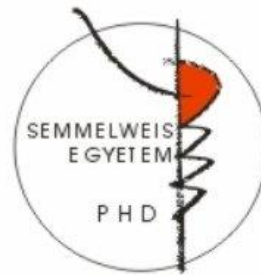


# Nyúlványos CD45+ sejtek ontogenezise a madár embrióban és a bélidegrendszer ganglionjaiban

Doktori értekezés

**Dr. Dóra Dávid László**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nagy Nándor PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Engelmann Péter PhD, egyetemi docens  
Dr. Jakus Zoltán PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kiss András DSc, egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Gócza Elen DSc, tudományos tanácsadó  
Dr. Krenács Tibor DSc, tudományos főmunkatárs

Budapest  
2018

# Tartalomjegyzék

<b>AZ ÉRTEKEZÉSBN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>4</b>
<b>1. BEVEZETÉS .....</b>	<b>5</b>
1.1 Az őssejtekről általában.....	6
1.2 Vérbépző őssejtek.....	7
1.3 Vérbépzés gerinces embrióban.....	10
1.4 Vérbépzés madár embrióban .....	16
1.5 Extraembrionális vérbépzés és a szikhólyagi HSC szerepe .....	22
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>27</b>
<b>3. ANYAGOK ES MÓDSZEREK .....</b>	<b>28</b>
3.1 Kísérleti állatok .....	28
3.2 A minták szövettani feldolgozása.....	28
3.2.1 Zselatin-szacharózos fagyasztott blokk készítése.....	29
3.2.2 Beágyazáshoz használt oldatok .....	29
3.2.3 Metszetek készítése .....	30
3.3 Savanyú foszfatáz enzimhisztokémia.....	30
3.4 Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia .....	30
3.4.1 Immuncitokémia.....	30
3.4.2 Immunfluoreszcencia.....	31
3.4.3 “Whole-mount” immunfestés .....	34
3.5 Metszetek értékelése, fényképezése, képfeldolgozás .....	34
3.6 Embriómentes szikhólyag <i>in ovo</i> tenyésztése .....	34
3.7 Csirke – fűj parabiózis.....	35
3.8 Szikhólyag kiméra .....	36
3.9 Csirke-fűj testüreg kiméra.....	37
3.10 Bursa fabricii- szikhólyag rekombináció.....	37
3.11 Embriionális bélszakaszok chorioallantois membrán (CAM) tenyésztése.....	38
<b>4. EREDMÉNYEK .....</b>	<b>39</b>

4.1 CD45+ sejtek megjelenése a korai csirke embrióban.....	39
4.2 CD45+ sejtek megjelenése és differenciálódása a primer vérképző- és nyirokszervekben.....	40
4.3 CD45+ sejtek nyomon követése a keringésben parabiosis technikával .....	48
4.4 Szikhólyag eredetű nyúlványos CD45+ sejtek kolonizálják az embrionális szöveteket .....	50
4. 5 A bursa Fabricii dendritikus sejtjei a szikhólyagból származnak.....	54
4.6 Hemopoietikus eredetű sejtek a csirke és egér bélidegrendszer ganglionjaiban .....	55
<b>5. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>62</b>
5.1 Hemopoietikus sejtek megjelenése és differenciálódása a korai csirke embrióban .....	62
5.2 Szikhólyagi eredetű CD45+ sejtek népesítik be az embrionális szöveteket és makrofágokká, valamint a bursa Fabriciiben dendritikus sejtekké differenciálódnak .....	67
5. 3. CD45+ hemopoietikus sejtek az embrionális és felnőtt bélidegrendszer ganglionjaiban .....	70
<b>6. KÖVETKEZTETÉSEK.....</b>	<b>75</b>
<b>7. ÖSSZEFOGLALÓ .....</b>	<b>76</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>77</b>
<b>9. IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>78</b>
<b>10. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK .....</b>	<b>105</b>
10.1 A disszertációhoz kapcsolódó publikációk: .....	105
10.2 A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk: .....	105
<b>11. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....</b>	<b>106</b>

**AZ ÉRTEKEZÉSBEN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

AcPhosph	savas foszfátáz
AGM	aorta-gonad-mesonephros
BF	bursa Fabricii
BSDC	bursal secretory dendritic cell (bursai szekretoros dendritikus sejt)
CAM	chorioallantois membrán
CEC	circulating endothelial cell (keringő endotél sejt)
CFU-S	colony-forming unit – spleen (kolónia formáló egység a lépben)
CSF1R	colony stimulatory factor 1 receptor (kolónia stimuláló faktor 1 receptor)
EMP	erythromyeloid progenitor (eritromieloid progenitor)
ENS	enteric nervous system (enterális idegrendszer)
FDC	follicular dendritic cell (follikuláris dendritikus sejt)
GFP	green fluorescent protein (zölden fluoreszkáló fehérje)
HH	Hamburger Hamilton stádium
HSC	hematopoietic stem cell (hemopoietikus őssejt)
IM	intraganglionic macrophage (intraganglionáris makrofág)
IPSC	induced pluripotent stem cell (indukált pluripotens őssejt)
LAMP1	lysosome associated membrane glycoprotein 1
LCA	leukocyte common antigen (közös leukocita antigén)
LMMP	longitudinal muscular myenteric plexus
LTRA	long-term repopulating ability (hosszú távú repopulációs képesség)
mAb	monoclonal antibody (monoklonális ellenanyag)
MALT	mucosa associated lymphatic tissue
MM	myenterikus makrofág
PAS	paraaortic splanchnopleura (paraaortikus splanchnopleura)
SPF	specific pathogen free (megkülönböztetett patogénektől mentes)
STRA	short-term repopulating ability (rövid távú repopulációs képesség)
TDC	thymic dendritic cell (tímusz dendritikus sejt)
YS	yolk sac (szikhólyag)

## **1. BEVEZETÉS**

Az őssejteknek sajátos tulajdonsága, hogy aszimmetrikus osztódásra képesek, mely során egy differenciált és egy differenciálatlan sejt jön létre. Ez az egyedi jellegzetesség teszi létezésüket elengedhetlenné az embrionális fejlődés, valamint a felnőtt szövetek regenerációja és megújulása során. Habár az őssejt-kutatás csak pár évtizedes múltra tekint vissza, mégis minden évben új izgalmas eredmények kerülnek publikálásra az őssejtek klinikai, terápiás felhasználásával kapcsolatban. Az őssejtek terápiás alkalmazásáról szóló híreket tévén, rádión és online oldalakon keresztül a témában laikus emberek is nagy érdeklődéssel követik. Ennek ellenére még mindig váratnak magukra az igazi áttörések az olyan súlyos, emberiség számára komoly terhet jelentő betegségek terén, mint a malignus hematológiai állapotok, Alzheimer betegség, Parkinson-kór, vagy a központi idegrendszeri trauma. Jelenleg számtalan technikai és morális aggály merül fel a humán eredetű embrionális őssejtek széleskörű klinikai alkalmazásával szemben, de a betegágy mellől egyre nagyobb az igény hatékony, őssejtekből indított sejt transzplantációk, miniatűr szervek (organoidok) bevezetésére. Mindez az őssejtkutatást és a mesterséges szövetépítést (tissue engineering), a medicina kiemelt kutatási területévé fogja tenni.

## **1.1 Az őssejtekről általában**

Az őssejt sajátos tulajdonsága, hogy mitózis közben két eltérő leánysejtet hoz létre: egy differenciált sejtet, ami csak bizonyos funkciók elvégzésére és csak bizonyos szövetféleségek létrehozására lesz képes; és egy differenciálatlan leánysejtet, ami nagyban hasonlít az anyasejtre és további asszimmetrikus osztódásokat folytatva növeli és fenntartja az eredeti őssejt populációt (*Becker et al, 1963*). Alapvetően két fajta őssejt létezik: embrionális és felnőtt típusú. Az embrionális őssejtek képesek bármilyen embrionális szövet létrehozására. A felnőtt őssejtek és a belőlük differenciálódott „progenitor” sejtek feladata viszont, a folyamatosan megújuló szövetek sejtjeinek utánpótlása (*Thompson et al, 1998*). Felnőtt, érett szövetekben az őssejtek meglehetősen ritkák, nehéz feladat felhasználható mennyiséget gyűjteni belőlük, bár bizonyos terápiás eljárások, mint az autológ csontvelő transzplantáció, a perifériás vérből való őssejt gyűjtésre épülnek. Több leukémiát és limfómát is sikerrel kezelnek ma már ezzel a módszerrel (*Wheeler et al, 1997*). Az embrionális őssejtek nagyon jó proliferációs kapacitással rendelkeznek és remekül alkalmazhatóak sejtenyészetek létrehozásához (*Thompson et al, 1998*), viszont érett szövetekbe való beültetésük -differenciálatlan formájukban- komoly veszélyt jelenthet, például tumorok kifejlődését indukálhatják (*Nussbaum et al, 2007*). Az őssejtek szabályozott körülmények között történő, *in vitro* differenciáltatása és tenyésztése viszont, számos kísérletes és klinikai kutatás eszközévé vált. Az őssejtekből indított működőképes érett szövetek, vagy akár szervek tervezése és mesterséges „scaffold”-okra való felépítése (tissue engineering), a következő évtizedek egyik legizgalmasabb, alkalmazott orvosi tudományterülete lehet (*Keirstead et al, 2005; Wu et al, 2007*).

Az elmúlt évek egyik legígéretesebb felfedezése az „indukált pluripotens őssejtek” (IPSCs). Ezek a sejtek hasonló önmegújító, és differenciációs képességekkel rendelkeznek, mint az előbb említett embrionális őssejtek (*Takahashi and Yamanaka, 2006*). Az IPSC-eket sokkal egyszerűbb nagy mennyiségben előállítani, ugyanis differenciált szöveti sejtek kellene hozzájuk. A megfelelő transzkripciós faktorok aktiválásával, *in vitro* visszadifferenciálhatóak, és indukált pluripotens őssejteké alakíthatóak. Ez a módszer nem emel annyi etikai dilemmát, mint a magzati vagy

embrionális eredetű humán őssejtekkel való kísérletezés, de célzott terápiás felhasználásukra még várni kell (*Yamanaka 2012*).

Őssejteket jó ideje használnak már a klinikai gyakorlatban is. Az autológ csontvelő transzplantáció, ami gyakorlatban egy őssejt-terápia arra alapul, hogy összegyűjtik a beteg saját perifériás őssejtjeit a vérből. Ezután magas dózisu radio- vagy kemoterápiával elpusztítják az egész hemopoietikus rendszerét, a malignus elemeket is. Az összegyűjtött, felszaporított, fagyasztva tárolt őssejteket ezután visszajuttatják a betegbe, ahol azok újranépesíthetik a csontvelőt és az egész vérképző rendszert. A hematológiai felhasználáson kívül, az őssejt-terápiákból számos más orvosi terület profitált már. Klinikai vizsgálatok bizonyítják, hogy parkinsonos betegek area striata-jába, humán embrionális mesencephalon-szövet beültetése sikeres sejt-szubsztitúciós terápiának bizonyul (*Lindvall 2003*). A degeneratív betegségeken kívül autoimmun gyulladásoos kórképekben is sikerrel használtak már őssejteket, mint sclerosis multiplex-ben, ahol hemopoietikus, mesenchymális, és neurális őssejtek képesek visszaállítani az immuntoleranciát, neuroprotektív és immunmodulációs tulajdonsággal rendelkeznek, valamint el tudják érni a plakkok regenerációját (*Meemar et al, 2016*).

## **1.2 Vérképző őssejtek**

A vérképző vagy hemopoietikus őssejtek (hematopoietic stem cells, HSCs) olyan multipotens sejtek, amelyek képesek mind a négy vérsejtvonal (eritroid, trombocitoid, mieloid, limfoid) populációinak létrehozására. Filogenetikailag a trombocitoid és eritroid sejt vonal a mieloidhoz tartozik, viszont funkciójában ez a két sejt csoport eltér a többi mieloid sejt től. Amíg az eritrociták az oxigénszállításban, a trombociták pedig a hemosztázisban vállalnak döntő szerepet, a többi mieloid sejt az immunrendszer részét képezi. A felnőtt vérképző őssejtek emlősöknél döntő többségben a csontvelőben találhatóak meg, viszont itt a magvas sejtek mindössze 0,01%-át adják (*Morrison et al, 1995; Abramson et al, 1977*). Az első HSC populációk azonosítása az 1950-es években történt, amikor röviden azokat a sejteket nevezték vérképző őssejteknek, amelyek képesek voltak a befogadó (hoszt) állat hemopoietikus rendszerét letális dózisu besugárzás után újranépesíteni (*Ford et al, 1956*). Hasonló kísérlet

jelentett áttörést, amikor besugárzott egérbe injektáltak csontvelői sejteket. A feldolgozott lépszövetben jellegzetes klonális sejtcsoportokat azonosítottak, melyek őssejtjeit „colony-forming unit”-oknak nevezték el. Ezeket a kolónia formáló egységeket sokáig a tényleges hemopoietikus őssejteknek hitték (*Lahiri et al, 1970*). Ma már tudjuk, hogy a CFU-S, vagy „colony unit forming unit in the spleen” csak rövid távú repopulációs képességgel (short-time repopulation ability, STRA) rendelkezik irradiáció után. Hosszútávú repopulációs potenciálja (LTRA) csak ezen sejtek töredékének van (*Morrison et al, 1994; Spangrude et al, 1990*). Így tehát az igazi multipotens HSC, per definitionem, azokat a mind mieloid, mind limfoid irányba differenciálódni képes őssejteket jelenti, amelyek letális dózisú besugárzás után hosszútávú repopulációs potenciállal rendelkeznek a csontvelőben.

A HSC-k azonosítása és karakterizálása a monoklonális ellenanyagok (mAb) bevezetésével kapott nagy lendületet. A humán HSC legalapvetőbb markerét, a CD34-et Civin, Tindel és munkatársaik írták le először, amikor malignus hematológiai betegség miatt kemoterápián átesett betegek vérsejtjeinek újraterelítésére próbáltak megfelelő sejtpopulációkat izolálni (*Civin et al, 1984; Tindle et al, 1985*). A CD34 egy szialomucinok közé tartozó, sejtfelszíni glikoprotein, amely adhéziós fehérjeként működik sejt-sejt közötti sejt-kapcsoló struktúrákban. A HSC-n kívül az endotél progenitor sejteken, valamint -a nyirokerek kivételével- az érett endotél sejtek felszínén is előfordul. A CD34 jelenléte egy hemopoietikus sejten biztosítja annak hosszú távú repopulációs potenciálját, viszont nem minden HSC expresszálja a CD34-et. (*Ogawa et al, 2001*). A CD34 expressziója a sejtek érése során fokozatosan lecsökken, ezért az érett csontvelőből lassan eltűnik, és csak nagyon kevés sejten fejeződik ki (1:10000) (*Civin et al, 1990*). A vérképző őssejtek azonosítása során a CD34 pozitivitása mellett fontos, hogy a HSC expresszálja a Thy-1 nevű felszíni glikoproteint és a c-kit receptort, illetve negatív legyen minden más differenciációs limfoid és mieloid markerre (Lin-), mint a CD38, CD3, CD4, CD5, CD8, CD15, CD19, CD20, CD33, CD66, vagy a Mac-1 (*Ogawa et al, 1991; Uchida et al, 1992*).

A c-kit egy protoonkogén receptor tirozin-kináz, CD117 néven is ismert molekula (*Yarden et al, 1987; Andre et al, 1997*). A HSC-n kívül a közös mieloid és limfoid progenitor sejt is expresszálja, bár az utóbbi kisebb mennyiségben. A CD117



molekulát hízósejtek felszínén, melanocitákon és a béltraktusban a Cajal-féle interstitialis sejteken is azonosították (*Edling 2007*). Funkcióját tekintve a CD117 hízósejt/össejt növekedési faktor receptor ligandja „c-kit ligand”-ként, vagy „stem cell factor”-ként ismert. A c-kit receptor szignalizációjának központi szerepe van a sejtek túlélésben, osztódásában és differenciálódásában. A receptor mutációja különböző tumorokat provokálhat (a KIT gén protoonkogén), mint a gastrointesztinális strómális tumor (GIST), a melanoma, vagy az akut mieloid leukémia (AML) (*Edling 2007; Jean-Lupe Huret 2008*). A klinikai gyakorlatban legismertebb aktivátora a G-CSF, vagy granulocita kolónia-stimuláló faktor, melyet irradiált vagy kemoterápián átesett betegek csontvelő transzplantációja után alkalmaznak a HSC-k mobilizálására. A Thy-1, vagy CD90 egy GPI (glikofoszfatidilinozitol)-hoz kötött sejt felszíni fehérje, amit eredetileg timocita-antigénként fedeztek fel (*Reif et al, 1964*). A Thy-1 szintén a hemopoietikus őssejtek egyik megbízható markere (*Craig et al, 1993*), de nem túl specifikus, ugyanis sok más sejtcsoporton is expresszálódik; emberben mesenchymális őssejteken, endotélen, simaizom sejteken, egerben az összes pre- és érett T-sejten megtalálható. A CD45 egy membrán-asszociált protein tirozin-foszfátáz receptor (PTPRC), amit közös leukocita antigénnek (LCA) is hívnak (*Knapp et al, 1995*). A CD45 nem csupán a differenciálatlan HSC-ken expresszálódik, hanem minden hemopoietikus elem megtalálható, kivéve az eritroid sejt vonalat. Az embrióban az összes differenciálódó hemopoietikus elemet, beleértve a mononukleáris sejt vonalat (makrofág, monocita), polimorfonukleáris granulocitákat, trombocitákat, limfocitákat és dendritikus sejteket is jelöli. Ellentétben a CD34-gyel, nem jelöl mesenchymális őssejteket, vagy endotél sejteket (*Kaplan et al, 1990*).

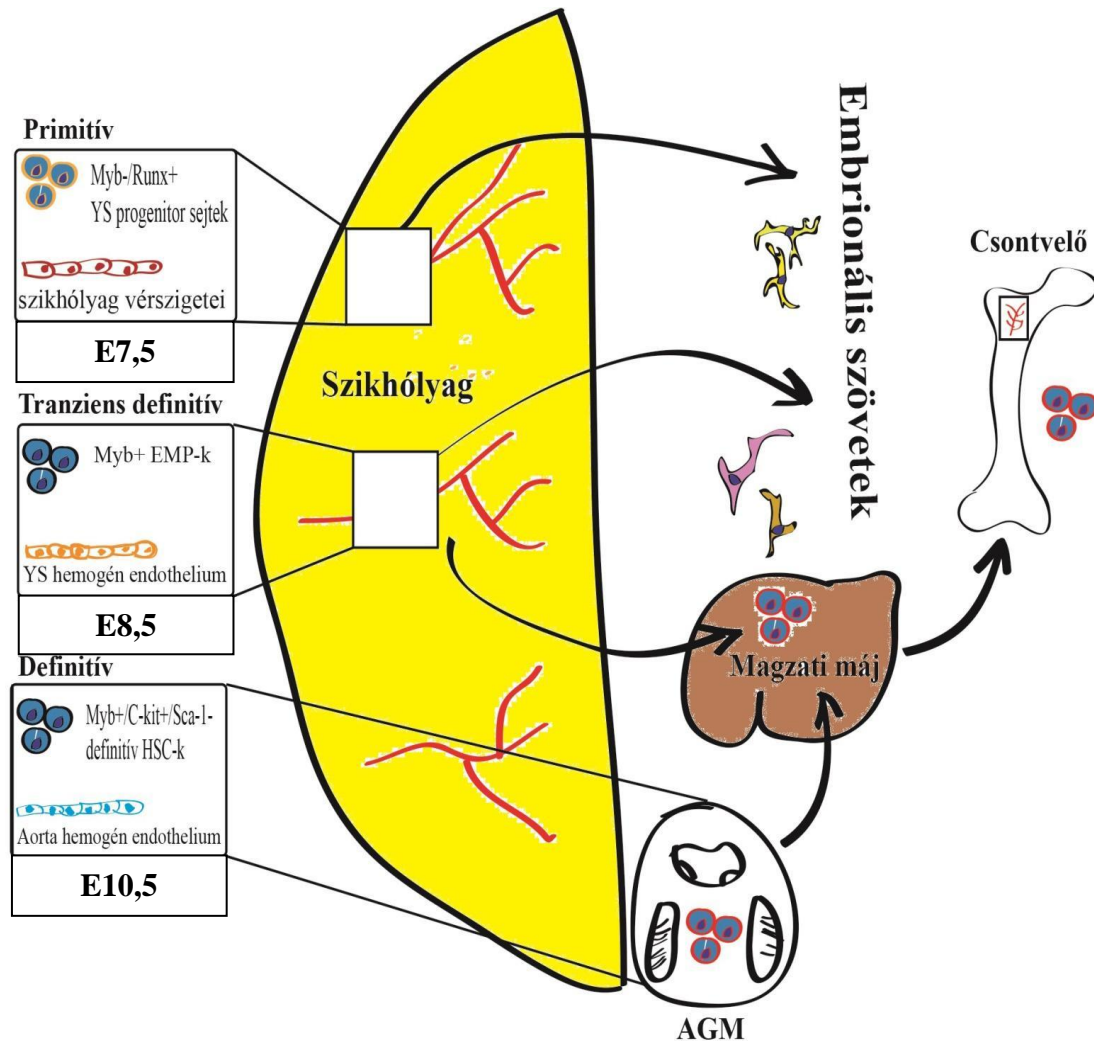
Az elmúlt évek során több kísérlet is azt igazolta, hogy a csontvelői eredetű multipotens őssejtekből hepatociták, primitív mesenchymális sejtek, izomsejtek, idegsejtek és gliasejtek is kialakulhatnak. Ezek a kísérletek a multipotens őssejtek nem várt plaszticitását, illetve transzdifferentiációs képességét fedték fel. A fetális máj egyszerre lát el élettani és vérképző funkciókat, bár mindkét funkcióért eltérő sejt vonalakat tartanak felelősnek. Újabb megfigyelések szerint kapcsolat figyelhető meg a májsejtek és a hemopoietikus sejt vonal között (*Alison et al, 2001; Theise et al, 2000; Mallet et al, 2002; Körbling et al, 2002*). Mindezt figyelembe véve, klinikai alkalmazások előtt elengedhetetlen, hogy megértsük a különböző őssejtek tulajdonságait;



benépesítő vérsejt-progenitorok intraembrionálisan keletkeznek az aorta ventrális falában (*Dieterlen-Lièvre 1975; Dieterlen-Lièvre and Martin, 1981*). A madárban elért első eredmények után más fajokban is sikerült bebizonyítani a definitív HSC intraembrionális eredetét, mint afrikai karmosbékában (*xenopus laevis*) (*Kau and Turpen, 1983; Maeno et al, 1985*), és egérben is. Emlősökben az aorta ventrális fala helyett az aorta-gonád-mesonephros (AGM) régió az első definitív, embrión belül megtalálható vérképző lokusz (*Medvinsky et al, 1993; Godin et al, 1993*). Egérben az AGM régió megjelenése a 9. embrionális napra tehető, az utána egy nappal később megjelenő, aorta dorsalis körüli mesenchyma-tömörülést paraaortikus splanchnopleurának (PAS) hívják. Ezen a területen jelennek meg a 10 és fél napos egér embrióban az első hosszú távú repopulációs potenciállal rendelkező definitív HSC-k (*Cumano et al, 1996; Medvinsky and Dzierzak, 1996*). Pár évvel később humán embrióban is leírták az AGM régiót, és annak hosszú távú repopulációs képességét a hepatikus vérképzés megjelenése előtt (*Tavian et al, 1999*). Az első intraembrionális vérképző régiók megjelenése után az aortában és az azt körülvevő mezodermban (aortaredők, AGM, PAS), a kései, érett vérképzés eltér az emlős és a madár embrióban. Amíg emlősben a fetális máj veszi át a primer hemopoietikus szerv szerepét rövidesen a definitív HSC megjelenése után, addig csirkében a lép rövid kolonizációja után a 11-12. embrionális naptól a csontvelő lesz az elsődleges vérképző szerv (*Medvinsky et al, 2011*). Emlősökben a csontvelő kolonizációja a máj hemopoietikus progenitor sejtjei által, a magzati fejlődés végén, a születés előtt történik csak meg (*Wolber et al, 2002*).

A transzgenikus egérmodellek bevezetése újabb lökést adott a különböző hemopoietikus populációk részletesebb feltérképezésére térben és időben, így a korai vérképzés az emlősökben is lassan körvonalazódni kezd. Eszerint egérben a vérképzés első hulláma a 7. embrionális napon extraembrionálisan, a szikhólyagból indul és alapvetően egy tranziens eritroid populációt hoz létre a definitív vérképzés megjelenése előtti embrionális fejlődés oxigén-igényének kielégítése érdekében. Ugyanakkor egyre több kutatási eredmény igazolja, hogy az embrionális makrofágok bizonyos szövetekben hamarabb megjelennek, mint ahogy az első definitív vérképző helyek (AGM, PAS) kialakulnak. Az agyhólyagokban például, már 8 napos egér embrióban makrofág prekursorokat lehet azonosítani, amelyekről sikerült bebizonyítani, hogy a mikroglia sejtek prekursorai és ellentétben a többi eddig azonosított makrofággal, nem a

keringésből intraembrionálisan, hanem a szikhólyagból származnak. Ezek a sejtek az aorta-környéki vérképzés megjelenése előtt kolonizálják az agyhólyagok telepét és mikroglivá differenciálódnak (*Alliot et al, 1992; Alliot et al, 1999; Ginhoux et al, 2010; Ginhoux et al, 2013*) (2. ábra). A második hullámhoz tartozó őssejtek, a „tranziens definitív” nevet kapták, mely során az embrionális fejlődés 8. napján eritromieloid prekursorok (EMP) válnak ki a szikhólyag homogén endotéliumából, és az eritroid populáción kívül, egy széles-spektrumú mieloid populációval kolonizálják a szöveteket. Ezek a sejtek még nem képesek limfoid irányba differenciálódni. Fontos megjegyezni, hogy a második hullám alatt keletkezett EMP generáció nem képes hosszú távú repopulációra letálisan irradiált állatokban, ezért tagjai nem nevezhetők definitív HSC-nek (*Frame et al, 2013*). A második szikhólyagi hemopoietikus hullámmal szinte egyidőben a 8. és 9. embrionális nap között megjelenik a paraaortikus mesenchymában az éretlen definitív HSC, amely másfél nappal később (E10,5) az AGM régióban érett, definitív HSC-ként kerül a keringésbe. Az innen származó prekursorok fogják kolonizálni a magzati májat, ami a 12. naptól kezdve az első számú vérképző szerv lesz (1. ábra) (*Godin and Cumano 2005*).



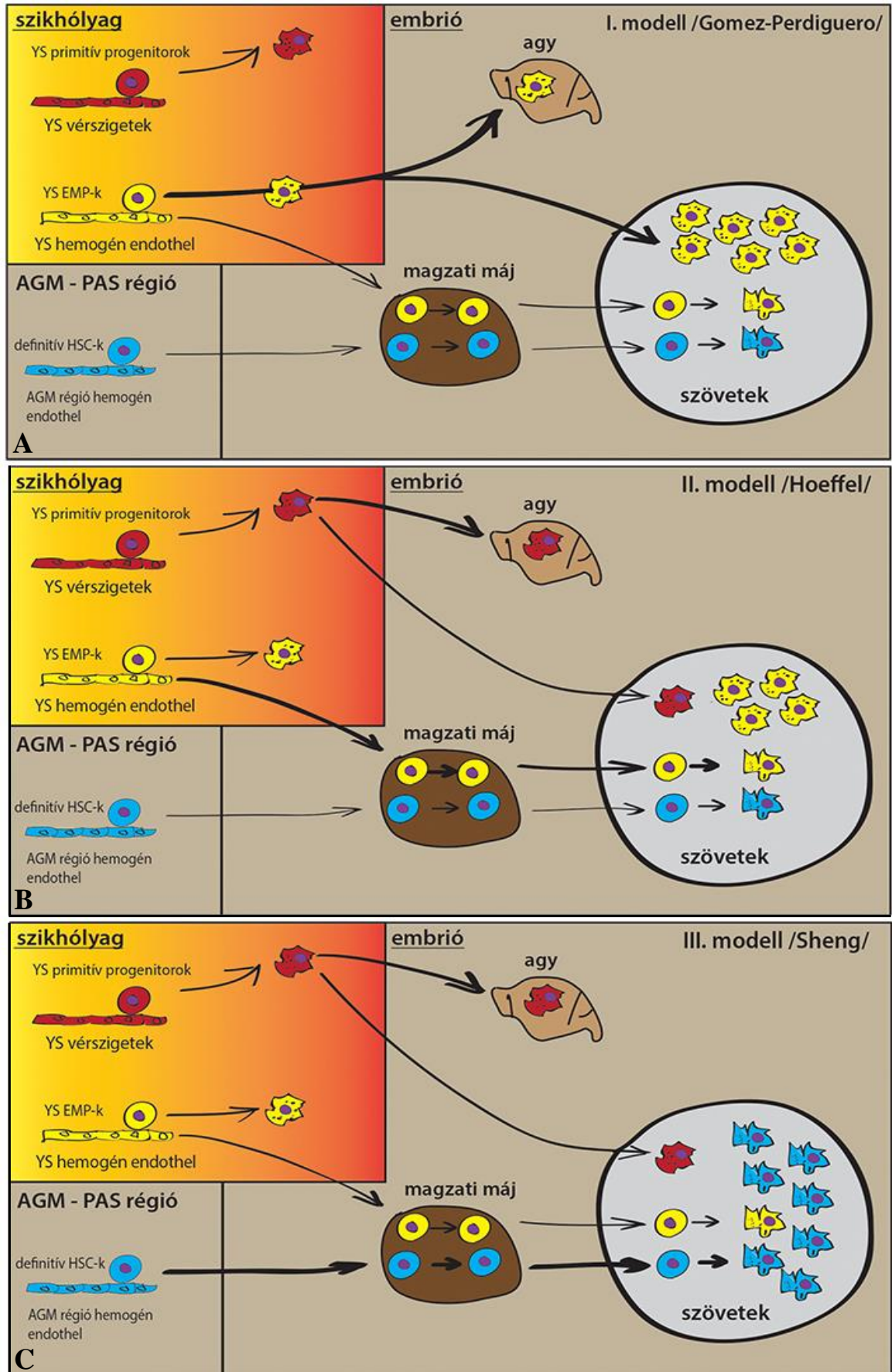
**1. ábra Primitív és definitív hemopoietikus hullámok az egér embrióban (Ginhoux után).** Az embrionális vérképzés emlősben három hullámban történik: az első a szikhólyag vérszigeteiből indul, sejtjei Myb independensek, és nem adnak prekurzorokat a magzati májba vagy az AGM-be. A második hullám a szikhólyag homogén endotéliumából indul és Myb dependens eritromieloid progenitorokkal kolonizálja a májat és az embrionális szöveteket. A harmadik, definitív hullám sejtjei intraembriónálisan képződnek az AGM-ben, majd kolonizálják a májat és a csontvelőt. Ez a populáció adja a felnőtt vérszövetek döntő részét.

