi, K., & Onoé, K. (2001). Enhancement of stromal cell-derived factor-1alpha-induced chemotaxis for CD4/8 double-positive thymocytes by fibronectin and laminin in mice. *Immunology*, 104(1), 43–49.
- Yahya, I., Bö ing, M., Brand-Saberi, B. & Morosan-Puopolo, G. (2021). How to distinguish between different cell lineages sharing common markers using combinations of double in-situ-hybridization and immunostaining in avian embryos: CXCR4-positive mesodermal and neural crest-derived cells. *Histochemistry and Cell Biology* 155, 145-155. doi:10.1007/s00418-020-01920-7

- Yasuda, M., Taura, Y., Yokomizo, Y. & Ekino, S. (1998). A comparative study of germinal center: fowls and mammals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 21(3):179-89. doi: 10.1016/s0147-9571(98)00007-1.
- Yntema, C. L., & Hammond, W. S. (1954). The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J Comp Neurol.* , 101(2), 515–541.
- Yntema, C. L., & Hammond, W. S. (1955). Experiments on the origin and development of the sacral autonomic nerves in the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology*, 129(2), 375–413.
- Yoshida, R., Imai, T., Hieshima, K., Kusuda, J., Baba, M., Kitaura, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Nomiyama, H., & Yoshie, O. (1997). Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13803–13809. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13803>
- Young, H. M., Hearn, C. J., Ciampoli, D., Southwell, B. R., Brunet, J.-F., & Newgreen, D. F. (1998). A Single Rostrocaudal Colonization of the Rodent Intestine by Enteric Neuron Precursors Is Revealed by the Expression of Phox2b, Ret, and p75 and by Explants Grown under the Kidney Capsule or in Organ Culture. *Developmental Biology*, 202(1), 67–84.
- Young, H. M., Hearn, C. J., Farlie, P. G., Canty, A. J., Thomas, P. Q., & Newgreen, D. F. (2001). GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells. *Developmental Biology*, 229(2), 503–516. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0100>
- Young, H. M., Turner, K. N., & Bergner, A. J. (2005). The location and phenotype of proliferating neural-crest-derived cells in the developing mouse gut. *Cell and Tissue Research*, 320(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-1057-5>
- Yu, Q., Liu, L., Du, M., Müller, D., Gu, Y., Gao, Z., Xin, X., Gu, Y., He, M., Marquardt, T., & Wang, L. (2024). Sacral neural crest-independent origin of the enteric nervous system in mouse. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2024.02.034>
- Yusuf, F., Rehim, R., Moroşan-Puopolo, G., Dai, F., Zhang, X., & Brand-Saberi, B. (2006). Inhibitors of CXCR4 affect the migration and fate of CXCR4+ progenitors in the developing limb of chick embryos. *Developmental Dynamics*, 235(11), 3007–3015. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20951>

- Yusuf, F., Rehim, R., Dai, F. & Brand-Saberi, B. (2005). Expression of chemokine receptor CXCR4 during chick embryo development. *Anat. Embryol.* 210, 35-41. doi:10.1007/s00429-005-0013-9
- Zhai, S.K. & Lanning, D.K. (2013). Diversification of the primary antibody repertoire begins during early follicle development in the rabbit appendix. *Molecular Immunology* 54(2):140-7. doi: 10.1016/j.molimm.2012.11.010.
- Zhang, D., Brinas, I.M., Binder, B.J., Landman, K.A. & Newgreen, D.F. (2010). Neural crest regionalisation for enteric nervous system formation: implications for Hirschsprung's disease and stem cell therapy. *Developmental Biology* 339(2):280-94. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.12.014.
- Zlotnik, A. & Yoshie, O. (2000). Chemokines: A New Classification Review System and Their Role in Immunity. *Immunity*, 12(2), 121–127.
- Zou, Y.-R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I., & Littman, D. R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 393(6685), 595–599.