A mieloidon belül a mononukleáris sejt vonal képviselői az első hullám folyamán jelennek meg az embrióban, és a CSF1R-t (kolónia-stimuláló faktor-1 receptor) expresszálják, a Myb transzkripciós faktort ellenben nem (Gomez-Perdigueró and Geissman, 2013). Ezek a szikhólyagi (yolk sac, YS) makrofágok lesznek a mikroglia elődejei az agyban és a Langerhans sejtek prekurzorai az epidermiszben (Ginhoux and Merad, 2010). Az embrionális mikroglia megőrzi Myb negativitását és pozitív a RUNX1 transzkripciós faktorra, ami jellemző az első hullámban érkező szikhólyagi

makrofágokra (*Ginhoux et al, 2010*). Egér embrióban, az embrionális keringés beindulásával egy időben a harmadik, definitív hullám által keringésbe került, (Myb+, c-Kit+, Sca-1-) mieloid progenitorok a fetális májba jutnak, ahol monocitákká, granulocitákká, definitív makrofágokká differenciálódnak, és benépesítik a szövetek nagy részét. A májból, az embrionális fejlődés végére a HSC-k egy része a csontvelőbe vándorol, és felnőtt HSC-vé differenciálódik (*Bertrand et al, 2005; Palis and Yoder, 2001*). A köztes, második hullám eritromieloid prekursorai (EMP-k) Myb+-ak, és a belőlük differenciálódó sejtek többsége a fetális májba kerül, ahol monocitává, granulocitává és definitív szöveti makrofággá differenciálódik. Feltételezik, hogy az első hullámhoz hasonlóan, ekkor is keletkezik egy szikhólyagi makrofág populáció, amely megmarad a korai embrióban, majd kolonizálja annak szerveit és szövetspecifikus rezidens makrofággá érik (*Hoeffel and Ginhoux, 2015; Ginhoux and Williams, 2015*).

A mieloid sejtek mononukleáris vonalának szövet-specifikusan differenciálódó tagjai a makrofágok. Ez a legváltozatosabb hemopoiitikus eredetű sejtcsoport, amely fagocita funkcióján kívül, a veleszületett immunitás központi irányítója. Az antigénprezentációban és a gyulladás patogenezisében kulcsfontosságú szerepet játszó makrofág prekursorokból differenciálódnak az első dendritikus sejtek is (*Steinman and Cohn, 1973*). Mindezek alapján a makrofágok embrionális ontogenezisére jelenleg három különböző modell létezik (*Hoeffel and Ginhoux, 2015; Gomez-Perdigueró et al, 2015; Sheng et al, 2015*) (2. ábra).

Bár a transzgenikus egérmodellek megjelenése nagyot lendített a hemopoiitikus sejtpopulációk ontogenezisének és vándorlásának feltérképezésében (1-2. ábra), a tamoxifen indukción alapuló Cre/loxP rekombinációs rendszerek a szikhólyagi őssejteknek nagyjából a 30%-át képesek megjelölni (*Samokhvalov et al, 2007; Ginhoux et al, 2010; Hoeffel et al, 2015*), ezért egér adatok alapján a HSC-k intraembrionális differenciálódásáról teljes képet nem kaphatunk.



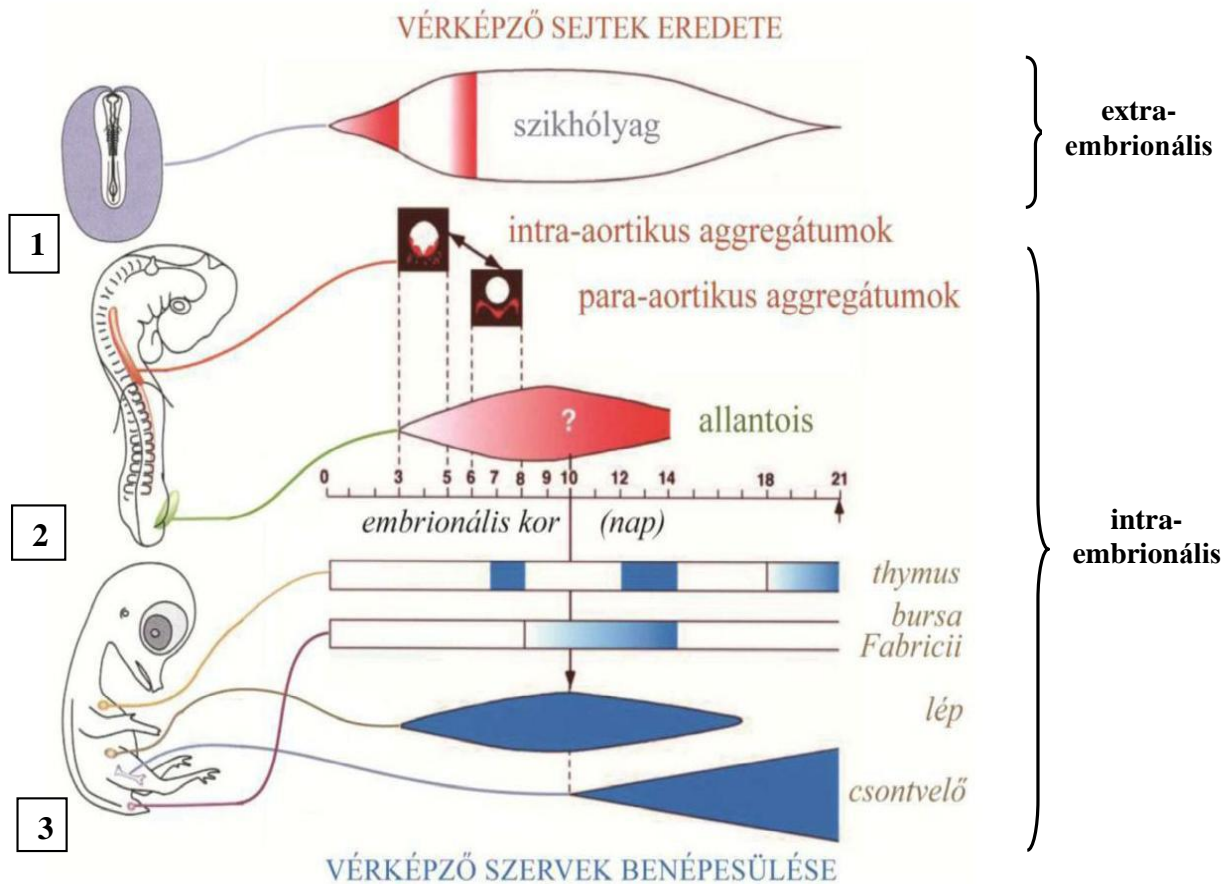




nap) határozza meg a csirke embrió fejlődését a morfológiai jegyek változása alapján (*Hamburger and Hamilton, 1951*). A HH stádiumok különösképpen a korai embrióban jelentenek nagy segítséget, mert pontosabb kormeghatározást tesznek lehetővé, mint az embrionális napok megjelölése, és egyben utalnak a fejlettségi stádiumra is szomitaszám vagy organogenetikus esemény alapján.

A vérképzés kutatása során a kiméra technikát először Dieterlen-Lièvre alkalmazta 1975-ben, mellyel paradigma-váltó felfedezést tett a definitív HSC intraembrionális eredetével kapcsolatban (*Dieterlen-Lièvre 1975; Dieterlen-Lièvre and Martin 1981*). Ezekben a kísérletekben csirke szikhólyagra az intra- és extraembrionális keringés összekapcsolódása előtt fűrj embriót ültetett, majd a kimérikus embriók szöveteit összehasonlította. A kimérák analízise során megfigyelte, hogy 6-11 nap inkubáció után a fejlődő limfomielioid szervekben, (lép és a tímusz) a vérképző sejtek fűrj, és nem csirke eredetűek (*Dieterlen-Lièvre 1975*). Később eritrociták intra-, illetve extraembrionális eredetének vizsgálatára és hemoglobinjainak összehasonlítására is alkalmazta ezt a technikát (*Beaupain et al, 1979*). Parabiózis technikát a keringésben előforduló sejtek követésének és eredetének meghatározása céljából használják a kísérletes embriológia területén. Pardanaud és Eichmann a „keringő endotél” elmélet megerősítése kapcsán (madárban) alkalmazták csirke és fűrj embrió között (*Pardanaud and Eichman, 2011*). Az embrionális szervekben megjelenő őssejtek intrinsic (szervben *in situ* megjelenő), vagy extrinsic (bevándorló) eredetéről adhatnak információt a különböző testüreg-kimérák, amelyek a bélidegrendszer neurális prekursorai vándorlásának feltérképezésére (*Nagy and Goldstein, 2006*), vagy a lép ellipszoidokat létrehozó őssejtek azonosításához (*Nagy et al, 2005*) bizonyultak alkalmas módszernek. A primordiális csírasejtek nyomon követésére, vagy a végtag bimbók fejlődésének vizsgálatára a madár embrió volt az első, alaptéziseket eldöntő experimentális modell (*Romanoff 1960; Dubois 1969; Tickle 1995*). A dúclécből származó őssejtek nyomon követésére is először madár embriót alkalmaztak, kezdetben timidin izotóppal (*Weston 1963*), később sokkal hatékonyabb csirke-fűrj kimérákkal (*Le Douarin 1980*). A transzgenikus modell-állatok megjelenésével lehetségessé vált, hogy egy fajon belül létre tudjunk hozni kimérikus graftokat. Nagy előrelépés volt az első GFP-t (green fluorescent protein) expresszáló transzgenikus csirke törzs, melynek minden szomatikus setje zöld fluoreszcenciát mutat (*McGrew et al, 2004*).

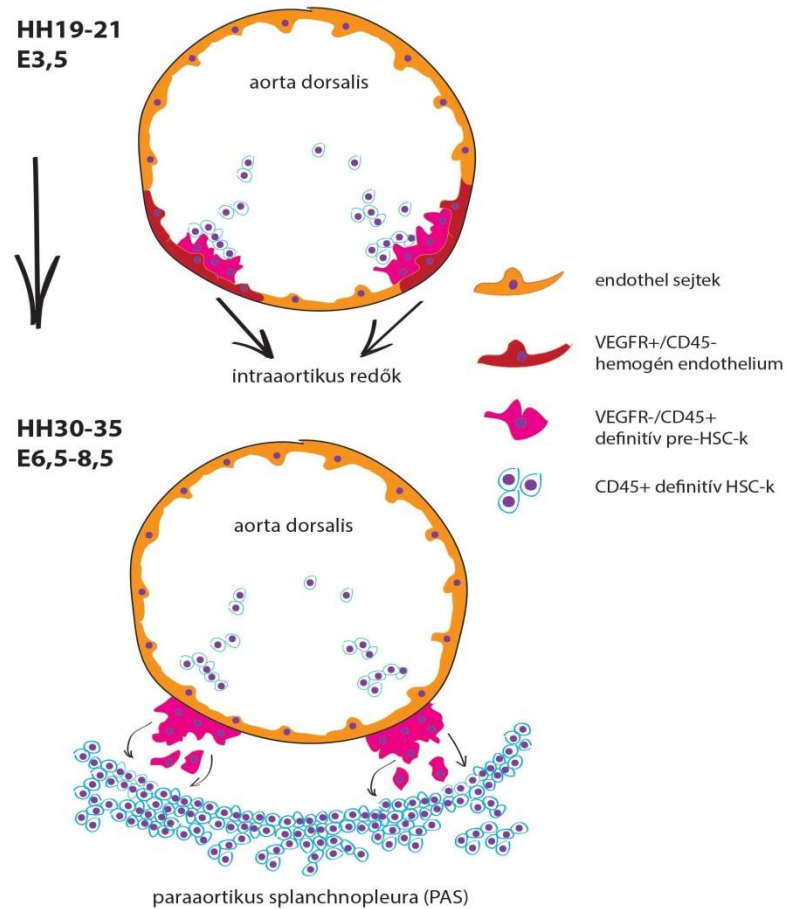
Csirke embrióban 3 napos (E3) korban jelennek meg a dorzális aorta ventrális falában a vérvézésért felelős hemopoiitikus redők, majd E5 stádiumban figyelhető meg először a paraaortikus régió (*Cormier and Dieterlen-Lièvre, 1988; Dieterlen-Lièvre and Martin, 1981*). Madár embrióban a paraaortikus splanchnopleurából származó HSC-k hosszú távú repopulációs képességét is sikerült később demonstrálni, amikor E7 stádiumú embrió PAS régiójából készített graftot, letális dózisú besugárzáson átesett, 14 napos csirke embrióba ültettek. A fogadó embrió tímuszában, lépében és csontvelőjében is graft eredetű hemopoiitikus elemeket találtak, amelyek képesek voltak hosszú távú repopulációra (*Lassila et al, 1979; Lassila et al, 1980*). Capriolinak és munkatársainak a vaszkularizáció előtt álló fűrj allantois-bimbók csirke embrionális coelomába való beültetését követően, a fogadó embrió csontvelőjében fűrj eredetű hemopoiitikus és endotél prekurzorokat sikerült azonosítaniuk, ezzel bizonyították az allantois szerepét a vérvézésben (*Caprioli et al, 1998*). Hasonló definitív vérvéző szerepét emlősben az allantoisnak és a placentának is igazolták azóta (*Corbel et al, 2007; Zeigler et al, 2006; Ottersbach és Dzierzak, 2005*). A 3. ábrán a vérvézés jelenlegi modellje látható a madár embrióban.



**3. ábra Hemopoietikus sejtek megjelenése, és a vérképző szervek kolonizációja csirke embrióban (Nagy és Fejszák után).** A hemopoietikus őssejtek az első és a második embrionális napon a szikhólyagban képződnek, amely csak a primitív vérképzésben vesz részt (1). A harmadik napon már megjelennek a végleges vérképző helyek (ventrális intraaortikus redők, paraaortikus régió, allantois), ahol a definitív vérképzés történik (2). A 6. embrionális napon hemopoietikus sejtek elkezdik benépesíteni a primer limfomioid szerveket (3). A tímusz kolonizációja három fázisban történik a 7-ik, 12-ik és kikelés előtti napokban; a bursa Fabricii-be a limfomioid őssejtek a 8. és a 14. embrionális nap között vándorolnak be; a csontvelő benépesítése hemopoietikus prekursorokkal a 10. napon indul és a kikelésig tart (3).

Madarokban és emlősökben a CD34 és a CD45 tekinthető pan-hemopoietikus markernek. Bár sikerült kimutatni a CD34 gént csirke embrionális HSC-kben is, de mindezidáig nincs elérhető madár-specifikus CD34 ellenes ellenanyag (McIntyre et al, 2008). Mindezek miatt csirkében - ahogy emlősben és emberben is - a CD45 tekinthető a legspecifikusabb hemopoietikus sejtfelszíni markernek (Tavian et al, 2010; Kurz és Christ, 1998; Godin and Cumano, 2005). Jelenlegi tudásunk alapján az első CD45+ sejtek a 3. embrionális napon jelennek meg a csirke embrióban, az aortához asszociáltan

és az agyhólyagokban (*Cuadros et al, 2006; Jaffredo et al, 1998; Jaffredo et al, 2000*). A 3 – 4 napos embrióban az aorta ventrális falának endotél rétegéből kiemelkedő intraaortikus redők hozzák létre az első CD45+ definitív HSC-eket (4. ábra). Az intraaortikus redők hemopoietikus természetét más sejtfelszíni markerekkel is sikerült igazolni, mint a CD41/61 és a CD51/61, valamint a RUNX1 és CD34 gének expressziós mintázatai is erre utalnak (*McNagny et al, 1992; Lampisuo et al, 1999; Bollerot et al, 2005*). A CD41/61 és CD51/61 molekulákkal trombocita prekurzorokat és hemopoietikus progenitorokat lehet azonosítani (*Corbel 2002; Corbel et al, 2005*). Csirke embrióban sikerült arra is fényt deríteni, hogy az aortaredők első definitív HSC-i az aortafal endotél sejtjeiből, a „hemogén endotélium”-ból differenciálódnak. Ehhez a karbocianin Dil nevű festékkel jelölt, Dil-LDL lipoprotein részecskéket injektáltak az embriók keringésébe, majd egy nap inkubáció után azonosították az aortaredőkről leváló Dil-LDL-t tartalmazó definitív HSC-eket (4. ábra) (*Jaffredo et al, 1998*). A karbocianin festék jelen volt több makrofágban és az aorta körüli mesenchyma sejtjeinek egy részében is. Ez a tanulmány is alátámasztotta azt az elméletet, hogy a szikhólyag makrofág prekurzorokkal kolonizálja az embriót az intraembrionális vérképzés megjelenése előtt. A Dil-LDL partikulumokat felvették az endotél sejtek, de az aortából lefűződő HSC-k is megtartották Dil pozitivitásukat, ez pedig kísérletesen igazolta, hogy az aorta hemogén endotéliumából HSC-k származnak, amelyek a PAS-t népesítik be. Az endotél sejtek HSC létrehozó képességét sejtenyészeteken is bebizonyították (*Nishikawa et al, 1998*). A PAS CD45+ sejtjeit izolálva részletes kvantitatív tanulmány is készült a különböző sejtpopulációk megoszlásáról és gégeinek expressziós mintázatáról. A kísérlet alapján a PAS sejtek 50%-a KUL01+ makrofág. A differenciálódó hemopoietikus sejteket a PU-1 és MafB mellett a GATA-1 gének expressziója jellemzi. TLR (toll-like receptor) géneket is azonosítottak, amelyeknek a veleszületett immunitásban és szisztémás gyulladáshoz vezető reakciók kiváltásában van kiemelkedő szerepe (*Saynajakangas et al, 2009*).



**4. ábra Intraembriónális vérképzés csirke embrióban.** Az aortaredők, a hemogén endotélium és a paraaortikus régió megjelenése, valamint a definitív CD45+ HSC keringésbe kerülése. Az intraaortikus redőkből az őssejtek a keringésbe, később a mesogastrium dorsale-be vándorolnak.

A paraaortikus régióból származnak azok a mieloid progenitorok, amelyek később benépesítik a lépét, tímuszt, bursa Fabrici-t és a csontvelőt (*Dieterlen-Liévre 1994; Dieterlen Liévre 1997*). A paraaortikus régió, mint vérképző terület a 6. embrionális naptól a 8. napig van jelen az aorta körüli mesenchymában, majd a csontvelő és a primer limfoid szervek kialakulása előtt pár nappal depletálódik (*Jaffredo et al, 2000*). Jelenleg nem ismert, hogy az aorta eredetű sejtek hová kerülnek, hol folytatódik differenciálódásuk, amíg kezdetét veszi a primer nyirokszervek telepeinek kolonizációja. A PAS hemopoietikus sejtjeiről azt is sikerült bebizonyítani, hogy az aorta hemogén endotéliumából származnak (4. ábra). Jaffredo és munkatársai DiL-LDL mellett lacZ operont tartalmazó, nem replikatív virális vektort juttattak az embriók keringésébe. A lacZ vektort csak pár endotél sejt veszi fel és a „riporter” gén stabilan

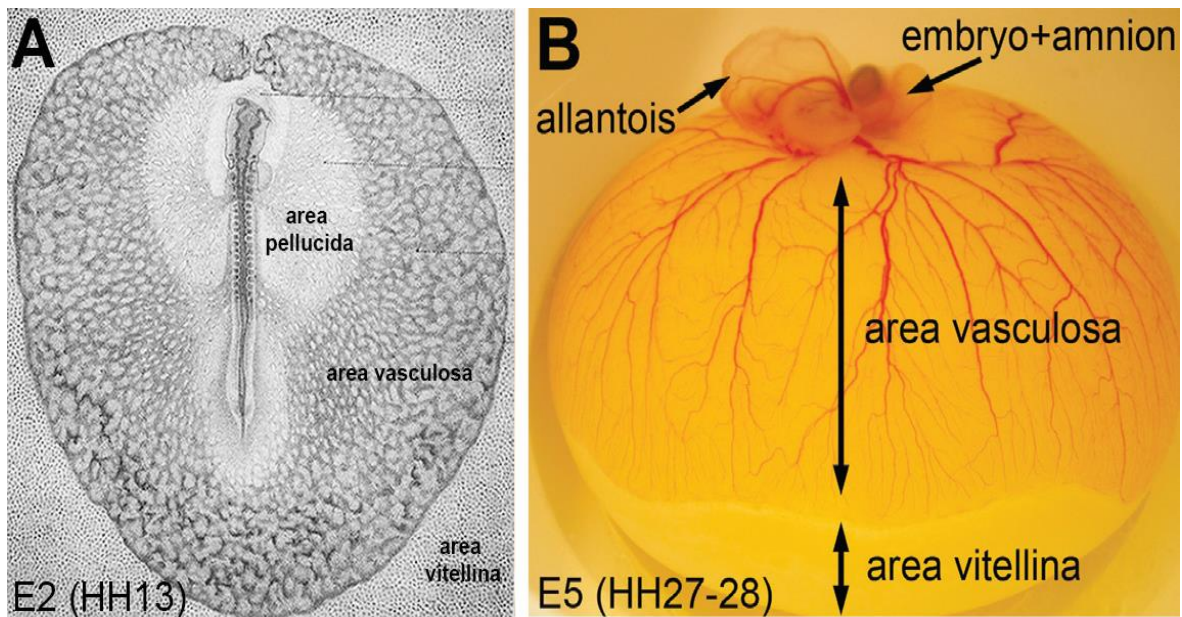
tovább expresszálódik a leszármazott sejtekben is, így napokon át tovább követhetőek a vírus vektort inkorporáló sejtek. Három nappal a transzdukció után, lacZ+ sejteket lehet kimutatni a PAS területén (*Jaffredo et al, 2000*). Emlősökkel ellentétben, a madár embrióban a májnak nincsen kitüntetett hemopoietikus szerepe.

Nehezen elhelyezhető a definitív, aorta-asszociált vérképző helyek és az extraembrionális szikhólyag mellett az allantois, mint hemopoietikus szerv. Caprioli és munkatársai vaszkularizáció előtti fűrj allantois bimbót ültettek csirke embrionális coelomába. A csirke-fűrj testüreg kiméra csontvelőjéből nagy mennyiségű QH1+ fűrj hemopoietikus és endotél sejtet sikerült azonosítani, és a tenyésztett allantois-bimbó érrendszerének endotél sejtjei is mind fűrj eredetűek voltak (*Caprioli et al, 1998*). A három napos allantois RT-PCR vizsgálata folyamán kiderült, hogy sejtjeiben erős expressziót mutat a GATA-3 gén, amely sem a szikhólyagra, sem a keringő hemopoietikus elemekre nem jellemző (amelyek GATA-1-et és GATA-2-öt fejeznek ki) (*Caprioli et al, 1998*). Az allantois azon képessége, hogy a csontvelőben hemopoietikus és endoteliális elemeket is képes létrehozni, egy hemangioblaszt progenitor jelenlétét feltételezi az embrionális függelékben (*Caprioli et al, 2001*). Hogy magába az allantoisba, honnan kerül bele a hemangioblaszt (*in situ* képződik a mezodermből, vagy a szikhólyagból vándorol be), még vita tárgya.

### **1.5 Extraembrionális vérképzés és a szikhólyagi HSC szerepe**

Az aorta hemopoietikus szerepének felfedezéséig a szikhólyagot tartották a HSC egyetlen forrásának. Ma már tudjuk, hogy a szikhólyag primitív HSC-inek döntő része eltűnik az embrionális fejlődés végén, mégis fontos áthidaló szerepe van a szövetek passzív diffúzióval történő táplálása és az intraaortikus vérképzés megjelenése között. Csirkében az embrionális fejlődés 2. napján és 3. napjának elején (HH11-HH21) a szikhólyag primitív eritrocitái biztosítják a gasztrulálódó embrió oxigén-igényét az intra- és extraembrionális keringés összekapcsolódásától, az organogenezis kezdetéig. Az amnion, a chorion és az allantois-on kívül, a szikhólyag tekinthető még extraembrionális szövetnek. Az amnion és a chorion az embrió somatopleurájából származik, és az extraembrionális coeloma megnyílásával elválik annak

splanchnopleurális részétől, amiből lesz a tulajdonképpeni szikhólyag. Az amnion körülzárja az embriót, az extraembrionális somatopleura maradék része lesz a chorion, amiből emlősökben kialakul a placenta fetalis része. Madárban a chorion összenőve az allantois disztális részével a chorioallantois membránt (CAM) alkotja, proximális fala pedig az amnionnal és a szikhólyaggal egyesül az embrionális fejlődés végén (*Romanoff 1960; Leeson and Leeson 1963; Adamstone 1948*). Az allantois endo- és mezodermális, a chorion és az amnion ekto- és mezodermális, a szikhólyaghoz pedig mind a 3 csíralemez hozzájárul, de az extraembrionális coeloma megnyílásával csak endo- és mezodermális szövetté válik. Madarakban az extraembrionális mezoderma sejtjei a primitív csík hátsó részéből vándorolnak be a szikhólyag ektodermális és szikanyagban gazdag endodermális lemezei közé (*Murray 1932*). Miközben a primitív csík cranio-caudalis irányban visszafejlődik, a mezoderma sejtek patkó alakban, anterior és lateral irányban szétterülnek a szikhólyag területén (*Schoenwolf et al, 1992*).



**5. ábra** Extraembrionális membránok a 2 és 5 napos csirke embrióban (*Sheng után*). Az embriót közvetlenül az area pellucida veszi körül, amely nem tartalmaz vérszigeteket (A). Az area vasculosa az area opaca azon része, amely tartalmaz extraembrionális mezodermát és vérszigeteket, az area vitellinában nem zajlik vérképzés (A,B).

A csirke embrionális blasztodermát area pellucidára és area opaca-ra osztjuk. Az area pellucida területén helyezkedik el az embrió, de ennek a területnek a lateralis szélét inkább extraembrionálisnak tekintjük. Az area opaca attól függően, hogy meddig terjed benne a mezodermális réteg, area vasculosára és area vitellinára osztható. Az area vitellina az area opaca-nak azon része, amely már nem tartalmaz mezodermát. Az extraembrionális vérképzés teljes egészében az area vasculosában történik (*Bellairs 1963*). Az extraembrionális mezoderma sejtek három irányba differenciálódnak: vér-, endotél-, és simaizom sejtekké (*Shin et al, 2009*). A szikhólyag splanchnopleurája mind a három sejtvonalat tartalmazza, a szomatikus mezodermája viszont csak a simaizomsejteket hozza létre (*Wu et al 2001*). A primitív csíkból való betelepülés után a simaizom progenitorok válnak külön először és a vaszkulogenezis folyamán az extraembrionális erek simaizom rétegét hozzák majd létre (*Shin et al, 2009*). A maradék szikhólyagi őssejt hozza létre a vérszigeteket, amelyek endotél és hemopoietikus irányba differenciálódnak (*Nakazawa et al, 2006*). A vérszigetek sejtaggregátumait rövid ideig egy közös progenitor, a hemangioblaszt tölti ki, de ezek a sejtek hamar primitív HSC-ket és angioblasztokat hoznak létre (*Sabin 1920; Murray 1932; Choi et al, 1998; Huber et al, 2004*). Korábbi megfigyelések szerint az area vasculosa lateralis részein a vérszigetek hamarabb alakulnak ki és nagyobbak lesznek, mint a medialis, zona pellucidával határos területeken, melyekből inkább csak angioblasztok képződnek, nem pedig extraembrionális HSC-k (*Sheng et al, 2010*). HH12-13 stádiumban (46-50 óra) a vérszigetek belsejében fejlődő hemopoietikus prekursorok elkezdik elveszíteni a kontaktust a perifériás endotél sejtekkel, majd az ekkora már kifejlődött area vasculosa véredényei anasztomózisokat létesítenek az embrionális keringéssel és a szikhólyag hemopoietikus prekursorai megkezdik az embrionális szövetek kolonizációját.

A madár embrióban, ahogy az egérben is, a primitív HSC az extraembrionális szikhólyag vérszigeteiben jelenik meg és egy tranziens hemopoietikus populációt hoz létre, döntően eritroid és trombocitoid dominanciával. Csirke-fürj kiméra modellt használva, a fürj hemopoietikus és endotél sejteket szelektíven jelölő QH1 monoklonális ellenanyaggal sikerült igazolni, hogy a szikhólyag az eritro-trombocitoid sejtvonalon kívül keringő endotél sejteket (circulating endothelial cells, CEC) (*LaRue et al, 2003; Pardanaud and Eichmann 2011*) és primitív makrofágokat is létre tud hozni (*Cuadros et al, 1992*). Az extraembrionális vérszigetekben zajló korai vérképzésre a



hemoglobin expressziója utal, ami először a perifériás helyzetű vérszigetekben figyelhető meg HH7-8 (24-28 óra) stádiumban (*Nakazawa et al, 2006*). A csirke vérben 3 alfa (pi, alphaD, alphaA) és 4 béta típusú hemoglobin fehérje mutatható ki (rho, betaH, betaA, epsilon) (*Patel et al, 2008*). A csirke embrió primitív eritrocitáiban magas a pi- rho- és epsilon hemoglobin koncentrációja, míg definitív vörösvérsejtjeiben az alphaD, alphaA és a betaA hemoglobin molekula a meghatározó. A hemoglobin izotípusok vérbeli koncentráció-eloszlásának stádium szerinti analizisével meghatározható, hogy a csirke embrióban a fejlődés 5. napjára veszik át a definitív hemoglobin fehérjék a főszerepet, és a 7. napra tűnik el teljesen a primitív típus (*Alev et al, 2008*). A 3. embrionális naptól kezdve, az aorta-asszociált vérképzés megindulása utáni első napokban a definitív vérképző helyek nem rendelkeznek még akkora kapacitással, hogy biztosítani tudják az embrió teljes oxigén-igényét. Ezért sokan feltételeznek egy “korai definitív” eritropoietikus hullámot, mely a szikhólyag vénás plexusaiból ered a 3. és 5. embrionális nap között (*Nagai and Sheng, 2008*). Az eritroid sejtvonal második (predefinitív) generációján kívül a szöveti makrofágok egyes populációiról (mikroglia, Langerhans sejtek) és bizonyos esetekben endotél sejtekről is sikerült már bizonyítani extraembrionális eredetüket (*Cuadros et al 1992; Alliot et al, 1999; La Rue et al, 2003; Pardanaud et al, 2011*).

Vajon mi lesz a primitív hemopoietikus prekurzorokkal a fejlődés későbbi stádiumaiban, illetve felnőtt korban? Eltűnnek ezek a sejtek a szervezetből, vagy csak drasztikus fenotípus változáson esnek át és bekapcsolódnak a definitív vérképzésbe? Erre a kérdésre keresték a választ Samokhvalov és munkatársai, amikor egy non-invazív Cre/loxP rekombináción alapuló, *in vivo* technikát alkalmaztak szikhólyagi sejtek nyomkövetésére. 7,5 napos heterozigóta Runx1<sup>+/-</sup> egér embriók Runx1+ szikhólyagi sejteiről sikerült kideríteni, hogy fetális limfoid progenitorokká és definitív HSC-ké differenciálódtak az emlős AGM, tímusz és máj kolonizálása után (*Samokhalov et al, 2007*). A szikhólyagi eredetű sejtek aránya átlagosan 10 ± 3-4% volt az embrionális fejlődés végén az említett limfomieloid szervekben, és feltehetően lokális mikrokörnyezeti hatásokra alakultak definitív HSC-ké. Ezek szerint az intraembrionálisan keletkező, hosszú távú repopulációs potenciállal rendelkező HSC-k egy része nem *in situ* differenciálódik a mesenchymából, vagy hemogén endotéliumból, hanem a szikhólyagból vándorol be a definitív vérképzés beindulása előtt.

Láthattuk azt, hogy az extraembrionális szöveteket, különösképpen a szikhólyagot nem lehet csupán egy átmeneti, hamar lecsengő vérképző területnek elfogadni. Egyre több kutatás derít fényt arra, hogy az innen származó “primitív” hemopoietikus őssejtek is rendelkeznek azzal a képességgel, hogy “definitív” HSC-vé váljanak a megfelelő mikro környezetbe kerülve. Bizonyos extraembrionális HSC-k viszont képesek arra, hogy kolonizálják az embrionális fejlődés korai szakaszaiban a szöveteket és ott rezidens, nyúlványos sejtekké differenciálódjanak. Az utóbbira példa a mikroglia és a Langerhans sejtek csoportja, melyek megtelepedésük után perzisztálnak a szövetekben és *in situ* önmegújulásra is képesek (*Hashimoto et al, 2013; Ginhoux et al, 2015*). Sok kérdés vár még megválaszolásra az embrióban letelepedő szikhólyagi őssejtekkel kapcsolatosan. Vajon mi a különbség differenciációs, és proliferációs kapacitásában az extraembrionális területekről bevándorolt és másodlagosan definitív HSC-vé alakult őssejtek, és az intraembrionális prekurzorokból (mesenchyma, hemogén endotélium) differenciálódott HSC-k között? Vajon van-e még olyan limfomieloid sejtvonal melynek tagjai nem intraembrionális, hanem szikhólyagi prekurzorokból származnak és vándorolnak be a primer nyirokszervekbe?

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Madár embriókon végzett vizsgálatok mutatták meg először, hogy a magasabb rendű gerincesekben, így a humán embrióban is, a definitív vérképző őssejtek a dorzális aorta területén alakulnak ki, és az itt fejlődő CD45+ progenitorok később az összes vérérvonal létrehozására képesek. Habár a vérérvetek differenciálódására számos molekuláris biológiai adat áll rendelkezésünkre, a korai embrióban zajló vérképzés fejlődésmechanizmusa csak részben ismert. Szikhólyagi eredetű őssejtekből származnak az agy mikroglia és a bőr Langerhans sejtjei és számos makrofág típusú sejt szikhólyagi eredetét is feltételezik, de a szikhólyag eredetű sejtek pontos embrionális disszeminációja csak részben feltárt. Doktori munkám első felében ezekre a kérdésekre kerestem a választ, különös figyelmet fordítva arra, hogy van-e ontogenetikai kapcsolat az intraembrionális mesenchymában előforduló nyúlványos CD45+ sejtek és a primer nyirokszervekben előforduló makrofág és dendritikus sejtek között. Az embrionális és felnőtt madarak, illetve egér bélidegrendszerében megfigyeltük, hogy nyúlványos CD45+ sejtek a bélfal ganglionjaihoz asszociáltak, valamint a gangliont alkotó neuronok és gliasejtek között is előfordulnak. Továbbá, komparatív vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az intraganglionáris nyúlványos CD45+ sejtek mikroglia-jellegző sejt felszíni molekulákat expresszálnak. Vajon az idegsejteken és a glián kívül létezik-e az enterális idegrendszerben is egy mikroglia-nak megfeleltethető harmadik elem? Doktori munkám második felében ennek az intraganglionárisan megjelenő CD45+ sejt típusnak az immunokémiai tulajdonságait és embrionális fejlődését vizsgáltam.

### **A kutatásom céljai a következők voltak:**

1. CD45+ sejtek azonosítása az intra- és extraembrionális szövetekben, immunológiai karakterizálásuk és szöveti eloszlásuk feltérképezése a korai csirke embrióban.
2. CD45+ sejtek intraembrionális differenciálódásának nyomonkövetése.
3. Az organogenezis végén az embrionális szövetekben fennmaradó, nyúlványos morfológiájú CD45+ sejtek származásának meghatározása embrionális kiméra technikával. Vajon a bursa Fabricii dendritikus sejtjei származhatnak-e a nyúlványos CD45+ sejt populációból?
4. A bélfal ganglion-asszociált CD45+ sejtjének immunológiai karakterizálása és ontogenezisének tanulmányozása embriomanipulációs módszerekkel.

### **3. ANYAGOK ES MÓDSZEREK**

#### **3.1 Kísérleti állatok**

Kísérleteinkhez csirke (*Gallus gallus*, White Leghorn SPF, Phylaxia Sanophi, Magyarország), és fűj (*Coturnix coturnix japonica*) embriókat, valamint izolált embrionális szerveket használtunk fel. A transzgenikus GFP-t (green fluorescent protein) expresszáló és CSF1R<sup>GFP</sup> (minden CSF1-receptort kifejező makrofág zöld fluoreszcenciát mutat) csirketojásokat Professzor Helen Sang és Dr. Adam Balic jóvoltából a skóciai Roslin Intézetből (University of Edinburgh) (*McGrew et al, 2004; Balic et al, 2014*) kaptuk. A madártojásokat laboratóriumunk keltetőgépében forgatórácsos inkubáltuk 38°C hőmérsékleten, 60%-os páratartalom mellett. A pontos fejlődési kor meghatározására a Hamburger - Hamilton stádiumokat, illetve az embrionális szomiták számát használtuk (*Hamburger and Hamilton, 1951*). Az öt napos vagy annál idősebb embriók esetén napokban fejeztük ki az embrionális kort. A CX3CR1<sup>GFP</sup> (minden mikroglia és intesztinális makrofág zöld fluorescens proteint expresszál) transzgenikus egereket Prof. Allan Goldstein (Harvard Medical School) laboratóriumának közreműködésével szereztük be. Az állatkísérletek a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával történtek (engedélyszám: 779-000-2005).

#### **3.2 A minták szövettani feldolgoása**

Hisztológiai vizsgálatokra korai (10 napnál fiatalabb) csirke és fűj embriókat, a hozzájuk tartozó szikhólyagot, embrionális szerveket (lép, bursa fabricii, szív, bél, tüdő, máj, tímusztelep), valamint 4-12 hetes vékony- és vastagbélét, illetve 8 hetes egér vékony- és vastagbélét használtuk fel. Az immuncitokémiai és immunfluoreszens vizsgálatokhoz zselatinos fagyasztott blokk készült. A kísérleteinkhez szükséges embriókat és embrionális szerveket sztereomikroszkóp alatt, mikropreparációra alkalmas eszközökkel (csipeszek, mikro-ollók, rovartűk, embrióspatula) távolítottuk el.

### 3.2.1 Zselatin-szacharózos fagyasztott blokk készítése

A kivett szerveket méretüktől függően 1-2 órán, vagy egy éjszakán át fixáltuk puffereelt 4% paraformaldehidben (PFA), majd foszfáttal puffereelt sóoldattal (PBS) háromszor 5 percig mostuk. A szerveket a fixálást követően, egy éjszakát 15%-os szacharóz PBS oldatában inkubáltuk 4°C-on, majd a beágyazást megelőzően 38°C-on, 1 órán keresztül, 15% szacharózt (Reanal puris, M:342,30) és 7,5% zselatint (Fluka, kat. szám: 04055) tartalmazó PBS oldatban tartottuk. Az így impregnált szerveket műanyag tálkákba kiöntött és 15 percig szilárdulni hagyott zselatin ágyakra helyeztük. Néhány percig ismét állni hagytuk a szerveket, hogy azok a zselatin ágyhoz tapadjanak, majd meleg zselatinnal teljesen befedtük őket és 4°C-on 15 percig szilárdulni hagytuk, majd körbevágással kialakítottuk a kívánt méretű blokkokat. A zselatin blokkokat Shandon Cryomatrix-szal (Anatomical Pathology Ind., 67690006), feliratozott kartonpapírra rögzítettük. A blokkokat folyékony nitrogénnel -50°C-ra lehűtött 2-metilbután-izopentánban (Sigma-Aldrich, kat. szám: M3,263-1) 1 perc alatt lefagyasztottuk, és felhasználásig -80°C-on tároltuk.

### 3.2.2 Beágyazáshoz használt oldatok

**Szacharóz és zselatin tartalmú PBS puffer:** 15mg D-szacharózt 100ml PBS-ben oldunk fel, majd az oldatot 4°C-on hűtőben tároljuk. A szacharózt (15m/V%) és zselatint (7,5m/V%) tartalmazó PBS puffert pedig -20°C-on fagyasztva tároljuk. A zselatin felolvasztásánál és beágyazás előtti újramelegítésénél ügyelünk arra, hogy ne legyen több a puffer hőmérséklete 60°C-nál, ami a későbbiekben fagyasztott blokk készítéséhez alkalmatlanná tenné a puffert.

**Puffereelt 4%-os paraformaldehid (pH=7,4):** 700ml desztillált vizet lombikban 60°C-ra melegítünk fel. 40g paraformaldehidet adunk hozzá és mágneses keverőre helyezzük. A keletkezett csapadékot cseppenként hozzáadott 20%-os (0,5M) NaOH-dal feloldjuk. Az oldatot megsűrjük, majd 250ml 0,24M PBS-t adunk hozzá. Beállítjuk a pH-t, majd az oldatot átöntve 1000 ml-es mérőhengerbe, desztillált vízzel kiegészítjük 1000ml-re és 15ml-es Falcon csövekbe szétosztva -20°C-on tároljuk.

### **3.2.3 Metszetek készítése**

A metszésre Shandon gyártmányú kriotomot (kriosztát) használtunk és a zselatinos blokkokat  $-27^{\circ}\text{C}$ -os, munkahőmérsékleten metszettük. A mintákból 11-12  $\mu\text{m}$  vastag metszeteket készítettünk a kloronaftolos és immunfluoreszcens fénymikroszkópos feldolgozáshoz; 20-25  $\mu\text{m}$  vastag metszeteket pedig konfokális mikroszkópiához. A metszeteket poly-L-lysine-nel (Sigma, P8920) bevont tárgylemezre vettük fel és felhasználásig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

### **3.3 Savanyú foszfátáz enzimhisztokémia**

A savanyú foszfátáz enzim savas közegben ( $\text{pH} = 5,0-5,5$ ) katalizálja a glicerin foszfomonoészterek hidrolízisét. A reakcióban keletkező foszforsav a jelen lévő ólomsóval oldhatatlan ólom-foszfáttá, majd nátriumsulfid hatására barna ólom-sulfiddá alakul (*Gomori, 1941*). A PFA fixált metszeteket 0,01 g ólom-nitrát és 0,02 g nátrium-glicerosulfát hozzáadásával készült, 0,05 M-os acetát pufferben inkubáltuk 30 percig  $38^{\circ}\text{C}$ -on. Desztillált vizes mosás után 2 percig 10 g/dl-es nátriumsulfát-oldatban 2 percig kezeltük, majd ismét desztillált vízzel mostuk a metszeteket. A makrofágok lizoszómáinak magas savanyú foszfátáz tartalma barna színreakciót váltott ki.

### **3.4 Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia**

#### **3.4.1 Immuncitokémia**

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat fagyasztott metszeteiken végeztük az alábbi protokoll szerint: a metszeteket PBS-ben 10 percig rehidratáltuk szobahőmérsékleten (a zselatin kioldása miatt, előre felmelegített PBS-be helyeztük 5 percre, ezután szobahőmérsékletű PBS-ben rehidratáltuk őket). Ezt követően a metszeteke rámértük a primer ellenanyagot (50-80 $\mu\text{l}$ /metszet). A szükséges ellenanyagok hígítását 1%-os BSA-t és Na- azidot tartalmazó PBS-ben (PBS/BSA) végeztük. A primer ellenanyaggal lefedett metszeteket 60 percig szobahőmérsékleten, nedves kamrában inkubáltuk, amit

3x5 perc mosás követett PBS-ben. A festéseinkhez használt primer ellenanyagok listáját az 1. táblázat tartalmazza.

Szekunder ellenanyagként, biotinnal konjugált lóban termelt anti-egér IgG-t, illetve anti-nyúl IgG-t használtunk (Vector Laboratories, BA-2000; PBS-BSA-ban feloldva 1:200-as, illetve 1:100-as hígításban alkalmaztuk), amellyel további 45 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten a metszeteket. A szöveti endogén peroxidázok aktivitásának blokkolására a metszeteket PBS-sel 3%-ra hígított H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ba (Sigma-Aldrich, H1009) helyeztük 10 percre, majd ezt mosás követte PBS-ben (3x5 perc). A mosás után ABC komplexet (avidin-biotin-peroxidáz komplex, Vectaststain Elite PK-6100; Vector Laboratories) vittünk fel a metszetekre és fél órát inkubáltuk őket. Az ABC oldatot a cég által megadott hígításban készítettük el (1:100 arányban, PBS-ben), PBS-be kimértük az avidin-, majd a biotinilált peroxidázt tartalmazó oldat megfelelő mennyiségét, alaposan felkevertük, majd fél óra állás után használtuk fel. A kötődött peroxidáz enzim aktivitását 4-chloro-1-naftollal detektáltuk (Sigma; C8890). A kloronaftolt előzetesen kimértük és PBS-be vittük (100µl 4-chloro-1-naftol törzsoldat 100ml PBS-ben oldva), amelyet sötétben mágneses keverőn legalább fél órát keverttünk. Felhasználás előtt szűrőpapíron átszűrtük és 300µl 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot adtunk hozzá. A metszeteket 4-chloro-1-naftol oldatban 30 percig sötétben inkubáltuk, és vizes lefedőanyaggal (Poly-Aqua Polyscience Inc. Warrington PA, USA; 18606) fedtük le őket.

### **3.4.2 Immunfluoreszcencia**

A metszetek előkészítését és primer ellenanyaggal való inkubálását, az immunhisztokémiai fejezetben leírtakkal azonos módon végeztük. Ezt követően, fluorokrómmal konjugáltatott szekunder ellenanyagot (50-80µl/ metszet) mértünk a metszetekre. Az inkubálást 45 percig szobahőmérsékleten, nedves kamrában végeztük. A fluorokrómmal konjugáltatott szekunder ellenanyag inkubációja, fényérzékenysége miatt, fénytől védett helyen történt. A sejtmagok kimutatására DAPI (4,6 diamino-2-phenylindole, dihydrochloride, Invitrogen, D1306) reagenst használtunk, PBS-ben hígítva 1µg/ml arányban. Ezt 10 percig hagytuk a metszeteken, majd 3x5 percig mostuk

PBS-ben. A mitotikus sejteket poliklonális nyúl anti-phosphohistone 3 (PH3) ellenanyaggal mutattuk ki. Az apoptotikus testeket aktivált kaszpáz-3 specifikus ellenanyaggal (cleaved caspase-3, Cell Signaling) detektáltuk.

**1. táblázat.** Doktori munkám során használt elsődleges ellenanyagok.

<b>Ellenanyag (klón)</b>	<b>Hoszt és izotípus</b>	<b>Azonosított sejt/struktúra</b>	<b>Higitás</b>	<b>Ellenanyag származása, katalógus szám</b>
74.2	Egér IgG1	Csirke szöveti makrofágok	1:400	ThermoFischer (7500975)
74.3	Egér IgG1	dendritikus sejtek	1:100	ThermoFischer
Agrin (Mab5204)	Kecske IgG	Egér extracelluláris matrix protein	1:400	R&D Systems (AF550)
Anti-GFP	Nyúl IgG	GFP-expresszáló sejtek	1:400	Abcam
CD3	Nyúl IgG	T-sejtek	1:100	DAKO
CD44 (1D10)	Egér IgG1	Sokféle hemopoietikus sejt	1:100	Developmental Studies Hybridoma Bank
CD45 (HISC7)	Egér IgG2a	csirke leukociták	1:200	CEDI-Diagnostics
CD51/61 (Anti-Integrin $\alpha$ V $\beta$ 3 (LM609))	Egér IgG1	Trombocitoid sejt vonal	1:100	Milipore
chB6 (BoA1)	Egér IgG1	B-sejtek, mikroglia	1:200	Igyarto et al., 2008



<b>Ellenanyag (klón)</b>	<b>Hoszt és izotípus</b>	<b>Azonosított sejt/struktúra</b>	<b>Hígítás</b>	<b>Ellenanyag származása, katalógus szám</b>
Cleaved Caspase-3	Nyúl IgG	Apoptotikus sejtek	1:50	Cell Signaling
CSF1R (ROS1)	Egér IgG1	CSF1 receptort expresszáló makrofágok	1:400	Bio-Rad
GRL2	Egér IgG1	Madár trombociták, granulociták, makrofágok	1:100	Developmental Studies Hybridoma Bank
HNK1	Egér IgM	csirke ENCC-k	1:50	NeoMarkers
HuC/HuD (clone: 16A11)	Egér IgG2b	Neuronok	1:100	Invitrogen (A-21271)
Laminin (31)	Egér IgG1	Madár bazális membrán	1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank
Lamp-1 lizoszóma-asszociált membrán protein; CD107a (Lep100)	Egér IgG1	Madár makrofágok	1:100	Developmental Studies Hybridoma Bank
Mannóz receptor MRC1L-B (KUL-01)	Egér IgG1	Madár makrofágok	1:100	Santa Cruz Biotechnology
MHCII (21-1A6)	Egér IgG1	Antigén prezentáló sejtek	1:200	Thermo Scientific
Phospho-histone H3 (SER10)	Nyúl IgG	Proliferáló sejtek	1:100	Cell-Signaling
Tuj1 (βIII-tubulin) (B1195)	Egér IgG2a	Neuronok	1:200	Covance (MMS-435P)

### **3.4.3 “Whole-mount” immunfestés**

Néhány esetben a mikroszkópos vizsgálatokat nem metszeteken, hanem béldarabok körkörös simaizom rétegének teljes szöveti festésén (whole mount technika) végeztük, amely tartalmazta a plexus myentericust is (LMMP preparátum). Ennek előkészítésekor a következőképpen jártunk el: 8 hetes felnőtt egerek béltraktusából kipreparált ileum és colon szakaszok mucosáját és longitudinális simaizom rétegét eltávolítottuk, majd a megmaradt circularis simaizom réteget kiterítettük, és 3x5 percig PBS-ben mostuk. Éjszakai PFA fixálás után a primer ellenanyagból (humán anti-Hu és anti-GFP) körülbelül 300 $\mu$ l-t mértünk rá a béldarabra. Éjszakára rázógépen inkubáltuk 4°C-on, másnap 4x30 percig ismételt PBS-ben mostuk. Alexa konjugált egér anti-humán (A594) és szamár anti-kecske (A488) szekunder ellenanyaggal 1 órát inkubáltuk, amelyet 4x5 perc PBS-ben történő mosás követett.

### **3.5 Metszetek értékelése, fényképezése, képfeldolgozás**

A metszeteket Zeiss Axiophot mikroszkóppal tekintetem át, és a hozzacsatlakoztatott Zeiss AxioCam HCR kamera segítségével digitális képeket készítettem különböző nagyításokon. A konfokális mikroszkópiát Zeiss LSM 710 típusú mikroszkóppal végeztem. A képek további feldolgozásához, szerkesztéséhez ImageJ és Adobe Photoshop CS 7.01 típusú programokat használtam.

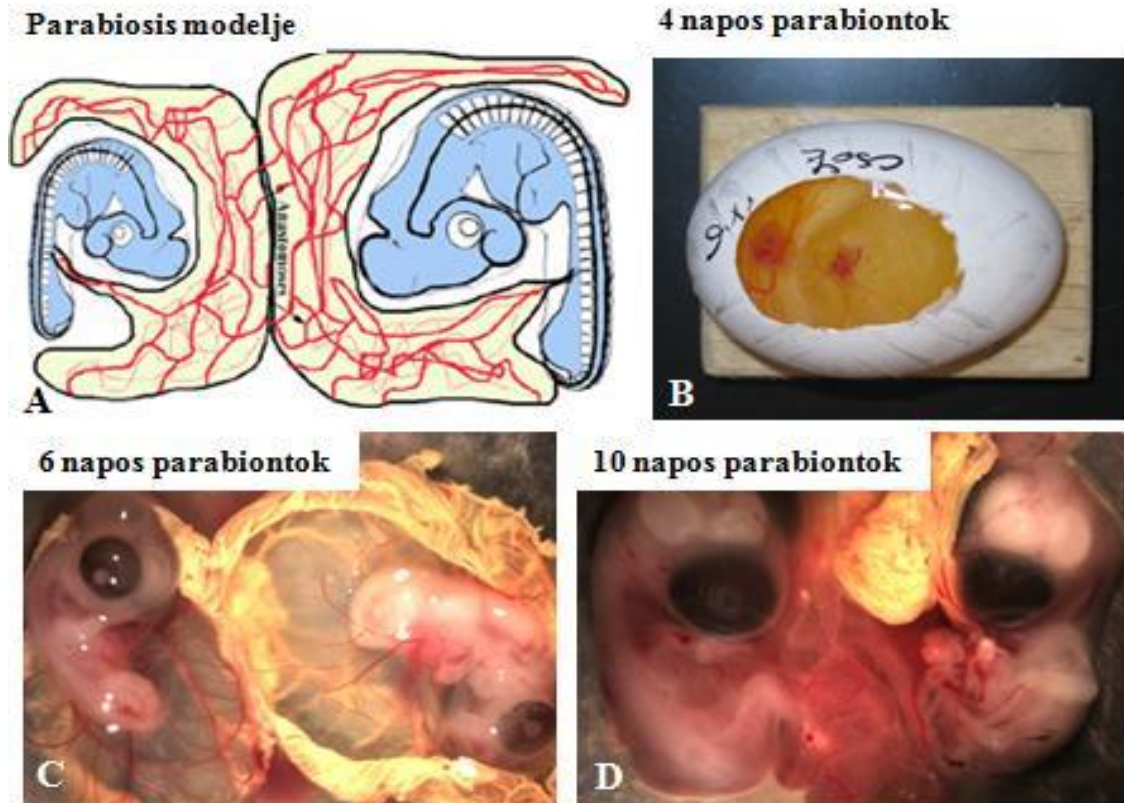
### **3.6 Embriómentes szikhólyag *in ovo* tenyésztése**

Annak eldöntésére, hogy összekapcsolódott-e már a csirke embrió intra- és extraembrionális keringése, egy 50  $\mu$ l-es fecskendővel felszerelt *Narishige* mikroinjektort használtunk, amivel HH10 és HH13 (33 óra és 50 óra) stádiumok közötti embriók szívcsövébe 2  $\mu$ l 1:10 arányban PBS-ben hígított Pelikan tust injektáltunk. Az *in ovo* szikhólyag-tenyészetekhez HH10 (33 óra) stádiumú embriókat használtunk, ugyanis a tusfeltöltések alapján ez a legkésőbbi stádium, amikor még nincs anasztomózis a szikhólyag és az embrió keringése között. Az embriópajzsból az embriókat Moria Pascheff-Wolff Spring ollóval (Fine Science Tools) távolítottuk el és

az embrió-abláció után maradt szikhólyag lemezeit, iridotómiás ollóval finoman összetapasztottuk. A művelet után a tojásokat átlátszó ragasztószalaggal visszafedtük és 38°C-on 2 vagy 5 napig tovább inkubáltuk. Az inkubáció végén 10×10 mm-es darabokat vágunk a tenyésztett szik preparátumokból, majd 4%-os PFA-ba fixáltuk őket 2 órán át. A fixált tenyészetek zselatinos beágyazásra, metszésre és immuncitokémiai feldolgozásra kerültek.

### **3.7 Csirke – fűrj parabiózis**

A csirke - fűrj parabiózis technika alkalmas arra, hogy meghatározzuk a keringésben lévő CD45+ sejtek fejlődési képességét, illetve azt, hogy az embrió mesenchymájában található nyúlványos CD45+ sejtek származhatnak-e a keringés vérképző sejtjeiből (*Nagy et al, 2004; Nagy et al, 2005*). A kísérlet során először, a 24 órát inkubált csirketojásokból a légólyag fölötti héjon ütött apró lyukon keresztül fecskendővel 8 ml albumint leszívunk és a lefektetett tojás oldalán egy 3 cm-es ovális lyukat vágunk. Ezután a csirke embriópajzsot úgy orientáltuk, hogy az minél nagyobb felületen érintkezzen a fűrjtojásból mellé öntött fűrj embriópajzssal. A kísérlet közben fontos, hogy ne sérüljenek az embriók telepei. Ezután a penicillin-sztreptomycin tartalmú PBS oldattal megcsepegtetett embriókat tartalmazó tojást átlátszó ragasztószalaggal lezártuk és 38°C-on inkubáltuk őket a laboratóriumi keltetőgépben. A 12 inkubált parabiotikus embrió-párból 3 nap után 7 volt életben, 5 nap után 3, 7 nap után pedig 2 parabiót-pár maradt meg. Ez a kísérlet végére 17%-os túlélési arányt jelentett (6. ábra A-D).



**6. ábra Csirke-fürj parabiózis technika.** (A,B): 4 napos csirke-fürj parabiontok sémás rajza és élő képe tojásban. (C): A 6 napos parabiotikus csirke és fürj embriók, már közös keringési rendszerrel rendelkeznek. (D): Szövetteni feldolgozás előtt álló 10 napos parabiontok.

### 3.8 Szikhólyag kiméra

A szikhólyag kimérák készítésekor White Leghorn és transzgenikus GFP (green fluorescent protein) tojásokat használtunk HH10-es (33 óra) stádiumig. A pontos fejlődési stádium meghatározását követően, tungsten mikrotű használatával a felszíni membrana vitellinát eltávolítottuk. Az embriópajzs központi területéről a HH10 stádiumú GFP-csirke embriót kimetszettük, és helyére azonos stádiumú normál csirke embriót implantáltunk. A fogadó szikhólyag és a donor embrió összetapadását a szabad szélek Pascheff-féle iridektómias ollóval végzett vízszintes bevágásával lehet összekapcsolni. Az embriomanipuláció után a tojásokat lefedtük (n=32) és további 72 órán át inkubáltuk, ami alatt vaszkuláris anasztomózisok létesültek a „varrat”-on keresztül és GFP+ szikhólyag eredetű sejtek kolonizálták az embriót. A szikhólyag kimérákat 5 napos stádiumban (n=6) fixáltuk 4%-os PFA-ban, majd szövettani

feldolgozásra és fluoreszens immuncitokémiára kerültek. A 32 inkubált kimérából 6 élte túl a 72 órás inkubálást, ami 19%-os kísérleti túlélést jelent.

### **3.9 Csirke-fürj testüreg kiméra**

Az embrió testürege megfelelő mikrokörnyezetet jelent a graft további tenyésztésére, és hosszú ideig (a kikelést követő időszakban is) lehetővé teszi annak fejlődését. Az átültetés első lépése a donor és a fogadó embriók előkészítése. A fogadó HH21 stádiumú (3 napos) csirke embriók esetében ablakot nyitottunk a tojánhéjon, majd a héjhártya és az amnion megnyitásával szabaddá tettük az embriót. A donor fürj embriót kiemeltük a tojásból, és az embrió ventralis részén az ektodermát megnyitottuk. A 7-8 napos donor embrióból finom csipeszek segítségével kipreparált béldarabokat pipetta segítségével, a már előkészített fogadó embrióba helyeztük és a szív mögé fordítva megfelelően orientáltuk. A transzplantációt követően a tojást átlátszó ragasztószalaggal lezártuk és az embriókat 14 napig inkubáltuk. A graft beépült a fogadó embrióba a máj, a jobb oldali tüdő és vese közé. Összesen 8 transzplantációból 6 volt sikeres (75%), melyeket szövettanilag is feldolgoztunk.

### **3.10 Bursa fabricii- szikhólyag rekombináció**

Annak érdekében, hogy követni tudjuk a szikhólyag eredetű CD45+ sejteket az 5. embrionális nap után is 9 napos bursa Fabricii-t kombináltunk embrió abláción átesett *in ovo* tenyésztett szikhólyag fragmentumokkal. A vad típusú bursákat, GFP csirkéből származó szikhólyag darabkába csomagoltuk, majd a „szikhólyag-boríték” két szabad szélét iridotomiás ollóval, az *in ovo* szikhólyag tenyészetnél bemutatott módon, összetapasztottuk. Az így keletkezett GFP szikhólyag – vad típusú bursa Fabricii rekombinált graftokat 9 napos, normál csirke embrió chorioallantois membránjára (CAM) implantáltuk. A tojás héját a légkamra fölött csipesszel eltávolítottuk, a héjhártyára pipettával pár csepp penicillin-sztreptomycin tartalmú PBS oldatot csepegtettünk, majd óvatosan csipesszel megkarcoltuk. Ennek hatására az oldat szétterült a héjhártya alatt, ami így könnyedén leválaszthatóvá vált. Ekkor feltárult a

gazdagon vaszkularizált CAM. Egy nagyobb, Y alakú ér-elágazás kiválasztása után, papírtörő segítségével felszakítottuk az apróbb kapillarisokat, majd erre a területre helyeztük a graftokat. A felesleges folyadékot felitattuk, majd átlátszó ragasztószalaggal lefedtük a tojáshéjon keletkezett nyílást. A graftokat (n=24) 7 napig tenyésztettük tovább, majd 4% PFA-ban fixáltuk 1 órán keresztül. A 24 kimerából 18 élt túl (75%). A fixálás után a graftokon, beágyazás után fluoreszcens immuncitokémiát végeztünk.

### **3.11 Embrionális bélszakaszok chorioallantois membrán (CAM) tenyésztése**

A bélidegrendszer intraganglionáris makrofágjainak hemopoietikus eredetének tanulmányozására 8 napos normál csirke közép- és utóbél szakaszokat transzplantáltunk 9 napos green fluorescent protein (GFP) csirke embriók CAM-jára a fenti módszerrel, majd 9 napig tovább tenyésztettük őket (n=22). A CAM tenyészetek 70%-a élte túl a 9 napos inkubációt

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1 CD45+ sejtek megjelenése a korai csirke embrióban

Bár a CD45 a legspecifikusabb hemopoietikus marker, részletes expressziós mintázata a korai csirke embrióban még nem ismert. Dolgozatom első célkitűzése az volt, hogy a második embrionális naptól (E2, vérképzés kezdete) a primer nyirokszervek megjelenéséig (E10) feltérképezzük a CD45+ sejtek megjelenését és eloszlását, illetve karakterizáljuk a vérképző őssejt differenciálódását immunhisztokémiai módszerek segítségével. A CD45+ sejtek immunfenotípezésére limfoid és mieloid sejtekre specifikus monoklonális ellenanyagokat alkalmaztunk. A CD51/61 az aortai endotél, trombocita prekursorok és a paraaortikus régióban található HSC-k közös markere (*Corbel, 2002; Viertelboeck and Gobel 2007*). A CD44-et sokfajta HSC, makrofág és nem-hemopoietikus sejt (*Corbel 2000*), míg a GRL2-t mieloid progenitorok és makrofágok expresszálják (*Thomas et al., 1993; Pardanaud and Eichmann 2006*). Az MHCII az antigén prezentáló sejtek és prekursorai differenciációs markere (*Guillemot et al., 1984; Nagy et al., 2006a*). A 74.3 csirke specifikus dendritikus sejt marker, a sejt szekréciós granulumjait jelöli (*Jeurissen et al., 1992; Nagy et al., 2004*); a Lep100 pedig a LAMP-1 lizoszómális membrán-glikoproteint teszi láthatóvá makrofágokban (*Lippincott-Schwartz and Fambrough 1986; Pardanaud and Eichmann, 2006; Nagy et al., 2016a*). A 74.2 és a KUL-01 ellenanyagok az érett makrofágokat jelölik (*Staines et al., 2014; Jeurissen et al., 1992*). A chB6 az összes B-sejtet (*Igyarto et al., 2008; Nagy et al., 2016a*), míg a CD3 az összes T-sejtet jelöli. Ezen felül, használtunk savas-foszfataz hisztokémiát a makrofágok elkülönítésére (*Cuadros et al, 1992*), illetve endogén peroxidáz reakciót (*Nagy and Goldstein, 2006*) az eritrociták azonosításához.