10.SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Halasy, V., Szócs, E., Soós, Á., Kovács, T., Pecsenye-Fejszák, N., Hotta, R., Goldstein, A.M. & Nagy, N. (2023). CXCR4 and CXCL12 signaling regulates the development of extrinsic innervation to the colorectum. *Development* 150(8):dev201289. doi: 10.1242/dev.201289. **IF (2023): 3,7**

Nagy, N., Busalt, F., **Halasy, V.**, Kohn, M., Schmieder, S., Fejszak, N., Kaspers, B., & Härtle, S. (2020). In and Out of the Bursa-The Role of CXCR4 in Chicken B Cell Development. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01468>; **IF (2022): 7,561**

10.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk

Kovács, T., **Halasy, V. (társ-elsőszerző)**, Pethő, Cs., Szócs, E., Soós, Á., Dóra, D., de Santa Barbara P., Faure, S., Stavely, R., Goldstein, A.M. & Nagy, N. Essential Role of BMP4 Signaling in the Avian Ceca in Colorectal Enteric Nervous System Development (2023). *International Journal Of Molecular Sciences* 24 : 21 Paper: 15664 , 22 p. DOI: 10.3390/ijms242115664 **IF (2023): 4,9**

Gracheva, M., Klencsár, Z., Kovács Kis V., Béres, A. K., May, Z., **Halasy, V.**, Singh, A. Fodor,F., Solti, Á., Kiss, F. L., Tolnai, Gy., Homonnay, Z. & Kovács, K. (2023). Iron nanoparticles for plant nutrition: Synthesis, transformation, and utilization by the roots of *Cucumis sativus*. *Journal of Materials Research* 38, 1035–1047. <https://doi.org/10.1557/s43578-022-00686-z> **IF (2023): 2,7**

Fejszák, N., Kocsis, K., **Halasy, V.**, Szócs, E., Soós, Á., Roche, D. von la, Härtle, S., & Nagy, N. (2022). Characterization and functional properties of a novel monoclonal antibody which identifies a B cell subpopulation in bursa of Fabricius. *Poultry Science* 101(4). <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2022.101711>; **IF (2022): 4,4**

Nagy, N., Kovacs, T., Stavely, R., **Halasy, V.**, Soos, A., Szocs, E., Hotta, R., Graham, H. & Goldstein, A.M. (2021). Avian ceca are indispensable for hindgut enteric nervous system development. *Development* 148(22):dev199825. doi: 10.1242/dev.199825. **IF (2021): 6,862**

Nagy, N., Guyer, R.A., Hotta, R., Zhang, D., Newgreen, D.F., **Halasy, V.**, Kovacs, T. & Goldstein, A.M. (2020). RET overactivation leads to concurrent Hirschsprung disease and intestinal ganglioneuromas. *Development* 147(21):dev190900. doi: 10.1242/dev.190900. **IF (2020): 6,868**

11.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik nélkül a doktori disszertációm nem jöhetett volna létre.

Mindenekelőtt megköszönöm Témavezetőmnek, Prof. Dr. Nagy Nándornak a szakmai útmutatással, türelemmel és nélkülözhetetlen tanácsaival lehetővé tette fejlődésemet a kutatói pályán.

Köszönöm Prof. Dr. Alpár Alán jelenlegi és Prof. Dr. Szél Ágoston korábbi intézetigazgatónak, hogy lehetővé tették PhD tanulmányaim végzését a Semmelweis Egyetem, Anatómia, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Zachar Gergelynek, disszertációm bírálataért, a hasznos kritikai megjegyzéseiért.

Köszönettel tartozom PhD-s társaimnak, Szócs Emőkének és Soós Ádámnak a kísérletekben nyújtott segítségért és a baráti támogatásért.

Köszönöm Szászné Dr. Kocsis Katalinnak és Dr. Pecsénye-Fejszák Nórának, akik végig a segítségemre voltak az oktatási és kutatási feladataim elvégzésében.

Az Őssejt- és Kísérletes Embryológiai Laboratórium egykori és jelenlegi munkatársának is köszönettel tartozom a támogatásaiért: Prof. Dr. Oláh Imrének, Dr. Dóra Dávidnak, Dr. H. Minkó Krisztának, Dr. Bódi Ildikónak, Dr. Barad Csillának, Kegyes Noéminek, Kovács Tamásnak, Jancsovics Dalmának, Pethő Csongornak, Vidra Györgynének, Orbán Lilinek, Katona Tíra Pannának, Tóth Petrának, Tóth Rékának, Bogya Zsófiának, Jurenka Csengének, Gecse Zsannának és Farkas Ábelnek.

Hálás köszönemet fejezem ki mindenekelőtt férjemnek, Attilának, anyukámnak, nevelőapukámnak, testvéremnek, Krisztinek, Zsoltinak, Anitának Prestonnak és Gézának, a férjem családjának, valamint barátaimnak, Timinek, Diának, Rékának, a „Csúszómászóknak” és a „Beerológusoknak”, akik mindvégig bíztattak, érzelmileg törődtek velem és stabil háttérrel nyújtottak a PhD éveim alatt.