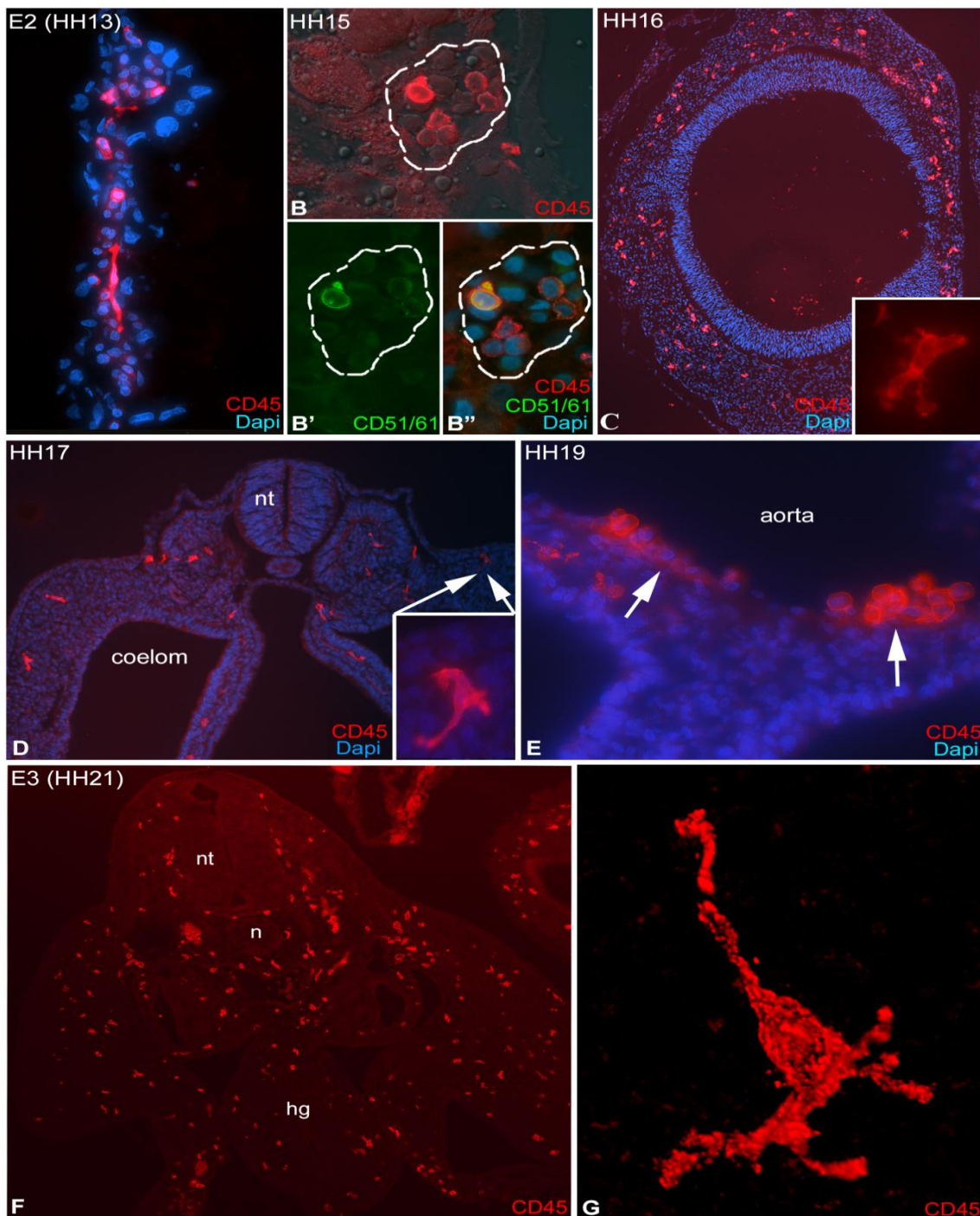
A szikhólyag immunhisztokémiai elemzése a HH7-HH13 stádiumban (fejlődés 24. és 50. órája között), a vérkeringés beindulása előtt azt mutatja, hogy mind az endoteliális mind a nem-endoteliális sejtek CD45 negatívak az extraembrionális vérszigetekben (*Sheng, 2010*). Az első CD45 expressziót mutató sejtek HH13 stádiumban (50 óra) jelennek meg és két különböző fenotípust mutatnak: a kerek morfológiájúak a vérszigetek lumenében, a nyúlványosak a vérszigetek közötti mesenchymában fordulnak elő (7. ábra A,B). Ebben a korai stádiumban még nem

található CD45+ sejt intraembrionálisan. HH15-16 fejlődési stádiumban (56-60 órás embrióban) a keringés megindulása után, az embrionális erek lumenében is megjelennek az első kerek CD45+ sejtek. Megfigyeltük, hogy HH15-től mind a szikhólyagi vérszigetekben, mind az embrió ereiben a CD45+ sejtek egy kisebb szubpopulációja CD51/61 trombocita markert kezd expresszálni (7. ábra C), mely megegyezik korábbi megfigyelésekkel, amelyek alapján a primitív szikhólyagi vérképzés is képes korai trombociták létrehozására (*Corbel 2002*). A keringésben található sejtek mellett ebben a stádiumban figyelhető meg először intraembrionálisan nyúlványos CD45+ sejt, amely koncentráltan a cranialis mesenchymában a neuroepitélium körül fordul elő. A nyúlványos sejtek egy része bevándorolt a neuroepitéliumba is. Ezek a sejtek vékony, csillag alakú citoplazmával és hosszú nyúlványokkal rendelkeznek, hasonlóan a szikhólyag vérszigetei között megjelenő első CD45+ sejtekhez. A nyúlványos CD45+ sejtek pár órával később (HH17 stádiumban, 64 óra) az embrió törzsi mesenchymáját is benépesítik (7. ábra D), miközben a kerek CD45+ sejtek az dorzális aorta ventrális falához tapadva az intraaortikus redőket alakítják ki. Ez az első embrión belüli vérképző hely lesz (*Dieterlen-Lievre and Martin, 1981; Jaffredo et. al., 1998*). A HH19 stádiumú (3 nap) embrióban az intraembrionálisan található kerek CD45+ sejtek kizárólag az erek lumenében, vagy az intraaortikus redőket képezve fordulnak elő (7. ábra E). A nyúlványos CD45+ sejtpopuláció mintegy 12-24 órával korábban jelenik meg, mint az aortai vérképzés, ami arra utal, hogy az nem származhat kerek sejtek prekursoraitól. Kevesebb, mint 12 órával később (HH21 stádium, 3,5 nap) az embrióban előforduló CD45+ sejtek döntő többsége nyúlványos morfológiát mutat, és egyenletesen szétszórva megtalálható az egész embrionális mesenchymában (7. ábra F,G).

#### **4.2 CD45+ sejtek megjelenése és differenciálódása a primer vérképző- és nyirokszervekben**

Az 5 napos csirke embrióban (HH26) a növekvő számú nyúlványos CD45+ sejtek szétszóródnak a gerinchúr és a velőcső körül, belépnek a felszíni-, illetve a neurális ektodermába (8. ábra A), de megjelennek a fejlődő májban, pancreasban, szívben, bélcsőben, illetve a végtagbimbók mesenchymájában is (8. ábra B-E). A CD45+ sejtek differenciálódásának nyomon követésére kettős immuncitokémiai festéseket alkalmaztunk.

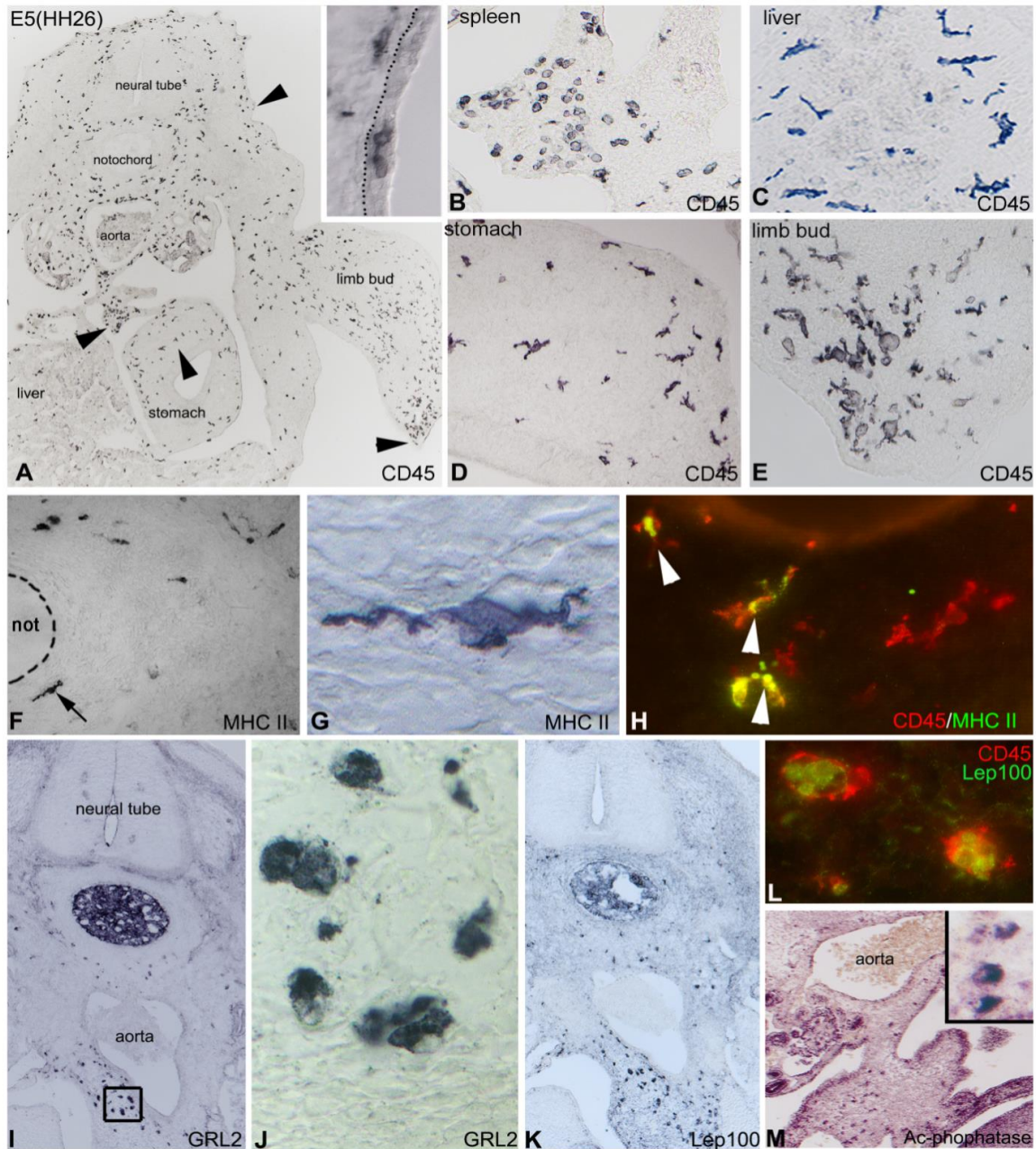




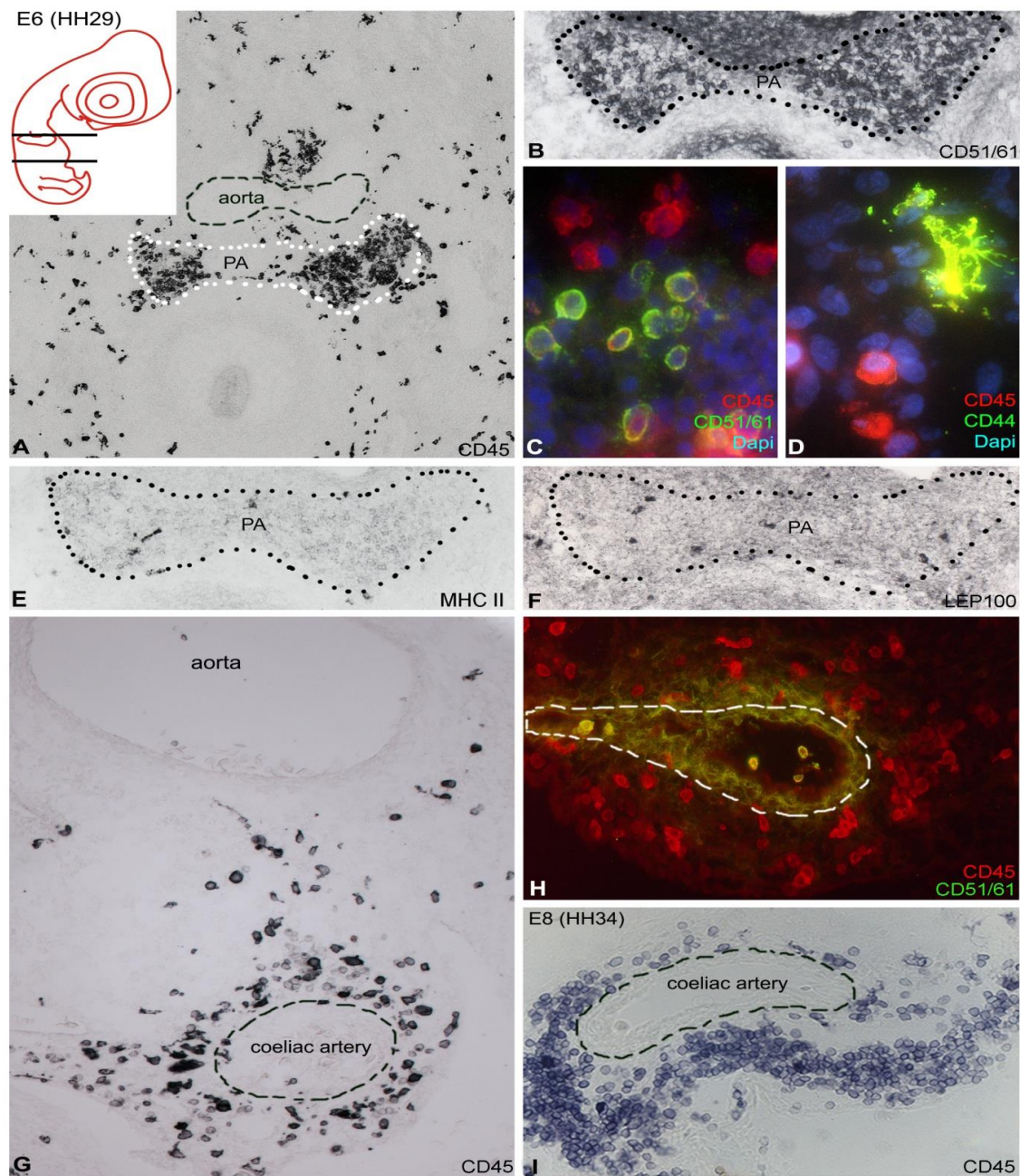
7. ábra. Az első CD45+ sejtek megjelenése a 48-84 órás (13-21 Hamburger-Hamilton [HH] stádiumú) embrióban. (A) HH13 stádiumban a CD45+ sejtek a szikhólyag vérszigeteiben található meg és többségük kerek morfológiát mutat (nyíl). Egy kisebb számú CD45+ sejt populáció a szikhólyag mesenchymájában is jelen van, ezek megnyúlt morfológiájú, nyúlványos sejtek (nyílhegy). (B) HH15: egyre nagyobb számú CD45+ sejt van jelen az extraembriónális keringésben, némelyik kerek CD45+ sejt CD51/61-et is expresszál (B'B''). (C) HH16 (keresztmetszet az agyhólyagok szintjén): számos CD45+ sejt található a feji mezodermban és a neuroepitéliumban (kinagyítva egy nyúlványos sejt látható). (D) HH17: a nyúlványos sejtek megtalálhatók a mesenchymában. (E) HH19 stádiumban az intraaortikus régiót lekerekített CD45+ sejtek aggregátumai képezi. (F) HH21: CD45+ sejtek az intraembriónális szerveket is benépesítik. (G) Konfokális mikroszkópos felvétel egy nyúlványos CD45+ sejtről. hg: utóbél; not: gerinchúr; nt: velőcső

MHCII immunhisztokémia a notochord és aorta körüli mesenchymában több pozitív sejtet mutatott ki, amelyek hasonló morfológiával rendelkeztek, mint a CD45+ nyúlványos sejtek a többi szervkezdeményben (8. ábra F,G). A kettős fluoreszens festés több sejtben is a CD45/MHCII koexpresszióját mutatta ( $9\pm 8,9\%$ ) (8. ábra H). GRL2 monoklonális antitesttel történő festés egy csoport amőboid karakterű sejtet azonosított a végtag bimbóban és az aorta körüli mesenchymában (8. ábra I,J). A makrofág-specifikus Lep100 antitest hasonló morfológiájú sejteket jelölt, viszont ezek a sejtek más makrofág markerekkel (74.2, vagy a KUL01) nem jelölődtek.

A CD45/Lep100 kettős immunfluoreszens jelölés a lizoszóma-marker kolokalizációját mutatta az amőboid CD45+ sejtekben (8. ábra L). A CD45+GRL2+Lep100+ sejtek makrofág fenotípusát savas foszfataz hisztokémiával is bizonyítottuk (8. ábra M). Ez a sejtpopuláció morfológiailag és immunológiai jól elkülöníthető a CD45+MHCII+ vagy CD45+MHCII- nyúlványos sejtektől. A csirke embrióban azok a kerek CD45+ sejtek, melyek eleinte az aortaredőkben jelennek meg HH19 stádiumban és nem kerülnek a keringésbe, az 5. és 6. embrionális nap között az aortától ventralisan elhelyezkedő mesenchymába lépnek át és a következő vérképző helyet, a paraaortikus régiót hozzák létre (*Dieterlen-Lievre and Martin, 1981; Jaffredo et al., 1998; Jaffredo et al., 2000*). CD45 immunpozitivitás a paraaortikus régió területén először a 6 napos csirke embrió keresztmetszetén látható, ahol nagy számú kerek CD45+ sejt jelenik meg a dorzális mezentérium területén, az aortától és a nyelőcsőtől caudálisan, a mesonephros telepéig terjedve (9. ábra A). Kettős immunfluoreszens festésekkel kimutattuk, hogy a CD45+ sejteknek jelentős része ( $49\pm 19,6\%$ -a) CD51/61 trombocita markert is expresszál (9. ábra B,C). A CD44 marker jellemzően nem fejeződik ki kerek CD45+ sejteken, viszont kolokalizál néhány amőboid és nyúlványos CD45+ sejtben ( $6,4\pm 3,2\%$ ) (9. ábra D). A paraaortikus régió nyúlványos és amőboid sejtjeinek egy része MHCII-t ( $5,4\pm 4,1\%$ ) és Lep100-at ( $5,2\pm 3\%$ ) is koexpresszál (9. ábra E,F). CD3 (pan T-sejt marker) és chB6 (pan B-sejt marker) pozitivitást a régióban nem lehetett kimutatni. Miközben a paraaortikus régió CD45+ sejtjeinek immunofenotípezését végeztük, a mesonephros telepétől caudálisan, az embrionális arteria coeliaca körül egy teljes „hemopoiitikus hüvelyt” fedeztünk fel, melyet kerek CD45+ sejtek aggregátumai alkotnak (9. ábra G).



**8. ábra. A CD45<sup>+</sup> hematopoetikus sejtek eloszlása és differenciálódása az 5 napos embrióban (HH26).** (A) E5 embrió sorozatmetszetének CD45 immunfestése számos nyúlványos sejtet mutat minden szervkezdeményben. A nagyított ábra az epidermiszből származik, CD45<sup>+</sup> nyúlványos sejtet mutat a felszíni epitéliumban. A pontozott vonal a bazális membránt jelöli. (B-E) Nyúlványos CD45<sup>+</sup> sejtek kolonizálják a lép, májat, gyomrot és végtagbimbókat. Nagyszámú, kerek morfológiájú CD45<sup>+</sup> sejt található a lépben. (F-H) Az intraembriónális mesenchymában a CD45<sup>+</sup> sejtek egy csoportja MHC II-t is kifejez (H, nyílhegyek). A nagyított G jelű képen (F ábrán nyíl mutatja) megfigyelhető a sejtek nyúlványos morfológiája. (I-M) A makrofágok differenciációját a Grl2 és Lep100 markerek jelzik. (I) Sok Grl2<sup>+</sup> sejt csoportosul az aorta körül. (J) A nagyított kép az (I) ábrán bekeretezett részből mutatja a Grl1 immunreaktív citoplazmatikus granulomokat tartalmazó amöboid sejtet. (K) Lep100 markerrel hasonló sejtpopulációt azonosíthatunk. (L) CD45 és Lep100 kettős immunfestés igazolja a LAMP1+ lizoszómák jelenlétét az amöboid megjelenésű CD45<sup>+</sup> sejtek citoplazmájában. (M) Savas-foszfátáz festés a szomszédos metszetről igazolja a makrofágok jelenlétét a mesenchymában (nagyított ábrán megfigyelhetők a savas-foszfátáz<sup>+</sup> sejtek). not: gerinchúr

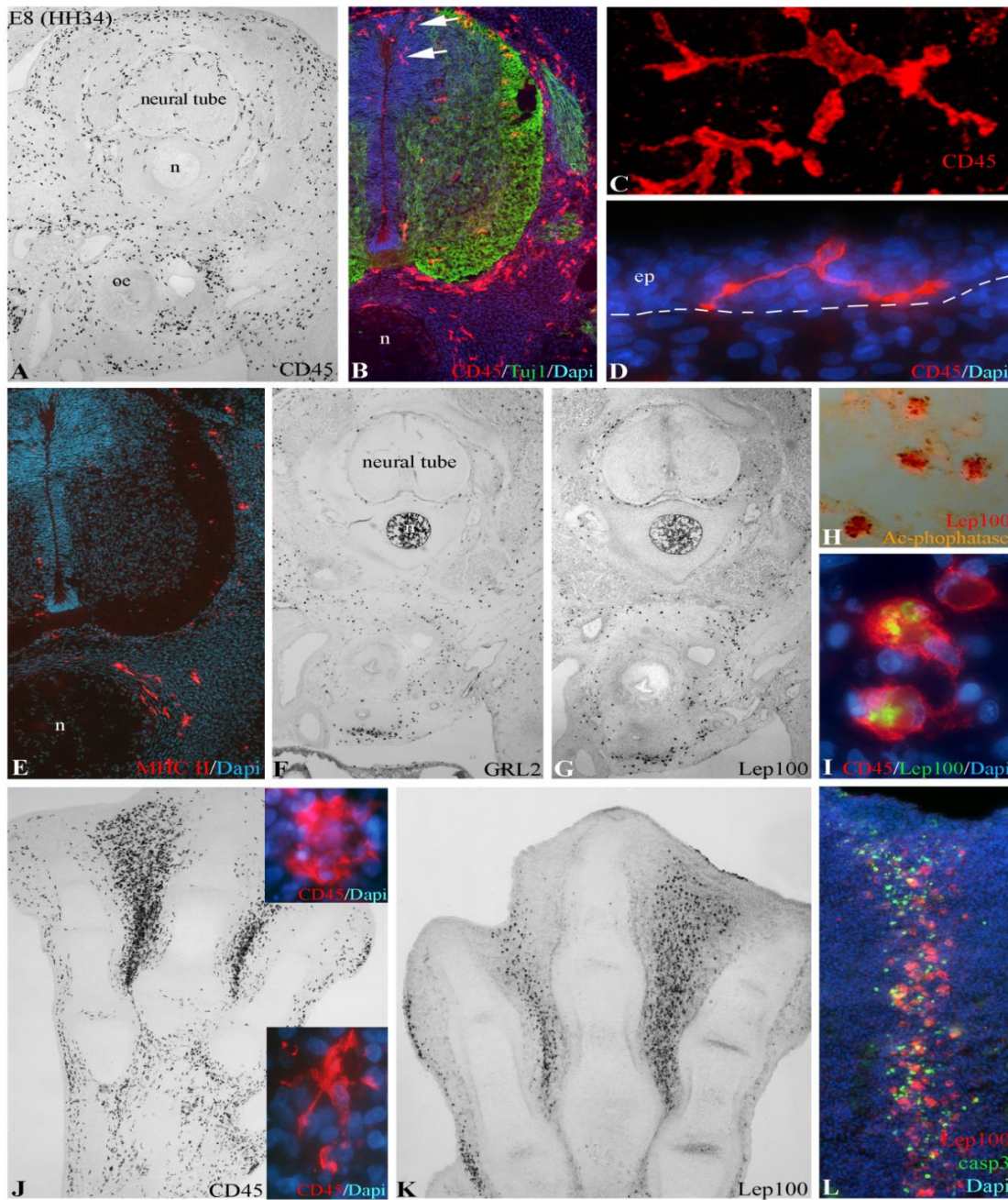


**9. ábra. A CD45+ sejtek fenotípusa és megjelenése a paraaortikus területeken. (A)** 6 napos (E6) embrió mellkasi régiójának metszetén készült CD45 monoklonális ellenanyaggal készült immunfestés számos sejtet rajzol ki az embrionális mesenchymában. CD45+ sejtek nagy csoportjai található meg az aorta alatt. A pontozott vonal a paraaortikus régiót (PA) jelöli, mely nagy számú CD51/61 immunreaktív sejtet tartalmaz (B). (C,D) Párhuzamos metszeteken CD45, CD51/61 és CD44 kettős festések láthatók. Számos CD45+ sejt a CD51/61 markert is kifejezi, míg a CD44 festés csak néhány amöboid és nyúlványos sejtet jelöl. (E,F) Elszórt MHC II+ és Lep100+ sejtek (nyilak) a paraaortikus régió periferiáján. (G-I) 6 napos (G,H) és 8 napos (I) embriókban a CD45+ sejtek az arteria coeliaca körül koncentrálnak, egy jól fejlett peri-arteriális hematopoetikus hüvelyt képezve (G). (H) CD45 és CD51/61 kettős immunfluoreszcens festés kirajcolja az arteria coeliaca CD51/61 markereket expresszáló endotéliumát. A peri-arteriális CD45+ sejtek nem fejezik ki a CD51/61 markereket. Kevés CD45+CD51/61+ sejt található az artéria lumenében. Szaggatott vonal jelzi az arteria coeliaca-t. (I) 8 napos embrióban (E8) jól kifejezett CD45+ peri-arteriális hematopoetikus hüvely veszi körbe az arteria coeliaca-t. PA: paraaortikus

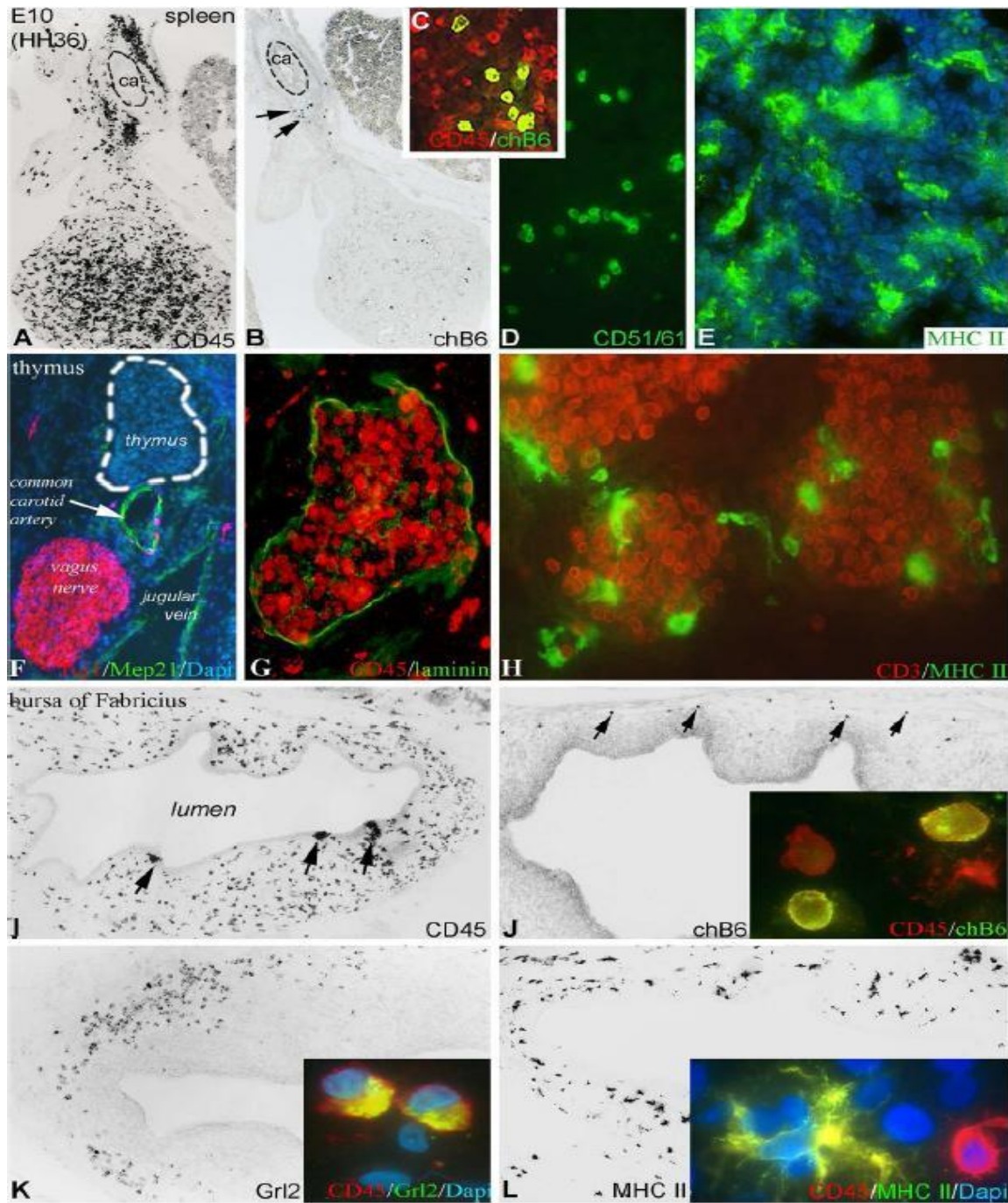
A gyűrű-szerű hemopoiotikus lokusz sejtjei nem expresszáltak CD51/61 antigént, viszont az arteria lumenében néhány kettősen pozitív sejt figyelhető meg (9. ábra H). A „periarterialis hemopoiotikus” gyűrű a 6. embrionális napon jelenik meg és a 9. embrionális napig van jelen az aorta páratlan zsigeri ágai körül (9. ábra I).

Az embrionális fejlődés 8. napjára a CD45+ sejtek benépesítik az összes embrionális szövetet, beleértve a neuroepitéliumot is (10. ábra A-C). Erősen nyúlványos CD45+ sejtek az epidermiszben is feltűnnek, amelyek Langerhans sejtek előalakjai lehetnek (10. ábra D). A velőcső körül előforduló nyúlványos CD45+ sejtek egy része MHCII molekulát expresszál ( $23.5 \pm 12.6\%$ ) (10. ábra E), viszont negatív a Lep100 klasszikus makrofág markerre. Ebben a stádiumban az utóbb említett amőboid alakú fagocita sejtek főleg az aorta körüli mesenchymában, a bélfalban és a végtagok interdigitális régióiban figyelhetőek meg (10. ábra F-I,K). Az amőboid sejteket savasfoszfataz enzim aktivitás jellemzi (10. ábra H). A CD45/Lep100 kettős jelöléssel jól látszanak a LAMP1 molekulát kifejező lizoszómák a sejtek citoplazmájában (10. ábra I). A végtagbimbó területén két eltérő CD45+ sejtpopuláció különíthető el: a nyúlványos CD45+ sejtek egyenletesen szétszóródva helyezkednek el a végtag mesenchymában, míg az amőboid CD45+Lep100+ makrofágok jellemzően a fejlődő ujjak közötti interdigitális régiókban összpontosulnak (10. ábra J), ahol közeli kapcsolatban állnak az apoptózison áteső szövetek kaszpáz-3 (casp-3) expressziójával (10. ábra K,L).

A 8. és 10. embrionális nap között a nyúlványos CD45+ sejtek száma folyamatosan növekszik. Ebben az időszakban, a megjelenő limfomieloid szervek (lép, tímusz, bursa Fabricii) is kolonizálódnak CD45+ sejtekkel. A korai embrióban a lép vérképző szervként működik, granulocitákat és eritrocitákat is képez (*Yassine et al., 1989*). A lépkezdemény a duodenumtól és a pancreasteleptől dorzálisan jelenik meg a 4 napos csirke embrióban, és elszórva CD45+ sejteket tartalmaz (8. ábra B). A 10. embrionális napra már nagy mennyiségű CD45+ sejt kolonizálja a lép mesenchymáját (11. ábra A). Néhány kerek CD45+ sejt B-sejt specifikus chB6 antigént expresszál (11. ábra B,C). B sejtek a truncus coeliacus körüli kötőszövetben is előfordulnak (11. ábra B nyilak). B sejtek mellett CD51/61+ trombociták (10. ábra C) és nyúlványos MHCII+ sejtek is megfigyelhetők (11. ábra D) a 10 napos csirke lépben.



**10. ábra. CD45+ sejtek azonosítása és karakterizálása 8 napos embrióban (E8).** (A) 8 napos embrió (HH34) keresztmetszetein a CD45 immunfestés számos nyúlványos sejtet kirajzol az embrionális mesenchymában. (B) A velőcső CD45 és Tuj1 kettős festése CD45+ nyúlványos sejtek (nyílak) jelenlétét mutatja a Tuj1+ neuroepitéliumban. (C) A CD45+ sejtek fejlett nyúlványait konfokális mikroszkópos felvételeken azonosíthatjuk. (D) Egy különálló nyúlványos CD45+ sejt figyelhető meg az embrió felszíni epitéliumában (pontozott vonal jelöli az bazális membránt). (E) MHC II-t expresszáló, nyúlványos morfológiával bíró sejtek a gerinchúr (not) mellett csoportosulnak. Grl2+ (F) és Lep100+ (G) amőboid sejtek elszórtan az egész embrióban megtalálhatóak. Ezek a Lep100+ sejtek a savas-foszfátázt (H) és a CD45 markert (I) egyaránt expresszálják. (J) A végtagbimbó interdigitális régiójában amőboid alakú CD45+ sejtek halmozódása figyelhető meg, miközben nyúlványos sejtek elszórtan helyezkednek el a végtagbimbó mesenchymájában. A kinagyított képek amőboid és nyúlványos CD45+ sejteket mutatnak. (K) A végtagbimbó Lep100 immunfestése amőboid sejteket rajzol ki az interdigitális régióban, amelyek jelentős kaszpáz-3 immunreaktivitást is mutatnak (L). not: gerinchúr; oe: nyelőcső



**11. ábra. CD45+ sejtek differenciálódása a limfomioid szervekben.** (A-D) 10 napos csirke embrió (E10) lépének immunfestéses analízise monoklonális CD45 ellenanyaggal (A), chB6 markerrel, mely a B-sejteket (B,C), CD51/61 markerrel, ami a trombocitákat jelöli (D). Az E képen az MHC II+ sejtek láthatóak. A lépkezdemény nagyszámú CD45+ hematopoetikus sejtet tartalmaz (A), melyek közül néhány chB6 markert is kifejez (C). (F-H) 10 napos embrió immunfestése kirajzolja a tímusz kezdeményét a Tuj1+ nervus vagus és a MEP21+ arteria carotis communis mellett (F). CD45+ sejtek bevándorolnak a tímusz laminin immunfestéssel kirajzolt bazális membránján keresztül (G), ahol CD3+ T-sejteké és nyúlványos MHC II+ sejtekké differenciálódnak (H). CD45+ hematopoetikus őssejtek 10 napos embrió bursa Fabricii epithelio-mesenchymális kezdeményében (I, nyilak). Kerek chB6+ (J) és GrI2+ sejtek (K), illetve MHC II+ sejtek (L) egyaránt megtalálhatók a bursa mesenchymájában. A nagyított képek a CD45+chB6+ B-sejt prekurzorokat, CD45+GrI2+ granulocitákat és CD45+MHC II+ sejteket mutatja. ca: arteria coeliaca

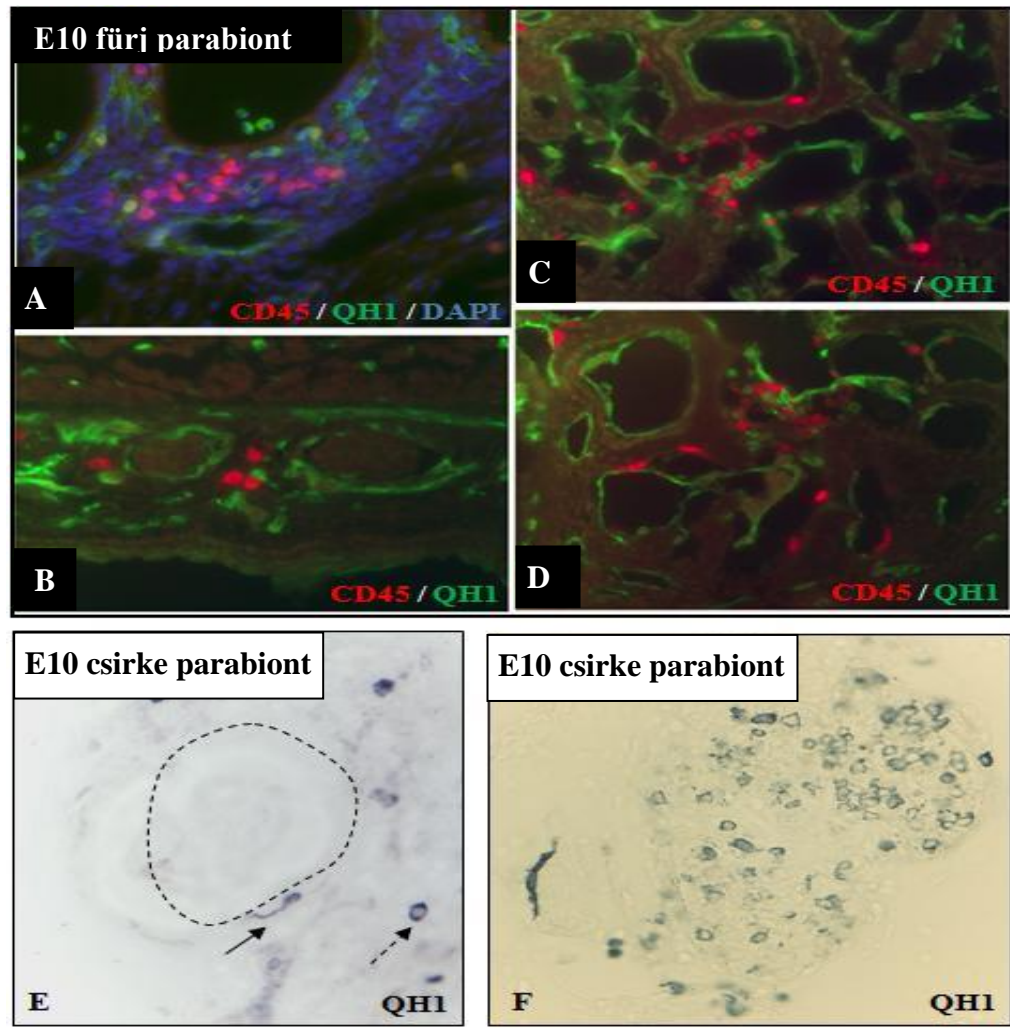
A tímusz epiteliális előtelepe az 5. embrionális napon fejlődik ki a pharyngeális entodermából és HH29 stádiumú embrióban már CD45+ sejtek kolonizálják. A 11. napra különálló tímusz lebenyek figyelhetők meg a vena jugularis és a nervus vagus között a nyaki régióban (10. ábra F), amelyeket CD45+ sejtek töltenek meg (11. ábra G). A kerek hemopoietikus sejtek CD3 T-sejt receptor antigént, a nyúlványos sejtek pedig MHCII molekulát fejeznek ki (11. ábra H).

Madárban a B-sejtérés elsődleges szerve a bursa Fabricii (BF). A BF kezdemény a cloaca ektodermális részének egy epiteliális divertikulumából fejlődik ki és az 5. embrionális napon jelenik meg csirke embrióban, ahol a farokbimbó mesenchymája veszi körül (Nagy and Olah, 2010). Az első CD45+ sejtek a 8 napos embrióban jelennek meg elszórtan a BF mesenchymájában, és egy részük kerek, míg egy másik sejtcsoport nyúlványos morfológiát mutat. A 10 napos bursában 3féle CD45+ sejtpopuláció írható le: 1) kis számú CD45+chB6+ kerek, B-sejt előalak egyenletesen szétszóródva a mesenchymában; 2) CD45+GRL2+ amöboid granulociták aggregátumai koncentráltan a BF proximális mesenchymájában lokalizálódnak; 3) CD45+MHCII+ sejtek, melyek nyúlványos morfológiát mutatnak és a bursa epitéliuma alatt csoportosulnak (11. ábra I-L).

### **4.3 CD45+ sejtek nyomon követése a keringésben parabiosis technikával**

A hemopoietikus sejtek korai differenciálódásának vizsgálata után arra kerestük a választ, hogy mi a kerek és nyúlványos hemopoietikus sejtek egymáshoz való viszonya? Ahhoz hogy megállapítsuk, hogy a szöveti, nyúlványos CD45+ sejtek származhatnak – e a keringésben előforduló kerek morfológiájú CD45+ sejtektől, egy csirke – fűj parabiózis létrehozására volt szükség. Ezzel a technikával nyomon követhető, ha egy keringésben lévő őssejt kilép az érfalon és a másik embrió mesenchymájában megtelepedve differenciálódik (Nagy et al, 2004; Nagy et al, 2005). A kísérlet során steril körülmények között, egy napos fűj és csirke embriókat öntöttünk egy közös csirketojásba majd 8-10 napig inkubáltuk őket.





**12. ábra. Csirke-fürj parabiózis. (A-D)** A fürj parabiontból készült metszetek (A,B: fejezoderma; C,D: csontvelő) CD45 immunfestése kis számú, kerek morfológiájú, csirkéből származó sejteket mutat. **(E,F)** A csirke parabiontok QH1 immuncitokémiai analízise alapján kerek és endotél-szerű sejtek származnak a fürj parabiont keringéséből.

Az embrionális fejlődés 5. napján a két embrió szikhólyag - keringése anasztomózisokat képezett, az embrióknak közös vérkeringése lett (6. ábra A-D).

A csirke parabiontból származó hemopoietikus sejteket a CD45, a fürj eredetű HSC-eket és endotél sejteket a QH1 marker alapján különítettük el a fogadó embriókban. Az immunfluoreszens festésekből kapott eredmények alapján a fürj embrió szöveteiben csak a kerek morfológiát mutató, CD45+ HSC-k fordultak elő, nyúlványos sejteket nem találtunk. Néhány CD45+ elnyúlt, endotél szerű sejtalakot lehetett felismerni a csontvelői erek falához tapadva, melyek egyértelműen elkülönültek a QH1+ fürj

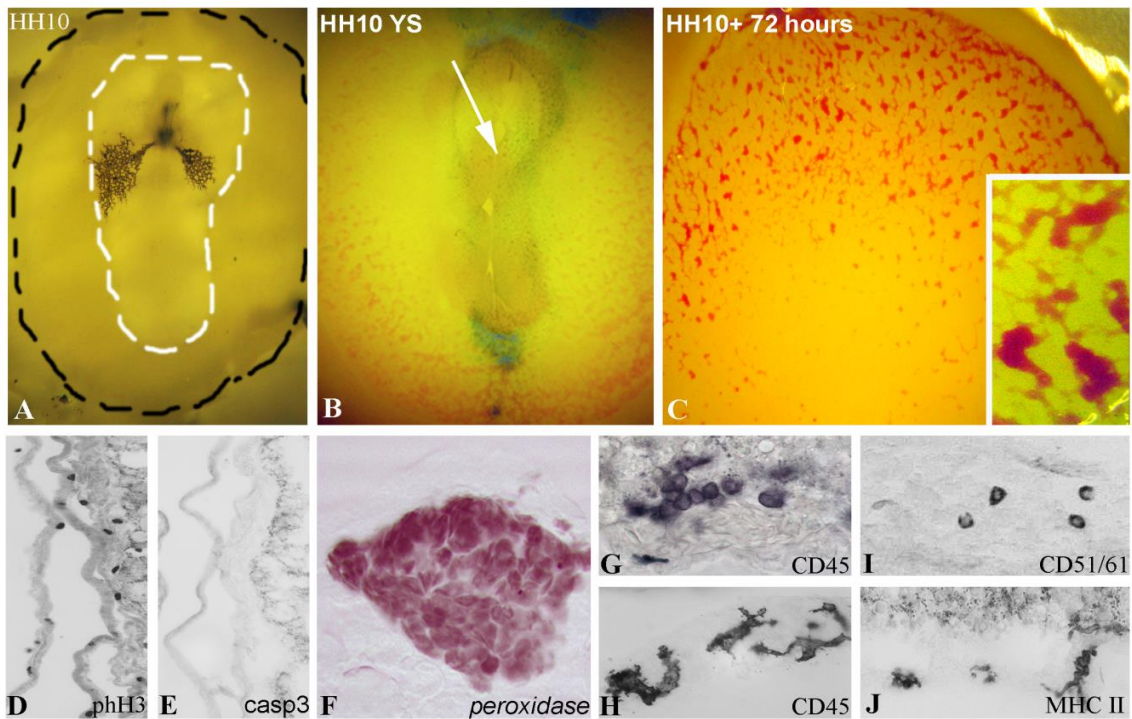
hemopoiitikus és endotél sejtektől (12. ábra A-D). Csirke-fürj parabiotikus kimérák immuncitokémiai vizsgálata azt mutatta, hogy csak a kerek sejtek keveredtek az embriókban, míg a nyúlványosok a közös keringés ellenére sem kolonizáltak kölcsönösen a szervek mesenchymáját. Ez a kísérletes eredmény felveti annak a lehetőségét, hogy az embriókban a kerek és nyúlványos sejt vonal már a keringés megindulása előtt szétválik és a kerek-sejtes forma nem prekuzora a nyúlványosnak. A másik parabiont partnerben is megtaláltuk a fürj embrió keringéséből bevándorolt HSC-eket, melyeket itt a QH1 fürj-specifikus hemopoiitikus és endotél marker jelöl (12. ábra E,F).

#### **4.4 Szikhólyag eredetű nyúlványos CD45+ sejtek kolonizálják az embrionális szöveteket**

Mivel jelenlegi ismereteink alapján a szikhólyagi hemopoiitikus sejtek sokféle sejté differenciálódhatnak, azt a hipotézist vetettük fel, hogy az intraembrionális CD45+MHCII+ nyúlványos sejt típus a korai szikhólyagban feltűnő, hasonló morfológiájú, CD45+ sejtektől származik. Ennek bizonyítására, HH10-es stádiumú (33 óra) csirke embriók ablációja után *in ovo* szikhólyag tenyészeteket készítettünk. Ebben a stádiumban az extra- és intraembrionális keringés között még nem áll fenn semmiféle kapcsolat, amelyet szívcsőbe történő tus injektálásával is igazoltunk (13. ábra A). A tusinjekciók folyamán vizualizált embriók mikrosebészeti eltávolítása után (13. ábra B), a szikhólyag lemezeit összetapasztottuk és tovább inkubáltuk 2 - 5 napig. Az inkubáció 3. napjára az extraembrionális mezoderma egész területén megfigyelhetőek voltak a jól fejlett vérszigetek és peroxidázt expresszáló eritrocita-aggregátumok (13. ábra C,F). A szikhólyagokat lefixáltuk, majd szövettani feldolgozás után foszfohiszton-H3 (pH3, proliferációs marker) és aktivált kaszpáz-3 (casp-3, apoptózis marker) immunhisztokémiát végeztünk. A metszeteken számos osztódó sejt alakot mutatott a pH3 festés, míg kaszpáz-3 immunreaktivitás nem volt tapasztalható (13. ábra D,E). A tenyészetek viabilitásának vizsgálata után CD45 immunfestést alkalmaztunk, ahol kétféle CD45+ sejtet azonosítottunk: 1) kerek CD45+ sejtek (13. ábra G), melyek egy része CD51/61 trombocita markert is expresszált (13. ábra I) és a vérszigetek lumenén belül fordultak elő, 2) nyúlványos CD45+ sejtek (13. ábra H), melyekre az MHCII

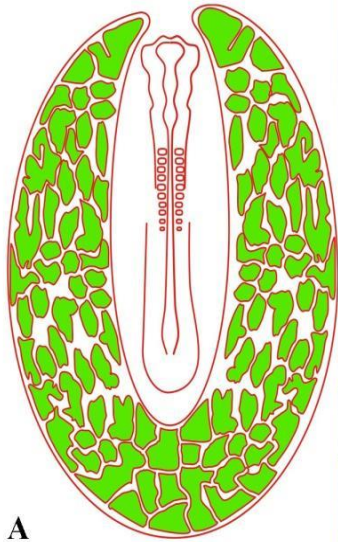
koexpresszió volt jellemző (13. ábra J) és a vérszigetek közötti mesenchymában lokalizálódtak.

Ahhoz, hogy az intraembrionális nyúlványos CD45+ sejtek szikhólyagi eredetét más módszerrel is bebizonyítsuk, szikhólyag-kimérákat készítettünk. Az első kísérletben HH10 stádiumú GFP csirke embriópajzsból eltávolítottuk az embriót, majd hasonló korú, normál embrióval helyettesítettük (14. ábra A). Kísérletünk során készített 32 szikhólyag-kiméra közül funkcionáló keringéssel mindössze 6 élt túl az 5. embrionális napig (19%), ami megegyezett a korábban publikált túlélési aránnyal (*Pardanaud et Eichmann, 2011; Cuadros et al., 1992*). A feldolgozott kimérákban a GFP-pozitív szikhólyagi sejtek teljesen kolonizálták az embrionális graftokat és erős CD45 koexpressziót mutattak (14. ábra B,C). A GFP+ sejtek mindenütt megjelentek az embrionális mesenchymában és néhol beléptek a neuroepitéliumba is. Minden zöld GFP-vel jelölődő sejt egyben a CD45 hemopoietikus markerre is pozitív volt és hasonló eloszlási mintázatot mutattak, mint a normál embriókban. Az MHCII és CD51/61 antigének elleni immunfestések azt is megmutatták, hogy mindkét molekula számos GFP+ sejten expresszálódik (14. ábra D,E). A trombocita-specifikus CD51/61 csak a kerek GFP+ sejtek felszínén volt jelen, míg az GFP+MHCII+ sejtek a nyúlványos populáció tagjai közül kerültek ki. GFP-vel jelölt Lep100-at expresszáló amőboid sejtek is megjelentek a kimérákban, de csupán olyan régiókban, mint a végtagbimbók vagy az aorta alatti mesenchyma (14. ábra F). Korábban más kutatások is utaltak makrofágok progenitorjainak szikhólyagi eredetére (*Cuadros et al., 1992*), ami összhangban van saját eredményeinkkel. Az intraaortikus redők kerek CD45+ sejtjei viszont nem mutattak GFP-pozitivitást, mivel bizonyítottan intraembrionális eredetűek (*Dieterlen-Lievre, 1975*) (14. ábra G).

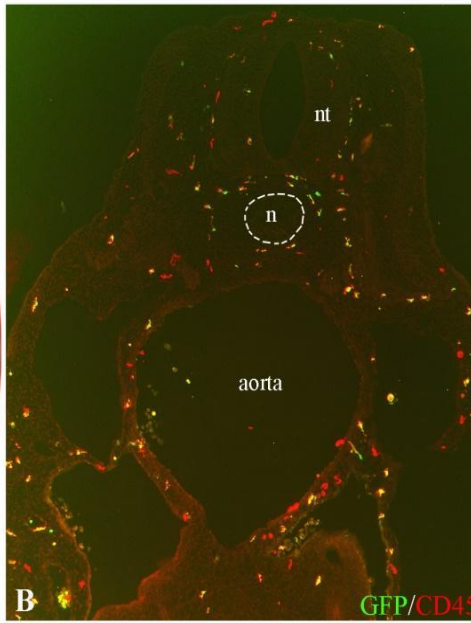


**13. ábra. Az *in ovo* szikhólyag tenyésztés lehetővé teszi a CD45+ szikhólyagi eredetű sejtek vizsgálatát.** (A-C) Intrakardiális tus injektálás HH10 stádiumú embrióba kirajzolja az embrionális keringést. Fehér szaggatott vonal jelzi a szikhólyag area opaca és area vasculosa területének határát. Vérszigeteket már találunk, de az embrió és a szikhólyag között a keringés még nem alakult ki. Fekete szaggatott vonal jelzi a szikhólyag külső határát. Az embrió mikrosebészeti eltávolítása után a szikhólyag széleit mechanikusan összezártuk (B, nyilak). 72 órával az embrió eltávolítása után nagy vérszigetek alakulnak ki a szikhólyagban (C, nagyított ábra). (F) Endogén peroxidáz aktivitás jelzi az eritrocitákat. (D,E) A vérszigetek metszetein foszfohiszton-H3 és kaszpáz-3 festéssel detektálhatók az osztódó és apoptotikus sejtek. Számos osztódó sejt figyelhető meg (D), apoptózisra utaló jelek nélkül (E). (G) CD45 immunfestés kerek morfológiájú sejteket rajzol ki a vérszigetek üregében. (H) Sok nyúlványos CD45+ sejtet találunk a szikhólyag mesenchymájában, a vérszigeteken kívül. (I) CD51/61+ trombocitákat szintén találunk a vérszigetek lumenében. (J) MHC II immunfestés hasonló morfológiájú sejteket rajzol ki, mint amik a H ábrán láthatók.

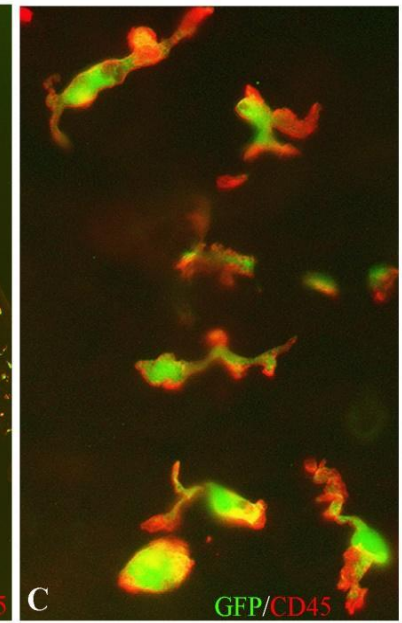
HH10 chick-GFP YS chimera



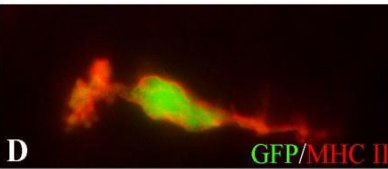
A



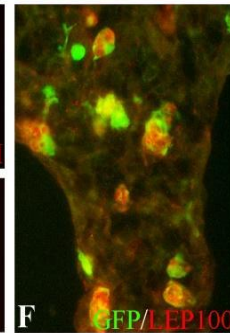
B



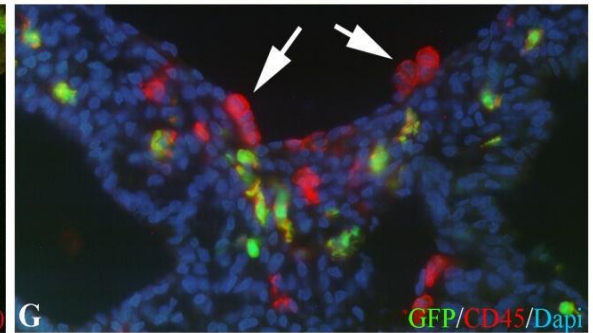
C



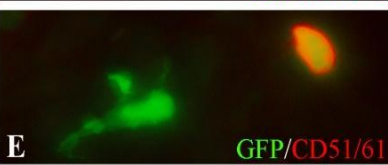
D



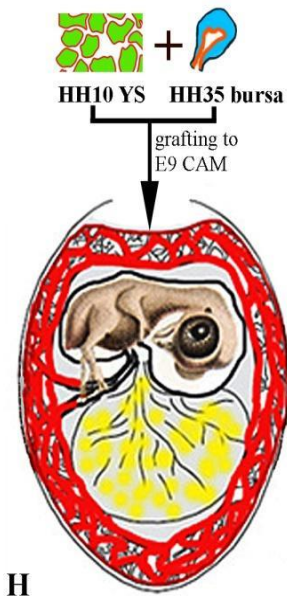
F



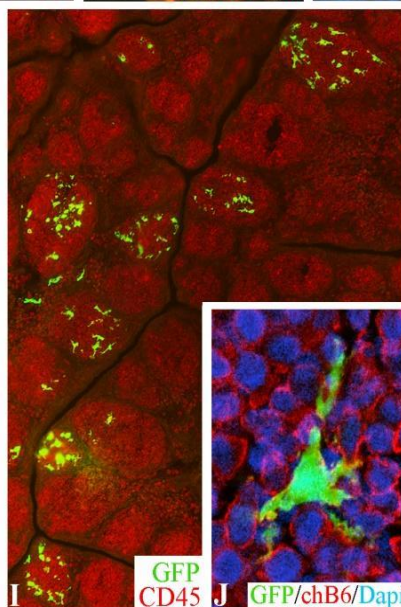
G



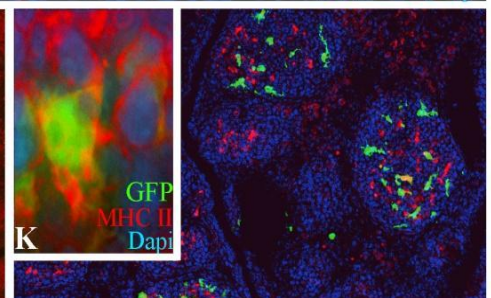
E



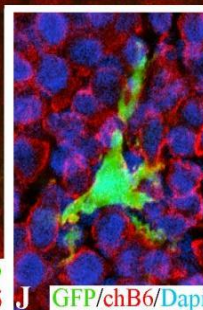
H



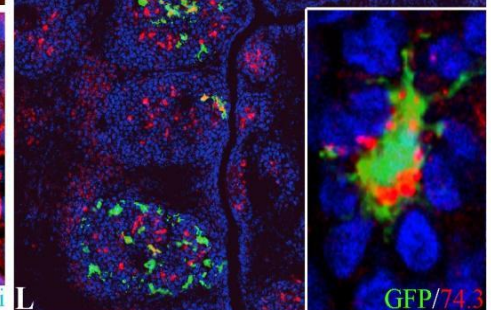
I




K



J



L

 **14. ábra. Szikhólyag eredetű sejtek hozzájárulása a korai embrióhoz.** (A) HH10 stádiumú embriót megfelelő korú GFP-s szikhólyagra transzplantáltunk, miután a recipiens tojásban található embriót korábban eltávolítottuk. (B) Három nap elteltével számos szikhólyag eredetű GFP+, CD45 markert expresszáló sejt jelent meg az embrióban; intravaszkulárisan, az embrió mesenchymájában, illetve a velőcsőben (nyilak). (C) Nagyobb nagyítással megfigyelhető, hogy az embrió mesenchymájában található CD45+GFP+ sejtek nyúlványos morfológiát mutatnak. (D-F) Az egymást követő metszeteken megfigyelhető, hogy a megnyúlt, GFP+ sejtek MHC II-t is expresszálnak (D). A kerek, keringésben lévő GFP+CD51/61+ sejtek (E), illetve GFP és Lep100 markerre egyaránt pozitív amőboid sejtek (F). (G) Nagy nagyítással megfigyelhető a dorzális aorta területén két CD45+ sejtpopuláció, melyek egyrészt szikhólyag eredetűek (GFP+) másrészt az embrióból származnak (GFP-). (H) A szikhólyagi-eredetű CD45+ sejtek a bursa Fabricii kialakításában betöltött szerepének vizsgálatára GFP+ szikhólyagot rekombináltunk 9 napos (E9) csirke bursájával és E9 chorioallantois membránon (CAM) tenyésztettük 7 napig. (I) A GFP+ sejtek kolonizálják a Bursa Fabricii limfoid follikulussait. (J) A GFP+ sejtek nyúlványos morfológiát mutatnak, és nem expresszálnak B-sejt specifikus antigéneket. (K) A follikulosokban mind a GFP+, mind a GFP- sejtek expresszálnak MHCII-t. (L) A csirke bursa szekrécións dendritikus sejtjeire (BSDC) jellemző marker (74.3) bizonyítja, hogy a szikhólyag eredetű CD45+ sejtek BSDC sejtékké differenciálódnak. A fejlődő follikulosok egyaránt tartalmaznak GFP+74.3+ és 74.3+GFP- (nyílhegyek) sejteket, melyek megfelelnek a GFP+, és a fogadó bursából származó BSDC-knek. Nagy nagyítású képen megfigyelhetők a GFP+74.3+ BSDC sejtek (L, nagyított kép). CAM: chorioallantois membrán; not: gerinchúr; nt: velőcső; YS: szikhólyag.

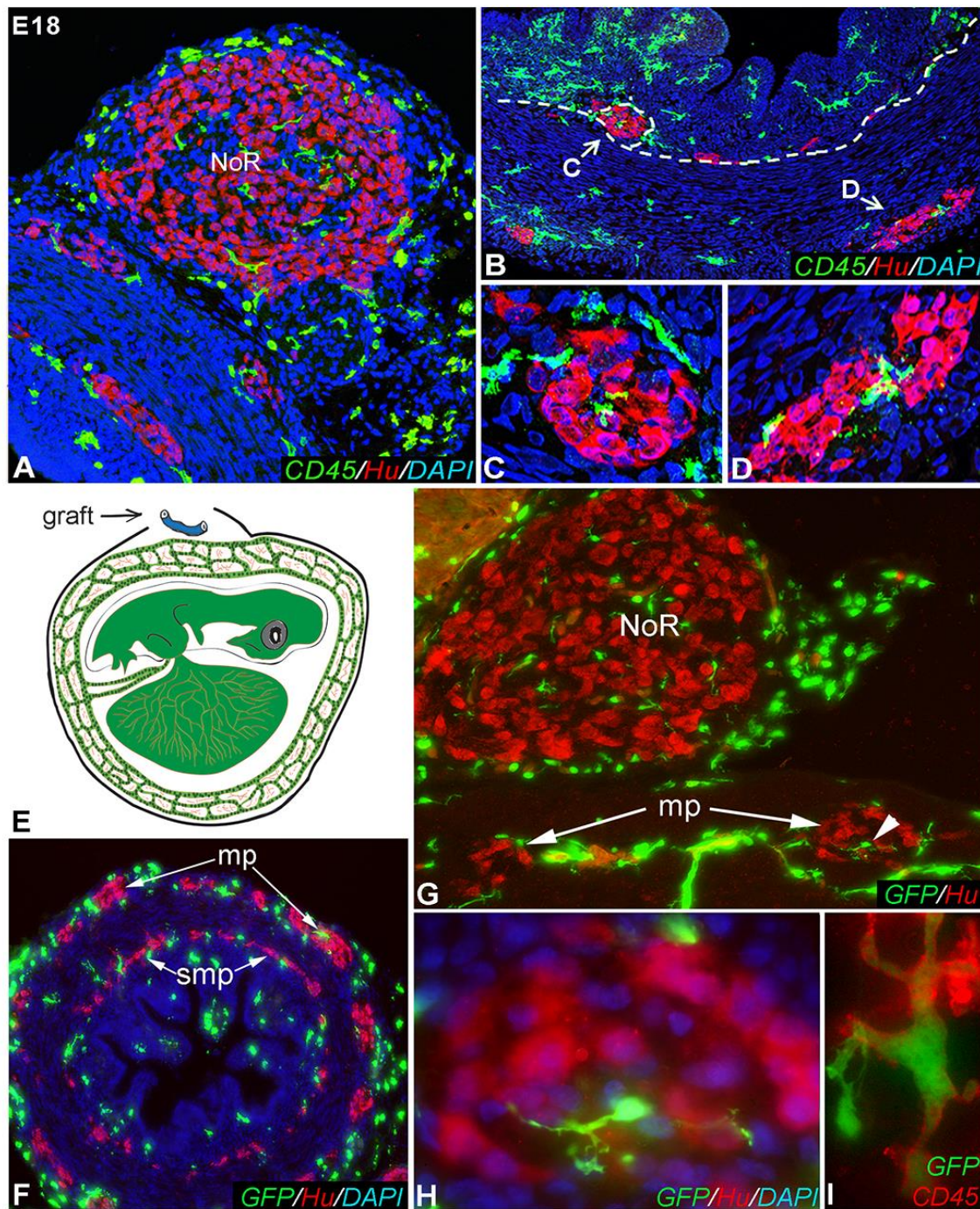
#### **4. 5 A bursa Fabricii dendritikus sejtjei a szikhólyagból származnak**

Az extraembrionális eredetű, nyúlványos CD45+ sejtek kolonizációs potenciáljának szikhólyag kimérákkal történő vizsgálata az 5. embrionális nap után már nem volt lehetséges a kimérák alacsony túlélési aránya miatt. Ezért ahhoz, hogy a GFP alapú sorstérképezést érettebb szövetekre, például kifejlődött nyirokszervekre is ki tudjuk terjeszteni, egy alternatív technikát kellett alkalmaznunk. Ehhez HH10 (33 óra) stádiumú GFP+ szikhólyag fragmentumokat kombináltunk 9 napos normál bursa Fabricii-vel, majd további 7 napig normál csirke embriók CAM-ján tenyésztettük őket (14. ábra H). Korábbi kísérleteinkben megmutattuk, hogy a bursák CAM tenyésztés folyamán vaszkularizálódnak és jelentős növekedésen esnek át, valamint a fogadó embrió keringő sejtjei is megtelepednek bennük (*Nagy et al, 2016b*). 9 nap tenyésztés után jól azonosítható CD45+ follikulosok jöttek létre a bursák parenchymájában. A follikulosokat donor-eredetű GFP+ sejtek kolonizálták, és az interfollikularis területen is számos GFP+CD45+MHCII+ sejt jelent meg. A follikulosokon belül lokalizálódó GFP+ sejtek nyúlványos morfológiát mutattak és mindegyikük CD45-öt expresszált (14. ábra I,J). A további immunitokémiai vizsgálatok azt mutatták, hogy az intrafollicularis GFP+ nyúlványos sejtek nem egyeznek meg a chB6+ B-sejtekkel (14. ábra J), viszont expresszálják az MHC-II antigént (14. ábra K). Mikor megnéztük, hogy a GFP+CD45+MHCII+ nyúlványos sejtek pozitívak-e a csirke dendritikus sejtet jelölő 74.3 antitestre, azt tapasztaltuk, hogy az összes follicularis donor-eredetű sejt

expresszálja a 74.3-at (14. ábra I). Ezen felül azt is megállapítottuk, hogy a folliculusok 74.3 pozitív sejtjeinek körülbelül a fele GFP negatív, mivel a BSDC-k prekursorainak egy része már a 9. embrionális nap előtt bevándorolt a normál embriókból eltávolított bursákba (14. ábra I). Eredményeink felvetik azt a lehetőséget, hogy a mikroglia és a Langerhans sejteken kívül, a primer nyirokszervekben található dendritikus sejtek egy csoportja is az embrionális fejlődés korai stádiumában bevándorolt szikhólyagi prekursorokból differenciálódik, és nem pedig csontvelői eredetű monocitákból.

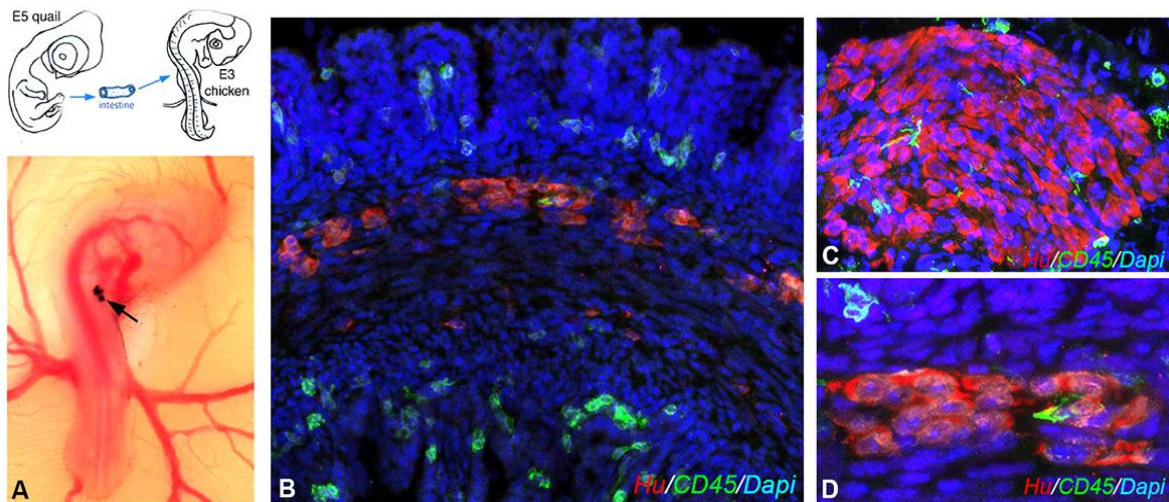
#### **4.6 Hemopoiitikus eredetű sejtek a csirke és egér bélidegrendszer ganglionjaiban**

A gasztrointesztinális traktus megfelelő működése nélkülözhetetlen a tápanyag transzportozhoz, felszívódáshoz, emésztéshez és a salakanyagok kiürítéséhez, de ezen felül fontos feladata a patogénekkal, allergénekkal és toxinokkal szembeni védelem, valamint a bélrendszer állapotának folyamatos ellenőrzése és szabályozása. Ennek a szigorúan szabályozott folyamatnak a bélidegrendszer (ENS) a főszereplője, mely az autonóm idegrendszer részeként a béltraktus mentén elhelyezkedő neuronok és gliasejtek hatalmas és komplex hálózata. A központi idegrendszer extrinsic beidegzése képes befolyásolni a bélidegrendszer funkcióit, de ettől függetlenül a bél intrinsic idegrendszereként maga az ENS szolgál (*Furness, 2008*). A CD45+ sejtek embrionális karakterizálása során arra lettünk figyelmesek, hogy egy nyúlványos makrofág populáció fordul elő a fejlődő bélső mesenchymájában, közel a bélidegrendszer plexus myentericusának ganglionjaihoz (*Dóra et al, 2017*). A 18 napos csirke embrióban végzett immunfluoreszens festések azt mutatták, hogy ezek a nyúlványos CD45+ sejtek egy része a myenterikus és submucosus plexus ganglionjain belül helyezkedik el és megtalálható a madár-specifikus Remak ganglionban is (15. ábra A-D). Ahhoz, hogy az újonnan azonosított sejt populáció hemopoiitikus eredetét bebizonyítsuk, 8 napos embrionális vastagbél szakaszokat 9 napos GFP-t expresszáló embriók CAM-ján tenyésztettünk (15. ábra E), majd 9 napos inkubáció után szövettanilag feldolgoztunk. A GFP+ sejtek a graftot teljes mértékben kolonizálták, beleértve a bélfal ganglionjait és a Remak ganglion-t is (15. ábra F-H).



**15. ábra. Hemopoietikus eredetű sejtek a madár embrió enterális ganglionjaiban.** (A-D) Kikelés előtti csirkeembriók (E18) vastagbelében nyúlványos hematopoetikus-eredetű CD45+ sejtek a Hu+ enterális neuronok között a Remak-ganglionban (NoR) (A) és az enterális ganglionokban is előfordulnak (B,C,D). A C és D ábrák nagyított képek a B ábrán mutatott bél submucosális és myenterikus ganglionjáról. (E) Sematikus ábra a chorioallantois membrán (CAM) transzplantációról, ahol 8 napos embrió (E8) vastagbél szakaszát 9 napos GFP+ fogadó embrió chorioallantois membránjára transzplantáltuk. (F) 9 nap elteltével Hu+ enterális neuronok submucosális és myenterikus plexusokban tömörültek. (G,H) GFP+ sejteket a Remak- (NoR) és a myenterikus ganglionokban (G, nyíl). A nyílhegygel jelzett ganglion a H ábrán kinagyítva látható. (I) A ganglionba bevándorló nyúlványos GFP+ sejtek CD45 markert expresszálnak. mp: myenterikus plexus, NoR: Remak-ganglion, smp: submucosális plexus



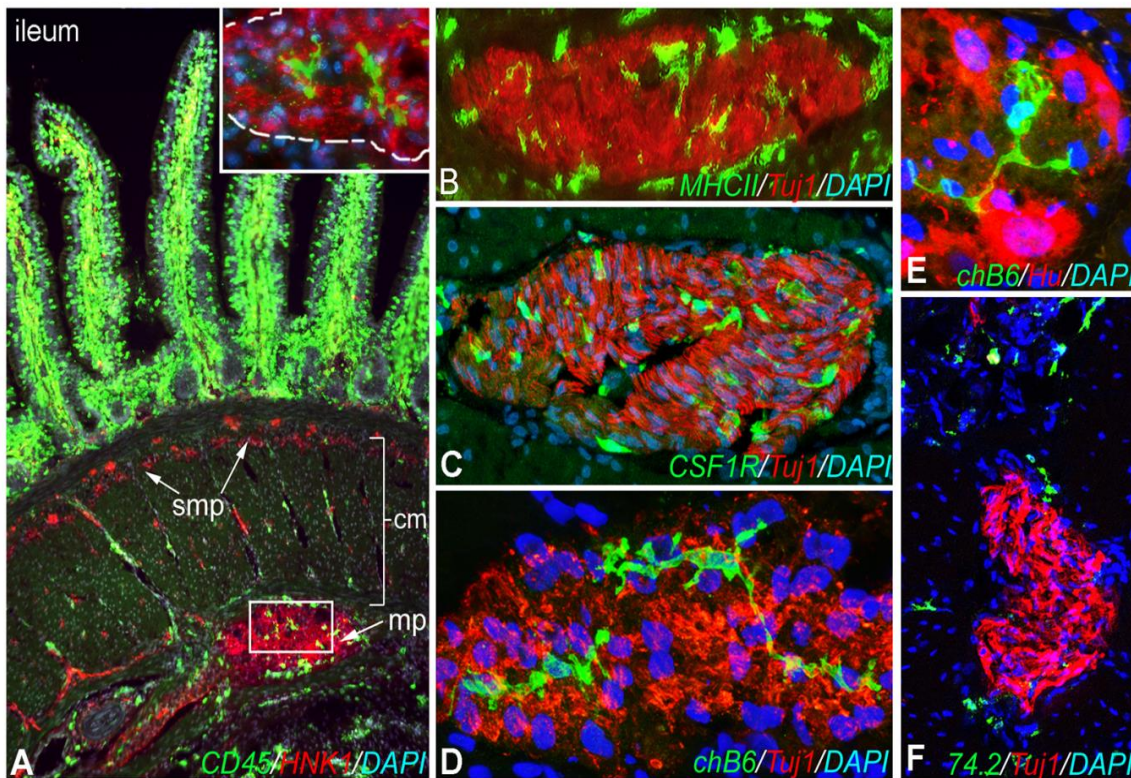


**16. ábra. Csirke-fürj testüreg kiméra az intraganglionáris makrofágok extrinsic származását igazolja.** (A) Az intesztinális csirke-fürj testüreg kimérákhoz 5 napos fürj embrió középbél szegmentjét transzplantáljuk 3 napos csirke embriók testüregébe. (B-D) 12 napos inkubáció után a fürj vékonybél graftban kifejlődnek a HU+ neuronokat tartalmazó enterális ganglionok és a Remak ganglion (B,C). Mind a fal, mind a Remak ganglionokba, a fogadó csirke embrió vérkeringéséből CD45+ hemopoietikus sejtek vándorolnak be, ahol nyúlványos morfológiát mutatnak (C,D).

Az intraganglionáris sejtek hemopoietikus eredetüknek megfelelően CD45-öt expresszáltak (15. ábra I), amelyet csirke-fürj testüreg kimérákkal is igazoltunk. Fürj vastagbél szakaszokat 3 napos csirke embriók testüregébe ültettünk és 8 napig tovább tenyésztettük őket. A graftok szövettani feldolgozása után csirke specifikus CD45 antitesttel azonosítottuk a fogadó embrió sejtjeit, melyek kolonizálták a fürj eredetű bélidegrendszer ganglionjait és a Remak gangliont is (16. ábra A-D).

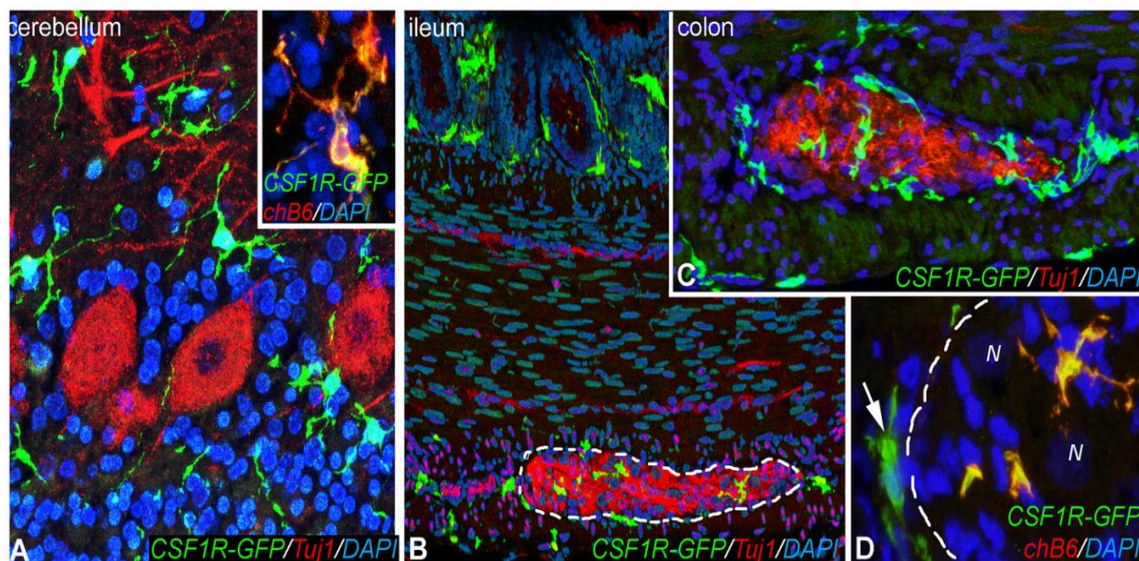
Az embrionális kiméra kísérletekből kiderül, hogy az intraganglionáris nyúlványos CD45+ sejtpopuláció a vérből származik, és nem dúcléc eredetű, ami enterális neuronokat és gliát hoz létre. A felnőtt csirke bélidegrendszerének immuncitokémiai jellemzése során megállapítottuk, hogy a CD45+ nyúlványos sejtek ugyanúgy jelen vannak a ganglionokon belül, és a CD45 sejtfelszíni molekulán kívül (17. ábra A) MHCII-t (17. ábra B), CSF1R-t (kolónia stimuláló faktor 1 receptor) (17. ábra C) és chB6 antigént (17. ábra D,E) fejeznek ki. Ez a tulajdonság makrofág fenotípusra utal, amiért a továbbiakban intraganglionáris makrofágoknak (IM) hívjuk ezeket a sejteket. Az MHCII molekula az összes antigén prezentáló sejt felszínén megtalálható. Jelen van a makrofágokon, a dendritikus sejteken (*Guillemot et al, 1984*;

Nagy *et al*, 2016), és a mikroglían (Hala *et al*, 1984). A chB6 a madár limfomielioid szervezetben előforduló B-sejtek markere (Igyártó *et al*, 2008; Veromaa *et al*, 1988), de kifejeződik a tobozmirigy és a belső fül érzékhámjának mikroglia sejtjein is (O'Halloran *et al*, 2004; Mosenson *et al*, 2006; Bird *et al*, 2010). A chB6 egy 70 kD tömegű homodimer transzmembrán protein, egy erősen glikolizált extracelluláris doménnel (Tregaskes *et al*, 1996). A fehérje funkciója még nem teljesen ismert, de egyes kutatások szerint szerepe lehet a B sejtek túlélésében, apoptózisában és adhéziójában is (Funk *et al*, 1997; Bhattacharya *et al* 2017). A bél mucosa rétegének B sejtjeivel ellentétben az intraganglionáris makrofágok nem fejeznek ki más B-sejt markereket, mint az EIVE-12 vagy a CD1, ami arra utal, hogy ezek a sejtek nem B limfociták.

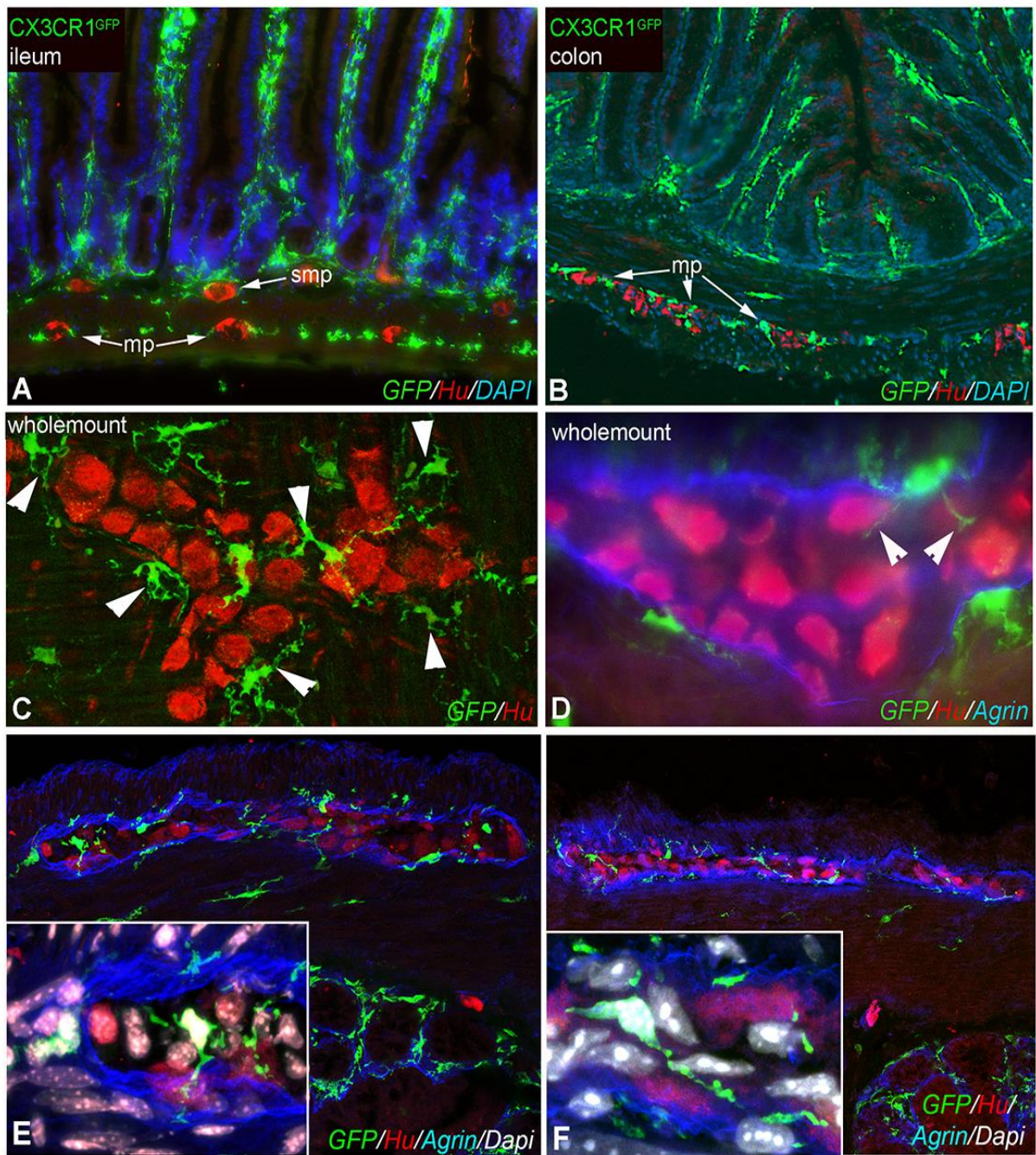


**17. ábra. Az intraganglionáris hematopoetikus-eredetű sejtek makrofág fenotípust mutatnak.** (A) Felőtt, 6 hetes csirkék vékonybél szakaszának immunfluoreszcens festése nagyszámú CD45+ nyúlványos sejtet jelöl a simaizomsejtek között, illetve a HNK1 antigént kifejező bélidegrendszer ganglionjainak belsejében (A, bekeretezve a nagyított részlet). (B-E) MHC II+ (B), CSF1R+ (C) és chB6+ (D,E) sejtek szintén megtalálhatók az enterális ganglionok belsejében. (F) A szöveti makrofág-specifikus 74.2 ellenanyag a ganglionon kívüli sejteket festi, a belül elhelyezkedőket nem jelöli. cm: körkörös simaizom; mp: myenterikus plexus; smp: submucosalis plexus

A CSF1R-t a monociták és makrofágok mellett (*Garcia-Morales et al, 2014*), a mikroglia sejtek is expresszálják (*Balic et al, 2014*). A CSF1R az emlősökben azonosított myenterikus makrofágokon kívül (*Muller et al, 2014*) az intraganglionáris makrofágokon is megtalálható (17. ábra C). A 74.2 ismeretlen citoplazmatikus molekulát jelöl, és specifikusan a szöveti makrofágokat jelöli (*Jeurissen et al, 1992; Nagy et al, 2005*). A 74.2 más madár szöveti makrofág ellenes antitestekhez hasonlóan, mint a Lep100, vagy a KUL-01 (MRC1-mannóz receptor 1), csak a ganglionokon kívül található myenterikus makrofágokat jelöli, az intraganglionárisakat nem. Transzgenikus CSF1R<sup>GFP</sup> reporter csirkék kisagyán, vékony- és vastagbelén is végeztünk komparatív immuncitokémiai jelöléseket. A chB6 antitesttel nagyszámú CSF1R+chB6+ intraganglionáris makrofágot sikerült azonosítani (18. ábra B-D). A központi idegrendszeri mikrogliahoz hasonlóan erre a sejtpopulációra is a CSF1R/chB6 antigének expressziója mellett a nyúlványos morfológia jellemző (18. ábra A).



**18. ábra. A chB6+/CSF1R+ makrofágok eloszlása a központi- és bélidegrendszerben.** (A-D) Konfokális mikroszkópos analízis 4 hetes CSF1R<sup>GFP</sup> transzgenikus csirke kisagyról (A), vékony- (B) és vastagbélről készült metszeteken (C,D). Tuj1-immunreaktivitás (piros) neuronokat (Purkinje sejteket), a GFP (zöld) expresszió a mikroglia jelöli. A nagyított kép egy szomszédos metszeten bizonyítja, hogy a CSF1R-t kifejező mikroglia sejtek (zöld) kolokalizálnak a chB6+ sejtekkel (piros). GFP+ makrofágok (zöld) jelen vannak a nyálkahártya és izomrétegekben a Tuj1+ (piros) myenterikus ganglionokban a vékony- (B) és vastagbélben (C) egyaránt. A muskuláris makrofágok (MM) kifejezik a GFP-t, de nem festődnek chB6-tal (piros), míg az intraganglionáris makrofágok a GFP-re és chB6 markerre kettősen pozitívak (D). N: enterális neuron



**19. ábra.** Az egér enterális ganglionja CX3CR1<sup>GFP</sup> makrofágokat tartalmaz. (A,B) CX3CR1<sup>GFP</sup> sejtek előfordulása az egér vékony- (A) és vastagbelének (B) myenterikus plexusában. (C,D) Ún. wholemount mintákon megfigyelhető a CX3CR1<sup>GFP</sup> sejtek és a myenterikus ganglion közötti kapcsolat. (E,F) A myenterikus ganglion metszetének konfokális mikroszkópos felvételén Hu (piros) és agrin (lila) festéssel periganglionáris és intraganglionáris CX3CR1<sup>GFP</sup> sejtek figyelhetők meg. mp: myenterikus plexus; smp: submucosalis plexus

Ahhoz, hogy meghatározzuk, létezik-e egy hasonló intraganglionáris makrofág populáció az emlősök bélidegrendszerében is, CX3CR1<sup>GFP</sup> transzgenikus egereket használtunk, amelyekben GFP jelöl minden CX3CR1 molekulát kifejező sejtet. A CX3CR1 a fraktalkin nevű kemokin receptora, melynek szerepét először limfociták és monociták túlélésében, migrációjában és adhéziójában mutatták ki (*Imai et al, 1997; Landsman et al, 2009*). Legutóbbi kutatások a mikroglia sejtek felszínén is igazolták jelenlétét és feltételezik, hogy a molekula szignalizációjának központi szerepe van központi idegrendszer fejlődésében és szinapszisok mikroglialis modulációjában (*Paolicelli et al, 2011*). A fraktalkin receptor (CX3CR1) azon kevés molekuláris marker közé tartozik, amelyek egyedülállóan jellemzőek az intesztinális makrofágokra és mikrogliaira, más szöveti makrofágok azonban nem expresszálják (*Bain and Mowat, 2014*). Vizsgálataink azt mutatták, hogy CX3CR1+ (19. ábra A,B) makrofágok találhatóak a vékony- és vastagbél myenterikus ganglionjai közelségében. “Wholemout” festésen kimutattuk, hogy a CX3CR1+ makrofágok nyúlványaikkal körbefonják a Hu+ enterális neuronokat (19. ábra C,D). Konfokális technikával készült képen megfigyelhető, hogy CX3CR1+ makrofágok vannak mind a ganglion közvetlen környezetében, mind azon belül. Előfordul, hogy a makrofágok nyúlványaikkal átnyúlnak a gangliont körülvevő, agrin ellenes antitesttel jelölt bazális membránon is (19. ábra E,F).

## 5. MEGBESZÉLÉS

### 5.1 Hemopoietikus sejtek megjelenése és differenciálódása a korai csirke embrióban

Zebrahal, csirke és egér modellállatokon végzett kísérletek igazolták, hogy a gerinces embrióban zajló hematopoiesis a vérképző őssejteket (HSC) képezi, amelyek intenzív proliferáció, migráció és differenciálódás után a gerinces szervezet vérszövetekévé válnak. Ez a folyamat anatómiailag elkülönült területeken történik: az extraembrionális mezodermban kezdődik (*primitív vérképzés*), majd az aorta dorsalisban, és a paraaortikus mesenchymában, illetve a magzati májban folytatódik (*definitív vérképzés*). A HSC-k végül a primer nyirokszerveket és a csontvelőt kolonizálják, ahol további HSC-k és differenciált előalakok képződnek.

Az „optimális” fejlődésbiológiai modellek kiválasztásánál az embriológusok számára a legfontosabb szempont mindig a könnyű hozzáférhetőség, laboratóriumi fenntarthatóság, gyors embrionális fejlődés, kísérletes manipulálhatóság és a beavatkozásokkal szembeni ellenállóképesség volt. A nagyméretű csirke embrió lehetővé tette, hogy már a XVII. században felismerjék a vérszigeteket (*Harvey 1628*), de a vénák és artériák közti különbséget is először itt írták le (*Malpighi 1672*). Madár embriókon végzett kutatások bizonyították a mezoderma endodermális indukcióját, a Hensen csomó organizátor szerepét és az embrionális entoderma epiblaszt eredetét is (*Bellairs 1953*). Az utóbbi években egyre nagyobb szerepet kaptak azok a madár embriókon végzett embriómanipulációs és sejtjelölési kísérletek, amelyekben nyomon követhető egy sejt típus eredete, vándorlása és differenciálódása. A viszonylag nagyméretű madár embrió lehetővé teszi a legváltozatosabb embriómanipulációs kísérleteket, melyekkel széleskörűen tanulmányozható a sejtek eredete, illetve a köztük fennálló interakciók az embrionális fejlődés folyamán. Különböző fluoreszcens festékek és dextránok (*Wetts et al, 1989; Serbedzija et al, 1990; Nagy and Goldstein, 2006a; Neudert and Redies 2008; Yvernogean and Robin 2017*), sejt vonal specifikus monoklonális ellenanyagok (*Milstein, 1999*), vagy csirke-fürj kimérák (*LeDouarin 1987; Nagy et al, 2012*) alkalmazása lehetővé tette egy-egy kérdéses sejt vonal embrionális sorsának feltérképezését. Madár embrionális kimérák alkalmas eszközt jelentettek annak meghatározására, hogy a csíralemezek sejtjei milyen szervek

kialakulásához járulnak hozzá. Ugyanakkor a már fejlődésnek indult szervtelepek transzplantációjával tisztázható az egyes sejttípusok eredete és sorsa. Kiméra kísérletekkel igazolták először a végtagizmok miotóm eredetét (*Brand-Saberi and Christ, 1999*), a bordákat létrehozó sejtek származását (*Huang 2000*), vagy a bélidegrendszer ganglionléc eredetét (*Le Douarin and Teillet 1973; Nagy et al, 2012*).

Fejlődésbiológiai adottságai miatt a madár embrió jelentős mértékben hozzájárult a vérképzés megismeréséhez. A csirke bursa Fabricii-ben fedezték fel a B limfocitákat, és a belőlük differenciálódó plazmasejtek ellenanyag termelését (*Glick et al, 1956; Glick 1994*). Itt írták le először, hogy a tímusz kolonizációja több hullámban történik. Csirke embrión végzett kísérletek alapján merült fel először, hogy a vérképzés egy primitív extraembrionális és egy definitív intraembrionális szakaszból áll (*Miller 1960; LeDourain et al, 1984*). Csirke-fürj kimérákkal sikerült bizonyítani, hogy az intraembrionális vérképzés az aortához asszociáltan, az intraaortikus redőkben és a paraaortikus régióban kezdődik (*Dieterlen-Liévre 1975; Jaffredo et al, 1998*). Ezt a megfigyelést kisebb zebrahal és emlős embriókon végzett kísérletek is alátámasztották (*Detrich et al, 1995; Tavian et al, 1999*). Madár embriómanipulációs kísérletek mutatták ki először, hogy az allantois vérképző szervként is működik (*Caprioli et al, 1998*), és itt merült fel először a hemangioblaszt elmélet, amely szerint a legelső HSC-k az endotél őssejtekkel (angioblasztok) közös őssejtből differenciálódnak (*Caprioli et al, 2001*). Habár az embrióban a vérképzést több okból intenzíven vizsgálták, a szikhólyagban képződő első hemopoietikus sejtek intraembrionális disszeminációja, vagy a vérképző őssejtek differenciálódásának immunitokémiai karakterizálása csak részben, illetve egyáltalán nem ismert.

Doktori munkámban először mutattunk be egy olyan átfogó analízist, amely nyomon követi a CD45+ HSC embrionális megjelenését és kolonizációját, valamint a sejtek morfológiai jegyeit és immunfenotípusát is részletesen leírja. A vérképzés a csirke embrióban HH5-7 stádiumban (19-26 óra) kezdődik a szikhólyag vérszigeteiben (*Minko et al, 2003; Bollerot et al, 2005; Nakazawa et al, 2006*). Az első vérszigetek GATA-2, SCL, és LMO2 transzkripciós faktorok aktivitásának hatására a másfél napos csirke embriópajzs posterior részén kondenzálódó mezoderális sejtekből alakulnak ki. A vérszigetekben hemoglobin szintézis kezdődik és létrejönnek az első eritroblasztok

(Minko et al, 2003). Az egér embrió szikhólyagjában, hasonlóan a csirke embrióhoz, először a CD45-negatív eritroblasztok jelennek meg (Palis and Yoder 2001). Második hullámban ezt követi egy közös eritromieloid őssejt, amely a CD41+ megakariocita, c-kit+ differenciálatlan és a CD45+F4/80+ mieloid prekursor sejteket hozza létre (Frame et al, 2013; McGrath et al, 2015; Frame et al, 2016; Palis 2016). Magasabb rendű gerincesekben a CD34 és a CD45 molekulák expressziója tekinthető a legelső megbízható felszíni markernek, amellyel HSC-ket embrióban azonosítani lehet. Irodalmi adatok szerint a csirke HSC-ket CD45 expressziójuk alapján ki lehet mutatni a HH15-17 stádiumú embrió (2-2,5 napos embrió) extraembrionális vérszigeteiben és az embrió belüli erek lumenében (Jaffredo et al, 1998; Jaffredo et al 2000; Balic et al, 2014). Csirkében CD34 ellenes ellenanyag nincs a kereskedelemben, eddig csak a CD34 RNS expresszióját sikerült azonosítani (McIntyre et al, 2008). CD45+ sejteket később többen is leírtak a HH21 stádiumú (3,5 nap) csirke embriók velőcsőjében és az intraembrionális mesenchymában (Kurz and Christ 1998; Kurz et al, 2001; Cuadros et al, 2006), de a CD45+ sejtek embrionális keletkezésének meghatározása és a limfomieloid szervek benépesítésének ontogenezeise nem teljesen feltárt. Kísérleteink során igazoltuk, hogy az első CD45+ sejtek kerek és elnyúlt morfológiát mutatnak, korábbi leírásokkal ellentétben nem intraembrionálisan (Jaffredo et al, 1998; Jaffredo et al, 2000), hanem a szikhólyagban jelennek meg, 6 órával korábban a HH13 stádiumú (50 óra) embrióban. Fontos kiemelni, hogy ebben a korai stádiumban az intra- és extraembrionális területek között nincs vérkeringés (Sheng et al, 2010) (13. ábra A).

Eredményeink alapján 4 eltérő morfológiájú és immunfenotípusú CD45+ sejtet azonosítottunk a madár embrióban: 1-2) kerek CD45+CD51/61- és CD45+CD51/61+ sejteket, melyek a korai HSC populáció egy részét, és az első trombocitákat jelentik; 3) amőboid CD45+Gr12+Lep100+savas foszfatáz+ makrofágokat; 4) nyúlványos, csillag alakú CD45+MHCII+ sejteket. Morfológiájukat és szöveti eloszlásukat tekintve az amőboid sejtsoport nagyon hasonlít a korábban fűjben leírt QH1+Lep100+, szikhólyagi makrofágokra (Cuadros et al, 1992; Pardanaud and Eichmann 2011). Ezekre a sejtekre jellemző, hogy nagyszámú fagolizoszóma található a citoplazmájukban, és többnyire az aorta körül, a fej valamint a végtagbimbó mesenchymájában fordulnak elő (8. ábra I-M; 9. ábra F-L). Ezzel szemben a legtöbb CD45+ sejt nyúlványos alakú és nem fejezi ki a klasszikus makrofág markereket. Az

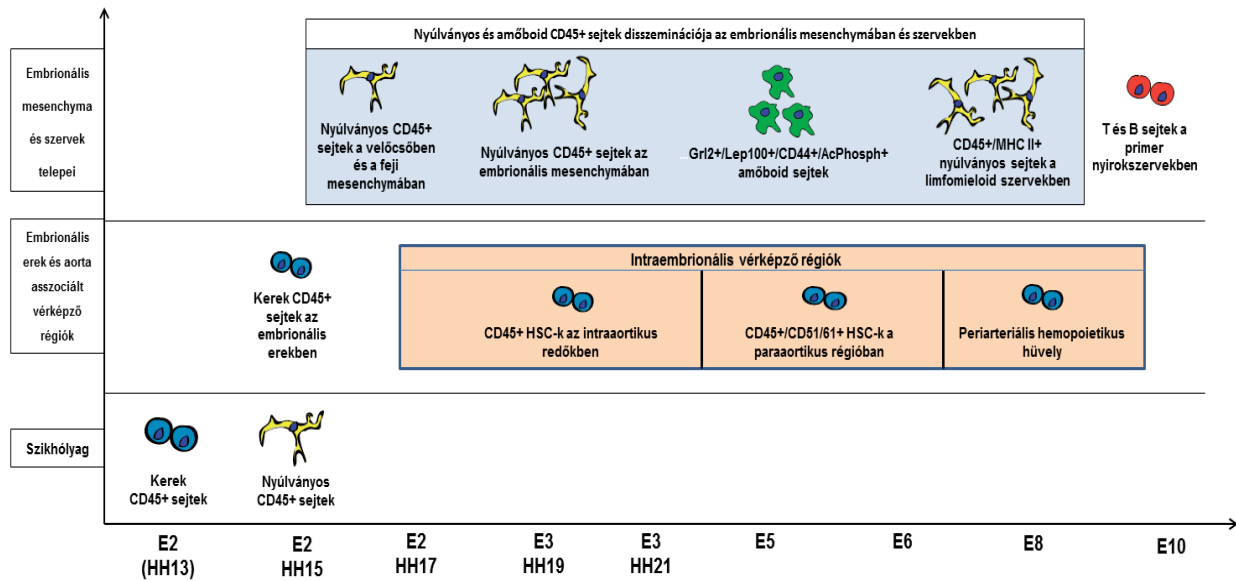


MHCII expressziója és makrofág-specifikus antigének (Lep100, Grl2, savas foszfatáz) hiánya alapján feltételezzük, hogy a nyúlványos CD45+ sejtpopuláció eltér a többi, HSC-ből differenciálódó sejtcsoporttól.

Emlős embriókban hasonló MHCII+ nyúlványos sejteket a korai stádiumokban nem figyeltek meg. Humán embrióban a CD45 immunpozitív sejtek először a 4 hetes embrió szikhólyagjában jelennek meg (*Tavian et al, 2010; Manaia et al, 2000; Tavian et al, 2010; Yamasaki et al 2011; Sinka et al, 2012*), amit egy héttel később az embrionális megjelenés követ. A CD45 expressziója két különböző morfológiájú sejtre jellemző: az erek lumenében kerek CD45+ sejtek, az intraembrionális mesenchymában polimorf CD34-CD45+ sejtek fordulnak elő. *In vivo* sejtvonal-követéses vizsgálatok egérben azt mutatták, hogy szikhólyag eredetű, amóboid Kit<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup> mieloid progenitorok az embrionális szerveket kolonizálják és szöveti makrofágokká (Kupffer sejtek, alveoláris makrofágok), granulocitákká, mikrogliaivá, illetve epidermális dendritikus sejtekké (Langerhans sejtek) differenciálódnak (*Yokomizo et al, 2007; Perdiguero et al, 2015; Hoeffel et al, 2015; Ginhoux and Guiliams 2016; Stremmel et al, 2018*).

Az intraembrionális vérképzés két kiemelt hemopoietikus területen zajlik: 3-4 napos embrióban az intraaortikus redőkben, amit a fejlődés 6-8. napján a paraaortikus régió követ (*Jaffredo et al, 2000*). HH17-19 stádiumban (50-72 óra) intraembrionálisan kerek CD45+ sejtek az aorta-endotél sejtekhez asszociáltan az ér lumenébe bedomborodva jelennek meg (*Jaffredo et al, 1998; Jaffredo et al, 2000*) (8. ábra E-F). Két nappal később ventrális irányba vándorolva a dorzális mesogastrium mesenchymális területén létrehozzák a paraaortikus (PAS) régiót (9. ábra A). Bár a kezdeti csirke-fürj kiméra kísérletek felvetették, hogy a primer nyirokszerveket a PAS régióból származó sejtek népesítik be (*Dieterlen-Liévre 1975*), kísérletes módszerekkel eddig ezt még nem sikerült igazolni. A PAS régióból izolált CD45+ sejtek génextpressziós analízise, a HSC mieloid és limfoid irányba történő elköteleződését mutatta (*Saynajakangas et al, 2009*). Továbbá, *in vitro* vizsgálatok azt igazolták, hogy aorta-asszociált HSC tenyészetek képesek eritroid és mieloid irányba is differenciálódni (*Cormier and Dieterlen-Liévre 1998; Cormier 1993*). Mindezek alapján elképzelhető, hogy az aorta-asszociált területeken megindul a limfomieloid differenciálódás, de az itt

található HSC-k *in vivo* immunfenotipizálása eddig nem történt meg. Munkánk során, többszörös immunfluoreszcens festésekkel kimutattuk, hogy a legtöbb CD45+ sejt a PAS régióban CD51/61+ trombocita prekuzorra differenciálódik, míg nyúlványos MHCII+ vagy amóbooid Lep100+ sejt csak alacsony számban, a régió perifériás részein fordul elő. A részletes immuncitokémiai karakterizálás arra is fényt derített, hogy B- és T-limfocitákat az 5-8 napos csirke embrió PAS régiójában még nem lehet kimutatni. Ez megfelel korábbi tanulmányok eredményeinek, melyek szerint a B- és T- prekuzorok csak a 10. embrionális napon jelennek meg a csirke embrióban (*Chen et al, 1984; Houssaint et al, 1987; Houssaint et al, 1991; Pharr et al, 1995; Katevuo et al, 1999; Nagy et al, 2004*). A HSC-eket a PAS régióban a fejlődés 8. napján után már nem lehet kimutatni (*Jaffredo et al, 1998*). Mivel a bursa Fabricii B-sejtes kolonizációja a 10. embrionális napon kezdődik (*Houssaint et al, 1987; Masteller et al, 1995; Nagy et al, 2016*), hasonlóképpen a lépben és a csontvelőben is a 10. embrionális nap után jelennek meg az első felszíni IgM-et és chB6 molekulát kifejező B-sejtek, felvetődik annak a lehetősége, hogy a 8. nap után más területeken folytatódik az intraembrionális vérképzés. Érdekes módon a paraaortikus régió karakterizálása során nagyszámú kerek morfológiájú CD45+ sejtől álló területet azonosítottunk, ami a hasüreg mezentériumában, a truncus coeliacus-t gyűrűszerűen veszi körül (9. ábra G-J). A képletet „periarteriális hemopoietikus hüvelynek” neveztük el, és feltételezzük, hogy ide vándorolnak a HSC-k a PAS régió leépülése után, ahonnan az itt megjelenő első chB6+ B-sejt prekuzorok később feltehetőleg a lépbe és a bursa Fabricii-t kolonizálják (20. ábra).



20. ábra. CD45+ sejtek megjelenése és differenciálódása a korai csirke embrióban. A vízszintes tengely az embrionális kort mutatja, a függőleges tengely a lokalizációt.

## **5.2 Szikhólyagi eredetű CD45+ sejtek népesítik be az embrionális szöveteket és makrofágokká, valamint a bursa Fabriciában dendritikus sejtekké differenciálódnak**

Dieterlen-Liévre és munkatársai kísérleteikben fűrj embriókat transzplantáltak embrió-irtott csirke szikhólyagokra (*Dieterlen-Liévre 1975; Dieterlen-Liévre and Martin 1981*) és arra a következtetésre jutottak, hogy a csirke eredetű extraembrionális sejtek nem vesznek részt a definitív vérképzésben, nem járulnak hozzá a limfomioid szervek benépesítéséhez. Ezzel ellentétben más kutatási eredmények arra utaltak, hogy az embrionális lép HSC populációjának mintegy 25%-a szikhólyagi eredetű (*Martin et al, 1978*). Továbbá csirke-fűrj szikhólyag kimérákkal végzett kísérletek szerint a szikhólyagi őssejtek primitív eritrocitákká, trombocitákká, Lep100+ és AcPhosph+ szöveti makrofágokká, mikroglivá és keringő endotélsejtekké képesek differenciálódni (*Cuadros et al, 1992; LaRue et al, 2003; Pardanaud and Eichmann 2011*). Ezek a sorstérképezésen alapuló, madár modellen végzett experimentális kutatások is megerősítik a tényt, hogy csirke embrióban, az emlőshöz hasonlóan a szikhólyag vérszigetei többféle hemopoietikus sejtvonalat képesek létrehozni.

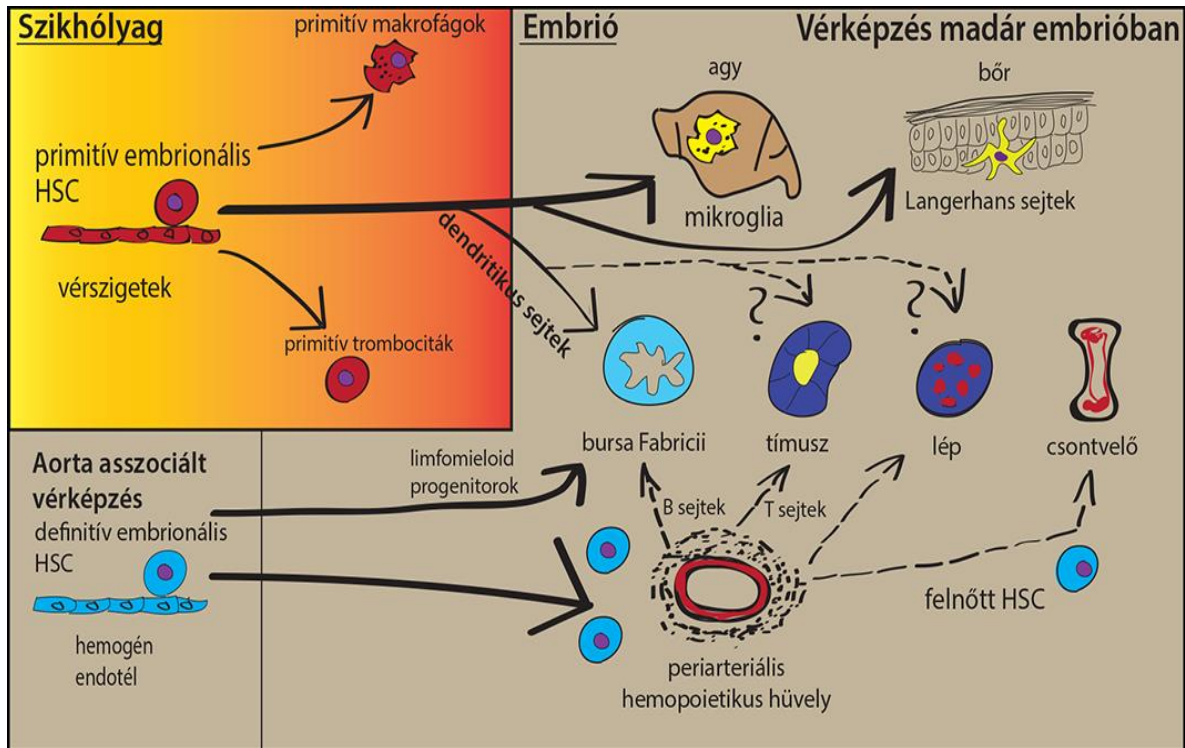
Kutatásaink során GFP-t kifejező transzgenikus csirke embrió szikhólyagjára transzplantáltunk normál csirke embriót. A csirke-csirke kiméra előnye, hogy nem kell két különböző madárfaj fejlődését összehangolni, valamint a GFP expressziója intenzíven jelöli a sejteket, ami a kiméraszövetekben megkönnyíti a sejtek elkülönítését és immuncitokémiai karakterizálását. A fejlődés 5. napján az intraembrionális CD45+ sejtek nagy része GFP pozitivitást mutatott, ami igazolta szikhólyagi eredetüket. A GFP+ sejtek többsége nyúlványos morfológiát mutatott és MHCII-t expresszál. Az amöboid jellegű GFP+CD45+ makrofágok szintén előfordultak, hasonlóan a korábbi csirke-fürj kimérákkal kapott eredményekhez (*Cuadros et al, 1992*). A kerek CD45+ sejtek az erek lumenében és az aorta-asszociált mesenchymában nem mutattak GFP expressziót, ami megfelel a korábban leírt intraembrionális eredetnek (*Diéterlen-Liévre and Martin 1981; Jaffredo et al, 1998*). Összefoglalva, kísérletesen igazoltuk, hogy a fejlődés korai stádiumaiban, a szikhólyag jelentős forrása az embrionális amöboid és nyúlványos CD45+ sejteknek.

A nyúlványos GFP+CD45+ sejtek végső sorsa ismeretlen. Embrionális kolonizációjuk után felvehetik az amöboid morfológiát, savas foszfatázt és lizoszóma markereket (Lamp1 antigén) expresszáló fagocita sejtekké differenciálódhatnak. Erre utalhat az a tény, hogy a nyúlványos sejtalak némivel hamarabb jelenik meg az amöboidnál, és az organogenezis végére (10. nap) kisebb számban van már jelen az utóbbinál. Egy másik lehetőség, hogy megőrzik nyúlványos alakjukat, MHC-II molekulát fejeznek ki és az embrionális szerveket kolonizálják, ahol többek között mikroglíává, vagy epidermális Langerhans sejtekké differenciálódnak. Egy skóciai munkacsoport nemrégiben olyan transzgenikus csirkéket állított elő, melyekben minden CSF1R (colony stimulating factor-1 receptor) expresszáló makrofág zöld fluoreszcenciát mutat (MacGreen chicken). Az első CSF1R+ sejteket a HH13 stádiumú embrió szikhólyagjában írták le és primitív makrofágoknak nevezték el (*Balic et al, 2014*). Pontos immunfenotípusa ezeknek a korai szikhólyagi makrofágoknak ismeretlen, de *in vitro* kimutatták, hogy CSF1 hatására KUL01+ fagocita sejtekké differenciálódnak (*Garceau et al, 2015*). Az embrionális fejlődés későbbi stádiumaiban a CSF1R+ sejtekben fagolizozómák jelennek meg és nagy számban fordulnak elő apoptotikus területeken (pl.: interdigitális régiók). A CSF1R expressziója megjelenik az MHCII+74.3+ antigén prezentáló sejteken, például a lép ellipszoidjai területén, limfoid

follikuláris dendritikus sejteken (FDC) és a bursa Fabricii dendritikus sejtjein (BSDC) is (Balic et al, 2014; Garceau et al, 2015; Nagy et al, 2016; Olah and Nagy 2013). A csirke dendritikus sejtek progenitorjait CD45+ HSC-ként azonosították, de nem ismert, hogy honnan származnak a dendritikus prekursorok (Nagy et al, 2004; Nagy et al, 2005; Igyártó et al, 2006).

A dendritikus sejtek kulcsszerepet töltenek be az antigén prezentációban és nyirokszerv-specifikusan többféle altípusuk létezik. Először Steinman és Cohn írta le a nyúlványos dendritikus sejteket (Steinman and Cohn, 1973; Oláh et al, 1979), de a veleszületett immunitásban betöltött szerepükre és MHC-II expressziójukra csak később derült fény (Banchereau and Steinman, 1998). Eddigi tudásunk szerint a dendritikus sejtek a mononukleáris sejtvonaltól csontvelői progenitorjaiból fejlődnek ki, és a legtöbb szöveti makrofághoz hasonlóan a vérben keringő, érpályát elhagyó monocitákból származnak (Steinman 2012; Merad et al, 2013). Amíg a tímusz dendritikus sejtjei (TDC) a centrális toleranciában és a T-sejt érésben játszanak szerepet, addig a lép vagy a nyirokcsomók FDC-i a B-dependens területek csíracentrumaiban, a B-sejtek szelektív folyamataiban vesznek részt. A madarakban a csontvelő helyett a bursa Fabricii a B-limfociták primer nyirokszerve, ahol bursa szekréción dendritikus sejtek (BSDC-k) találhatóak a limfoid folliculusokban (Olah and Glick, 1987; Olah and Nagy, 2013). A dendritikus sejtek madárban a vimentin intermedier filamentumot (Olah et al, 1992; Nagy et al, 2004; Nagy and Oláh, 2007), MHCII, CSF1R és a 74.3 sejt felszíni markert expresszálják. Mivel a hasonló morfológiai jegyekkel bíró makrofágok is kifejezik az MHC-II antigént, nem mindig könnyű elkülöníteni a különböző limfoid szervekben a két sejtípust, és a sejtek ontogenezise is csak részben ismert. Ahogy a madár BSDC-k, az emlős bőr Langerhans sejtjei is epiteliális környezetben fejlődnek, ahol prekursoraik korán megjelennek, nyugvó állapotban rezisztensek maradnak a sejtdepleción és irradiáción kezelésekre. Ezen hasonlóságaik alapján azt feltételezzük, hogy a CD45+CSF1R+MHCII+74.3+ BSDC-k a CD45+ szikhólyagi hemopoetikus progenitorokból származnak. GFP+ szikhólyag fragmentumok normál bursa Fabricii-vel történő kombinálása után, nyúlványos GFP+ sejtek kolonizálták a limfoid folliculusokat és 74.3+ BSDC-ké differenciálódtak. Ezzel elsőként bizonyítottuk kísérletes úton, hogy szikhólyag eredetű vértképző sejtek dendritikus sejtekké képesek differenciálódni a primer nyirokiszervekben. Összefoglalva, a csirke

szik hólyag kimérával kapott eredmények alapján az eritrocitákon, trombocitákon és makrofágokon kívül a dendritikus sejtek egy populációja is extraembrionális eredetű prekursorokból származik (21. ábra).



**21. ábra Vérképzés „madár szemmel”.** A szikhólyag-eredetű CD45<sup>+</sup> HSC a primitív embrionális trombocitákon és makrofágokon kívül, a posztnatálisan is fennmaradó mikroglia és Langerhans sejteket hozza létre. Az intraembrionális mesenchymát benépesítő nyúlványos CD45<sup>+</sup> sejtpopuláció egy része a bursa Fabricii-t kolonizálja és dendritikus sejtekké differenciálódik. Az aorta-asszociált vérképző helyek (aorta, PAS) és a periaarteriális hemopoietikus hüvely HSC-t képeznek, amelyek a primer nyirokszerveket és a csontvelőt kolonizálják.

### **5. 3. CD45<sup>+</sup> hemopoietikus sejtek az embrionális és felnőtt bélidegrendszer ganglionjaiban**

Az embrionális bursa Fabricii analízise során megfigyeltük, hogy a fejlődő kloaka és a vastagbél mesenchymális alapszövetét is nyúlványos CD45<sup>+</sup> sejtek kolonizálják. Ezen felül, a nyúlványos sejtek a bélidegrendszer ganglionjaiban, valamint a vastagbélhez-asszociált Remak-féle ganglionban is rendszeresen előfordultak. Ez a megfigyelés felvetette annak a lehetőségét, hogy a felnőtt csirke enterális

ganglionokban a ganglionléc eredetű neuronok és gliasejteken kívül egy harmadik sejtpopuláció is létezik. Ezek a hemopoietikus eredetű nyúlványos sejtek az enterális neuronokat és gliát körbefonva, a ganglionokat környezetüktől elhatároló bazális membránon belül helyezkednek el, és mikroglia/makrofág specifikus sejt felszíni markereket expresszálnak. Ezután a felnőtt madárban tett megfigyeléseinket egér bélidegrendszerre is kiterjesztettük. Hasonlóan a csirkéhez CD45+, illetve CD11b+, CX3CR1+ immunreaktív sejtek előfordulnak az intraganglionáris térben. A perifériás idegrendszer más részein, mint a spinális ganglionokban, vagy az idegrostok között korábban is írtak már le savas foszfátot, F4/80, CD68, CD11b, vagy Iba-1 sejt felszíni markereket kifejező makrofág-szerű sejteket (*Stiller et al, 1978; Oldfors 1980; Mueller et al, 2001*). Az enterális idegrendszer (ENS) ganglionjai viszont abban eltérnek a többi perifériás idegrendszeri dúctól, hogy nem vaszkularizáltak, így vörsejtek nem léphetnek ki közvetlenül az érpályából. Részletes immuncitokémiai vizsgálattal kimutattuk, hogy az intraganglionáris makrofágok csirkében CD45/MHCII/CSF1R/chB6 pozitívak (17. ábra), egérben pedig CX3CR1, CD45, F4/80, CD11b, és MHCII (*Muller et al, 2014; Kulkarni et al, 2017*) (19. ábra) markereket fejeznek ki. Korábbi elektronmikroszkópos munkák ugyan emlősökben is felvetik egy extraganglionáris eredetű nyúlványos sejt létezését a bélcsatorna ganglionjaiban, de eddig még azonosításuk és karakterizálásuk nem történt meg (*Kumoro et al, 1982*). Patkány ENS-ben is kimutatták, hogy MHC-II molekulát és makrofág markereket (pl. CD163) expresszáló sejtek vannak az enterális ganglionokkal szoros közelségben (*Philips and Powley, 2012*). Feltételezik, hogy az enterális neuronok és makrofágok között fennáll egy neuroimmunológia kapcsolat, melynek fontos szerepe lehet a gasztrointesztinális traktus motilitásának szabályozásában (*Muller et al, 2014*). A bélfal muscularis externa rétegének CD11b+CX3CR1+CSF1R+ makrofág populációja (muszkuláris makrofágok, MM) fontos szerepet játszik a mucosa asszociált limfatikus szövet (MALT) és az ENS közti immunológiai kommunikációban (*Muller et al, 2014; Gabanyi et al, 2016*). Feltételezik továbbá, hogy a ganglionok közelségében előforduló MHC-II+ makrofágok az apoptotizáló ganglionsejteket fagocitálják (*Kulkarni et al, 2017*). Ez a tulajdonságuk emlékeztet a mikrogliaé az ún. „scavenger” funkciójára. Génexpressziós vizsgálatok alapján a központi idegrendszer mikrogliajához legközelebb az intesztinális makrofágok állnak (*Gautiar et al, 2012; Butovsky et al, 2014*). Ilyen, specifikusan a két

sejtpopuláció expressziós profiljához tartozó gének: a Hnmt, Mtus1, C3a1A, Dagla, Wrb, Fkbp9 vagy a Gab1 (*Gautiar et al, 2012*). A fraktalkin receptor (CX3CR1) azon kevés molekuláris marker közé tartozik, amelyek egyedülállóan jellemzőek az intesztinális makrofágokra és a mikrogliaira, más szöveti makrofágok azonban nem expresszálják (*Bain and Mowat, 2014*). CSF1R ellenes antitest intraperitoneális vagy intratekális alkalmazásával, szelektív muszkuláris makrofág, illetve mikroglia depléció érhető el a bélben, valamint a központi idegrendszer területén. A bélfal területén, a muszkuláris rétegben előforduló makrofágok érzékenyebbek az ilyen farmakológiai sejt-depléziós kezelésekre (akárcsak a mikroglia), mint a mucosa-asszociált fagocitikus sejtek. Míg az előbbiek az anti-inflammatorikus M2 makrofág populáció tagjai, az utóbbiak proinflammatorikus M1 makrofágok (*Gabanyi et al, 2016*). Feltételezik, hogy embrionálisan az intesztinális makrofágok is szikhólyagi EMP-kből differenciálódnak emlősben, azonban születés után, mikrobiális változások hatására lecserélődnek a vérben keringő, csontvelői monocitákra (*Bain et al, 2013; Bain and Mowat, 2014*).

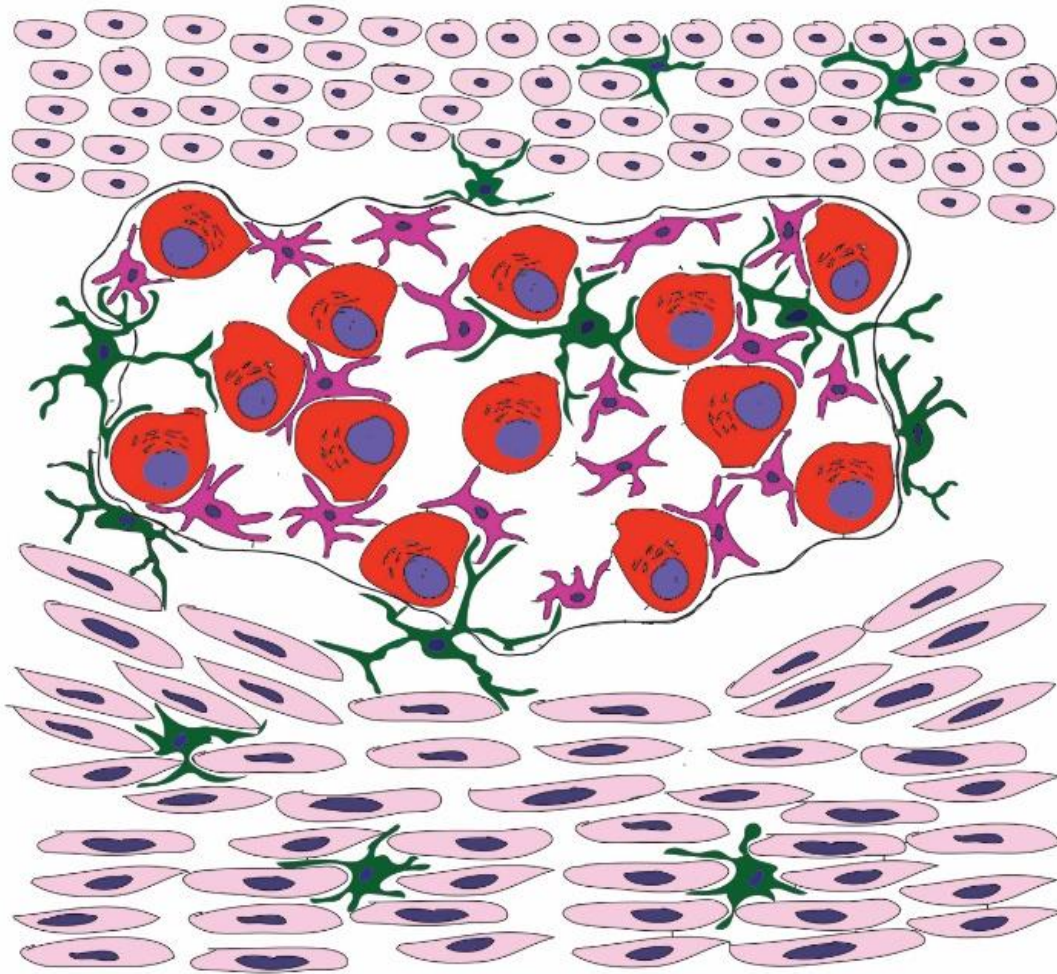
A központi- és a perifériás idegrendszert, beleértve az ENS-t is, neuroektodermából származó neuronok és gliasejtek alkotják. Az ENS-t azonban az embriogenezis során az aktívan migráló ganglionléc sejtek hozzák létre (*Goldstein et al, 2013*), melyek az embrionális bélfalba jutva neuronokká és gliasejteké differenciálódnak (*Nagy and Goldstein, 2017*). A központi idegrendszerben a harmadik alkotóelem a mikroglia, melyet először del Rio-Hortega írt le (*del Rio-Hortega, 1937*), mint egy rendkívül nyúlványos sejtípust. Először madár embriókban mutatták ki, hogy szikhólyagból származó hemopoiitikus progenitor sejtek kolonizálják az agyhólyagokat, megelőzve az intraembrionális, definitív hemopoiitikus őssejteket (*Cuadros et al, 1992; Alliot et al, 1999*) és CD45+CSF1R+ mikroglia sejteket képeznek (*Cuadros et al, 2006; Garceau et al, 2015*). A mikroglia sejtek extraembrionális eredetének sorstérképezése emlős embriókban is igazolta, hogy azok a szikhólyag C-Myb független eritromieloid progenitorjaiból származnak (*Gomez Perdiguero et al, 2014; Hoeffel et al, 2015*) (2. ábra). A mikroglia sejtek a normál agyban és gerincvelőben nyugvó állapotban vannak, de a központi idegrendszer gyulladással megbetegedéseiben aktiválódnak és immunológiai végrehajtó sejtekké alakulnak. Számos funkciójukat írták már le a fejlődő (*Squarzone et al, 2014; Frost and Schafer, 2016*) és az egészséges központi idegrendszerben, mint például a tanulás-függő



szinapszis formáció (*Parkhurst et al, 2013*), vagy a szinapszisok eliminációja (synaptic pruning) (*Ji et al, 2013*). A CX3CR1 antigén az egér (19.ábra), a chB6 a csirke mikroglia sejtvonal specifikus markere (18. ábra). A CSF1R-t mindkét faj mikroglia sejtjei expresszálják (18. ábra), (*Elmore et al, 2014; Luo et al, 2017*). Fontos kiemelni, hogy a csirkében klasszikus szöveti makrofág markereket, mint a 74.2, vagy a KUL01, sem a mikroglia sem, pedig az intraganglionáris makrofág populáció nem fejez ki az, míg a többi intesztinális makrofág expresszálja ezeket a molekulákat (22. ábra).

Habár a funkcionális és molekuláris interakciók a myenterikus makrofágok és az enterális ganglionléc sejtek között jól ismertek az emlős bélben, a két sejtípus közti kapcsolat morfológiai szempontból mégsem teljesen feltérképezett. Kutatásunk során azt a kérdést tettük fel, hogy a muskuláris makrofágoknak az enterális ganglionokhoz asszociált populációja, sejtfelszíni marker expressziójuk és morfológiájuk alapján megfeleltethető-e mikroglíanak a madár és az emlős bélidegrendszerében?

Összefoglalva, eredményeink azt mutatják, hogy a muskuláris makrofágokkal mutatott morfológiai hasonlóság mellett az intraganglionáris makrofágok mikroglíára emlékeztető sejtfelszíni molekulákat expresszálnak. Arra a kérdésre viszont, hogy vajon mikroglíához hasonló funkciót is töltenek-e be az enterális idegrendszerben még nem tudunk választ adni. Bár a CD45+MHCII+ hemopoietikus eredetű sejtek embrionális korban megjelennek a bélfal ganglionjaiban, az őket a többi intesztinális makrofágtól megkülönböztető chB6 expressziójuk csak a madarak immunológiai érését követően, a kikelés utáni 3-4. hét tájékán jelenik meg. A bélben zajló neuroimmunológiai interakciók részletesebb feltérképezéséhez, elengedhetetlen lesz a jövőben az intraganglionáris makrofágok funkciójának pontos megismerése fiziológiás és patológiás állapotokban egyaránt.



**22. ábra. Intraganglionáris makrofágok az egér és csirke bélidegrendszerben.** A bél lamina muscularis externa körkörös és longitudinális rétegének simaizomszövetjei (rózsaszín) között a plexus myentericus található. A neuronok (piros), enterális glia (magenta) között, és a gangliont körülvevő bazális membránon (fekete) belül, az intra-, illetve periganglionáris területen makrofágok (zöld) találhatóak. Csirkében mind az intra- mind az extraganglionáris makrofágok CD45, MHCII, és CSF1R pozitívak, míg a chB6 sejtfelszíni molekulát csak az intraganglionáris sejtek expresszálják, a 74.2 és KUL-01 szöveti makrofág markereket csak az extraganglionáris sejtek fejezik ki.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Kimutattuk, hogy extraembrionálisan kétféle CD45+ sejt differenciálódik. A kerek morfológiájú CD45+ sejtek a vérszigetek lumenében, a nyúlványos sejtek az extraembrionális mesenchymában jelennek meg. Későbbiekben a kerek sejtek az aorta, és annak zsigeri ágai körül lokalizálódnak, a nyúlványos morfológiájú sejtek elsősorban az embrionális mesenchymában találhatók.

2. Az irodalomban ismert intraaortikus redőkön és paraaortikus régiókn kívül, egy eddig ismeretlen vérképző területet azonosítottunk a hasi aorta páratlan zsigeri ágai körül, melyet „periarteriális hemopoietikus hüvelynek” neveztünk el. B-sejt specifikus immunfestések alapján feltételezzük, hogy ezen a helyen veszi kezdetét a csirke B-sejt prekurzorok differenciálódása.

3. Új embriomanipulációs módszert dolgoztunk ki a szikhólyag tenyésztésére. Parabiózis, *in ovo* szikhólyag tenyésztés és szikhólyag kiméra technikák immuncitokémiai analízissel történő kombinálásával igazoltuk, hogy a CD45+ nyúlványos sejtek prekurzorai a szikhólyagban keletkeznek és az embrióba vándorolva kolonizálják a szervezdeményeket, ahol MHCII-t expresszáló dendritikus vagy „stellate” sejtekké differenciálódnak.

4. Embriionális bursa Fabricii - szikhólyag rekombinációval és chorioallantois membrán tenyésztéssel bemutattuk, hogy a bursai dendritikus sejtek (BSDC-k) a szikhólyagból származnak.

5. Csirke embriókkal végzett embriomanipulációs kísérletekkel igazoltuk, hogy véreredetű CD45+ sejtek a fejlődő enterális ganglionokat is kolonizálják, amelyek letelepedésük után nyúlványos sejtekké differenciálódnak és a központi idegrendszeri mikrogliahoz hasonló molekulákat expresszálnak.

6. Kimutattuk, hogy az intraganglionáris és ganglionon kívüli nyúlványos sejtek immunfenotípusa eltér egymástól. A CD45, MHC-II, és CSF1R sejtfelszíni molekulák mindkét sejttípuson előfordulnak, míg a B-sejtekre és mikrogliaira specifikus chB6 molekula expressziója csak az intraganglionáris sejtekre jellemző. Ezzel szemben a 74.2 és a KUL-01 monocita eredetű szöveti makrofág markereket csak az extra-ganglionáris sejtek fejezik ki.

## ÖSSZEFOGLALÓ

Általánosan elfogadott a szikhólyagi őssejtek primitív eritropoiezisben betöltött szerepe, de a legújabb adatok szerint a definitív vérképzésében is részt vesznek. Munkánk során csirke embriók hemopoietikus sejtjeinek differenciálódását morfológiai és embriómanipulációs módszerekkel tanulmányoztuk. Először igazoltuk, hogy a korai embrióban három különböző morfológiájú CD45+ hemopoietikus sejt képződik. Az első CD45+ sejtek kerek és nyúlványos alakúak és a szikhólyag vérszigeteiben tűntek fel. Később az intraembrionális mesenchymában és a craniális neuroepitéliumban elszórta számos nyúlványos, MHCII-t expresszáló sejt, valamint kisszámú, amőboid morfológiájú CD45+ sejt jelent meg. Az embriómanipulációs kísérletek célja az volt, hogy kiderítsük, milyen fejlődésbiológiai kapcsolat van a szikhólyag és az intraembrionális CD45+ sejtpopulációk között és, hogy származhatnak-e az intraembrionális nyúlványos sejtek a szikhólyagban előforduló CD45+ őssejtektől? Eredményeink alapján azt feltételeztük, hogy a kerek és a nyúlványos CD45+ sejtek szétválása még a vaszkularizáció előtt megtörténik, amire szikhólyag vérszigetek tenyésztésével és GFP transzgenikus embriók szikhólyag transzplantációjával próbáltunk választ adni. Az *in ovo* szikhólyag tenyészetekben nagyszámú nyúlványos CD45+ sejt differenciálódott. GFP szikhólyag kimérákkal igazoltuk, hogy az extraembrionálisan képződő nyúlványos CD45+ sejtek valamennyi embrionális szervezdeményt kolonizálnak. GFP-szikhólyag és bursa Fabricii rekombinációja esetén a GFP+ sejtekből dendritikus sejtek differenciálódtak. Immuncitokémiai vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a csirke bélidegrendszerének (ENS) ganglionjaiban egy CD45+ nyúlványos sejtpopuláció is előfordul. Az egér ENS ganglionjaiban is találtunk nyúlványos CD45+CX3CR1+CD11b+ sejteket. Jelenleg ilyen sejtípust az enterális ganglionokban nem ismer a szakirodalom. Az immuncitokémiai karakterizálás során kiderült, hogy az intraganglionáris, nyúlványos CD45+ sejtek CSF1R, chB6 és MHC-II antigént is expresszálnak, de makrofág és glia markereket nem. A chB6 antigén a madarak B-limfocitáira és a központi idegrendszeri (CNS) mikroglia sejtekre specifikus sejtfelszíni molekula. A CD45+CSF1R+chB6+MHCII sejtek eredetét chorioallantois membrán (CAM) kiméra módszerrel tanulmányoztuk, mely azt mutatta, hogy CD45+ véreredetű sejtek kolonizálják a fejlődő enterális ganglionokat. Feltételezzük, hogy ezek a keringésből bevándorolt nyúlványos sejtek megfelelnek a CNS-re jellemző mikroglia sejteknek.

## SUMMARY

Embryonic tissues contain highly ramified stellate-shaped cells expressing CD45 and MHCII antigens but their origin and immunophenotype are unknown. Using staged avian embryos and cell-type-specific antibodies, we establish a detailed spatiotemporal ontogeny of cells that express CD45, the earliest marker of hematopoietic stem cells in the chick. CD45 immunostaining marks three distinct embryonic cell populations: round, ramified and amoeboid cells. The round and ramified CD45<sup>+</sup> cells appear first in yolk-sac blood islands before the onset of circulation. Amoeboid cells express macrophage-specific antigens and frequently occur in regions of apoptosis. Ramified cells are distributed uniformly in the embryonic mesenchyme, colonize lymphoid and non-lymphoid organs and later express MHC II. To study the origin of CD45<sup>+</sup> cells, 2-day-old chick embryos were ablated from the yolk sac before the establishment of circulation and incubated for 2–5 days. Large numbers of CD45<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> ramified cells differentiated in the yolk sac. Yolk-sac chimeras were generated by grafting embryos into GFP-expressing de-embryonated yolk sacs. GFP/CD45 co-expressing ramified and amoeboid cells colonized all organ primordia in the donor embryo. We also recombined GFP<sup>+</sup> yolk sac with the bursa of Fabricius and found ramified GFP<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells in the bursa where they differentiated into dendritic cells. Thus, CD45 cells are first present in the yolk sac during primitive hematopoiesis and then migrate from the extra-embryonic yolk sac to give rise to cells throughout all organ primordia, including dendritic cells in the bursa of Fabricius. Immunofluorescent staining of embryonic chick hindgut shows the presence of CD45<sup>+</sup> cells in the gut mesenchyme, and within the ganglia of the enteric nervous system (ENS). This observation suggested the presence of a population of hematopoietic-derived cells within the enteric ganglia, which are thought to contain only neural crest-derived neurons and glia. These intraganglionic CD45<sup>+</sup> macrophages are highly ramified and also express the colony stimulating factor-1 receptor (CSF1R), MHC II antigen, and chB6, a marker specific for B cells and microglia in avians. The CD45<sup>+</sup>ChB6<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CSF1R<sup>+</sup> signature supports a hematopoietic origin and this was confirmed using intestinal chimeras in GFP-transgenic chick embryos. Based on the expression pattern and location of intraganglionic macrophages in avians and rodents, we conclude that they represent a novel non-neural crest-derived microglia-like cell population within the enteric ganglia.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

Abramson, S., 1977. The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *Journal of Experimental Medicine* 145, 1567–1579. doi:10.1084/jem.145.6.1567

Adamstone, F.B. (1948). Experiments on the development of the amnion in the chick. *J Morphol* 83: 359-371.

Alev, C., McIntyre, B.A.S., Nagai, H., Shin, M., Shinmyozu, K., Jakt, L.M., Sheng, G., 2008. BetaA, the major beta globin in definitive red blood cells, is present from the onset of primitive erythropoiesis in chicken. *Developmental Dynamics* 237, 1193–1197. doi:10.1002/dvdy.21510

Alison, M.R., Poulsom, R., Forbes, S.J., 2001. Update on hepatic stem cells. *Liver*. doi:10.1034/j.1600-0676.2001.210601.x

Alliot, F., Lecain, E., Grima, B., Pessac, B., 1991. Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 1541–1545. doi:10.1073/pnas.88.4.1541

Andre, C., Hampe, A., Lachaume, P., Martin, E., Wang, X.P., Manus, V., Hu, W.X., Galibert, F., 1997. Sequence analysis of two genomic regions containing the KIT and the FMS receptor tyrosine kinase genes. *Genomics* 39, 216–26. doi:10.1006/geno.1996.4482

Bain, C.C., Mowat, A.M.I., 2014. The monocyte-macrophage axis in the intestine. *Cellular Immunology* 291, 41–48. doi:10.1016/j.cellimm.2014.03.012

Bain, C.C., Scott, C.L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., Guillems, M., Malissen, B., Agace, W.W., Mowat, A.M.I., 2013. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6C<sup>hi</sup> monocyte precursors. *Mucosal Immunology* 6, 498–510. doi:10.1038/mi.2012.89

Balic, A., Garcia-Morales, C., Vervelde, L., Gilhooley, H., Sherman, A., Garceau, V., Gutowska, M.W., Burt, D.W., Kaiser, P., Hume, D.A., Sang, H.M., 2014. Visualisation of chicken macrophages using transgenic reporter genes: insights into the development of the avian macrophage lineage. *Development* 141, 3255–3265. doi:10.1242/dev.105593

Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252. doi:10.1038/32588

Beaupain, D., Martin, C., & Dieterlen-Lievre, F. (1979). Are developmental hemoglobin changes related to the origin of stem cells and site of erythropoiesis?. *Blood*, 53(2), 212-225. Accessed April 20, 2018.

Becker, A.J., McCulloch, E.A., Till, J.E., 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452–454. doi:10.1038/197452a0

Bellairs, R. (1953) ‘Studies on the Development of the Foregut in the Chick Blastoderm’, *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 1(2), p.

Bellairs, R., 1963. Differentiation of the Yolk Sac of the Chick Studied by Electron Microscopy. *Journal of embryology and experimental morphology* 11, 201–225.

Bertrand, J.Y., Jalil, A., Klaine, M., Jung, S., Cumano, A., Godin, I., 2005. Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* 106, 3004–3011. doi:10.1182/blood-2005-02-0461

Bhattacharya, R., Ovies, C., Williamson, D., Mitchell, S., Funk, P.E., 2017. SH3 dependent cell death signaling of the avian chB6 alloantigen. *Cellular Immunology* 322, 34–40. doi:10.1016/j.cellimm.2017.09.009

Bird, J.E., Daudet, N., Warchol, M.E., Gale, J.E., 2010. Supporting Cells Eliminate Dying Sensory Hair Cells to Maintain Epithelial Integrity in the Avian Inner Ear. *Journal of Neuroscience* 30, 12545–12556. doi:10.1523/JNEUROSCI.3042-10.2010

Bódi, I., Nagy, N., Sinka, L., Igyártó, B.-Z., Oláh, I., 2009. Novel monoclonal antibodies recognise guinea fowl thrombocytes. *Acta Veterinaria Hungarica* 57, 239–246. doi:10.1556/AVet.57.2009.2.5

Bollerot, K., Romero, S., Dunon, D., Jaffredo, T., 2005. Core binding factor in the early avian embryo: cloning of Cbfbeta and combinatorial expression patterns with Runx1. *Gene expression patterns : GEP* 6, 29–39. doi:10.1016/j.modgep.2005.05.003

Brand-Saberi, B., Christ, B., 1999. 1 Evolution and Development of Distinct Cell Lineages Derived from Somites. *Current Topics in Developmental Biology* 48, 1–42. doi:10.1016/S0070-2153(08)60753-X

Butovsky, O., Jedrychowski, M.P., Moore, C.S., Cialic, R., Lanser, A.J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P.M., Doykan, C.E., Fanek, Z., Liu, L., Chen, Z., Rothstein, J.D., Ransohoff, R.M., Gygi, S.P., Antel, J.P., Weiner, H.L., 2014. Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature Neuroscience* 17, 131–143. doi:10.1038/nn.3599

Caprioli, A., Jaffredo, T., Gautier, R., Dubourg, C., Dieterlen-Lièvre, F., 1998. Blood-borne seeding by hematopoietic and endothelial precursors from the allantois. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 1641–6. doi:10.1073/pnas.95.4.1641

Caprioli, A., Minko, K., Drevon, C., Eichmann, A., Dieterlen-Lièvre, F., Jaffredo, T., 2001. Hemangioblast commitment in the avian allantois: Cellular and molecular aspects. *Developmental Biology* 238, 64–78. doi:10.1006/dbio.2001.0362

Chen CH, Chanh TC, Cooper MD (1984) Chicken thymocyte-specific antigen identified by monoclonal antibodies: ontogeny, tissue distribution and biochemical characterization. *Eur J Immunol* 14:385–391

Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J.C., Keller, G., 1998. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125, 725–32. doi:10.1242/dev.00589



Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F., Shaper, J.H., 1984. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *Journal of immunology* 133, 157–165.

Civin, C.I., Strauss, L.C., Fackler, M.J., Trischmann, T.M., Wiley, J.M., Loken, M.R., 1990. Positive stem cell selection--basic science. *Prog Clin Biol Res* 333, 387–401; discussion 402.

Corbel, C., 2002. Expression of  $\alpha V\beta 3$  integrin in the chick embryo aortic endothelium. *International Journal of Developmental Biology* 46, 827–830.

Corbel, C., Lehmann, a, Davison, F., 2000. Expression of CD44 during early development of the chick embryo. *Mechanisms of development* 96, 111–4.

Corbel, C., Salaün, J., Belo-Diabangouaya, P., Dieterlen-Lièvre, F., 2007. Hematopoietic potential of the pre-fusion allantois. *Developmental Biology* 301, 478–488. doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.069

Corbel, C., Vaigot, P., Salaün, J., 2005.  $\alpha IIb$  integrin, a novel marker for hemopoietic progenitor cells. *International Journal of Developmental Biology* 49, 279–284. doi:10.1387/ijdb.041936cc

Cormier F (1993) Avian pluripotent haemopoietic progenitor cells: detection and enrichment from the para-aortic region of the early embryo. *J Cell Sci* 105:661–666

Cormier, F., Dieterlen-Lièvre, F., 1988. The wall of the chick embryo aorta harbours M-CFC, G-CFC, GM-CFC and BFU-E. *Development (Cambridge, England)* 102, 279–285.

Craig, W., Kay, R., Cutler, R.L., Lansdorp, P.M., 1993. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *The Journal of experimental medicine* 177, 1331–42. doi:10.1084/jem.177.5.1331

Cuadros, M. a, Coltey, P., Carmen Nieto, M., Martin, C., 1992. Demonstration of a phagocytic cell system belonging to the hemopoietic lineage and originating from the yolk sac in the early avian embryo. *Development (Cambridge, England)* 115, 157–168.

Cuadros, M.A., Santos, A.M., Martín-Oliva, D., Calvente, R., Tassi, M., Marín-Teva, J.L., Navascués, J., 2006. Specific immunolabeling of brain macrophages and microglial cells in the developing and mature chick central nervous system. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 54, 727–738. doi:10.1369/jhc.5A6832.2006

Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F., Godin, I., 1996. Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86, 907–916. doi:10.1016/S0092-8674(00)80166-X

Dantschakoff, V., 1907. Uber das erate auftreten der blutelemente in hühnerembryo. *Folia Haematol*, 4, pp.159–166.

Detrich, H.W., Kieran, M.W., Chan, F.Y., Barone, L.M., Yee, K., Rundstadler, J.A., Pratt, S., Ransom, D., Zon, L.I., 1995. Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10713–7. doi:10.1073/pnas.92.23.10713

Dieterlen-Liévre F. (1994). Hemopoiesis during avian ontogeny. *Poultry Science Rev.* 5:273-305

Dieterlen-Liévre F. (1997). Intraembryonic hemopoietic stem cells. *Hematol Oncol Clin North Am.* 11:1149-1171

Dieterlen-Lievre, F., 1975. On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J Embryol Exp Morphol* 33, 607–619.

Dieterlen-Lièvre, F., Martin, C., 1981. Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Developmental Biology* 88, 180–191. doi:10.1016/0012-1606(81)90228-1

Dohle, D.S., Pasa, S.D., Gustmann, S., Laub, M., Wissler, J.H., Jennissen, H.P., Dünker, N., 2009. Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay: how it really works. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2–7. doi:10.3791/1620

Dóra, D., Fejszák, N., Goldstein, A.M., Minkó, 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, 353–370. doi:10.1007/s00441-017-2595-y

Dubois, R. 1969. Le mécanisme d'entrée des cellules germinales primordiales dans le réseau vasculaire, chez l'embryon de Poulet. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 21, 255–270.

Edling, C.E., Hallberg, B., 2007. c-Kit-A hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. doi:10.1016/j.biocel.2006.12.005

Elmore, M.R.P., Najafi, A.R., Koike, M.A., Dagher, N.N., Spangenberg, E.E., Rice, R.A., Kitazawa, M., Matusow, B., Nguyen, H., West, B.L., Green, K.N., 2014. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* 82, 380–397. doi:10.1016/j.neuron.2014.02.040

Ford, C.E., Hamerton, J.L., Barnes, D.W.H., Loutit, J.F., 1956. Cytological identification of radiation-chimæras. *Nature* 177, 452–454. doi:10.1038/177452a0

Frame, J.M., McGrath, K.E., Palis, J., 2013. Erythro-myeloid progenitors: “Definitive” hematopoiesis in the conceptus prior to the emergence of hematopoietic stem cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. doi:10.1016/j.bcmed.2013.09.006

Frame, J.M., Fegan, K.H., Conway, S.J., McGrath, K.E., Palis, J., 2016. Definitive Hematopoiesis in the Yolk Sac Emerges from Wnt-Responsive Hemogenic Endothelium Independently of Circulation and Arterial Identity. *Stem Cells* 34, 431–444. doi:10.1002/stem.2213

Frost, J.L., Schafer, D.P., 2016. Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends in Cell Biology*. doi:10.1016/j.tcb.2016.02.006

Fu, R., Shen, Q., Xu, P., Luo, J.J., Tang, Y., 2014. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Molecular Neurobiology* 49, 1422–1434. doi:10.1007/s12035-013-8620-6

Funk, P.E. et al., 1997. The avian chB6 (Bu-1) alloantigen can mediate rapid cell death. *The Journal of Immunology*, 159(4), p.1695 LP-1702.

Furness, J.B., 2008. The enteric nervous system: Normal functions and enteric neuropathies. *Neurogastroenterology and Motility*. doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01094.x

Gabanyi, I., Muller, P.A., Feighery, L., Oliveira, T.Y., Costa-Pinto, F.A., Mucida, D., 2016. Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages. *Cell* 164, 378–391. doi:10.1016/j.cell.2015.12.023

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. doi:10.1186/s12915-015-0121-9

Garcia-Morales, C., Rothwell, L., Moffat, L., Garceau, V., Balic, A., Sang, H.M., Kaiser, P., Hume, D.A., 2014. Production and characterisation of a monoclonal antibody that recognises the chicken CSF1 receptor and confirms that expression is restricted to macrophage-lineage cells. *Developmental and Comparative Immunology* 42, 278–285. doi:10.1016/j.dci.2013.09.011

Gautiar, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., Mazloom, A.R., Ma'Ayan, A., Chua, W.J., Hansen, T.H., Turley, S.J., Merad, M., Randolph, G.J., Best, A.J., Knell, J., Goldrath, A., Brown, B., Jojic, V., Koller, D., Cohen, N., Brenner, M., Regev, A., Fletcher, A.,

Bellemare-Pelletier, A., Malhotra, D., Jianu, R., Laidlaw, D., Collins, J., Narayan, K., Sylvia, K., Kang, J., Gazit, R., Garrison, B.S., Rossi, D.J., Kim, F., Rao, T.N., Wagers, A., Shinton, S.A., Hardy, R.R., Monach, P., Bezman, N.A., Sun, J.C., Kim, C.C., Lanier, L.L., Heng, T., Kreslavsky, T., Painter, M., Ericson, J., Davis, S., Mathis, D., Benoist, C., 2012. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature Immunology* 13, 1118–1128. doi:10.1038/ni.2419

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., Merad, M., 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–845. doi:10.1126/science.1194637

Ginhoux, F., Williams, M., 2016. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.024

Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., Huber, T., 2013. Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7. doi:10.3389/fncel.2013.00045

Ginhoux, F., Merad, M., 2010. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunology and Cell Biology*. doi:10.1038/icb.2010.38

Glick, B., Chang, T.S., Jaap, R.G., 1956. The Bursa of Fabricius and Antibody Production. *Poultry Science* 35, 224–225. doi:10.3382/ps.0350224

Glick, B., 1994. The bursa of Fabricius: the evolution of a discovery. *Poultry science* 73, 979–983. doi:10.3382/ps.0730979

Godin, I., Cumano, A., 2005. Of birds and mice: hematopoietic stem cell development. *The International Journal of Developmental Biology* 49, 251–257. doi:10.1387/ijdb.041945ig

Godin, I.E., Garcia-Porrero, J.A., Coutinho, A., Dieterlen-Lièvre, F., Marcos, M.A.R., 1993. Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature* 364, 67–70. doi:10.1038/364067a0

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, 307–316.  
doi:10.1111/cge.12054

Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., De Bruijn, M.F., Geissmann, F., Rodewald, H.R., 2015. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547–551. doi:10.1038/nature13989

Gomori, G. (1941), The distribution of phosphatase in normal organs and tissues. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 17: 71-83. doi:[10.1002/jcp.1030170108](https://doi.org/10.1002/jcp.1030170108)

Grover, M. et al., 2011. Cellular changes in diabetic and idiopathic gastroparesis. *Gastroenterology*, 140(5), pp.1575–1585.

Guillemot FP, Oliver PD, Peault BM, Le Douarin NM (1984) Cells expressing Ia antigens in the avian thymus. *J Exp Med* 160:1803–1819

Gumati, M.K., Magyar, A., Nagy, N., Kurucz, É., Felföldi, B., Oláh, I., 2003. Extracellular matrix of different composition supports the various splenic compartments of guinea fowl (*Numida meleagris*). *Cell and Tissue Research* 312, 333–343. doi:10.1007/s00441-003-0736-y

Hala, K. et al., 1984. Functional Analysis of B-L (Ia-Like) Antigen-Bearing Chicken Peripheral Blood Cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 20(1), pp.15–19. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3083.1984.tb00972.x> [Accessed December 30, 2017].

Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics* 88, 49–92. doi:10.1002/aja.1001950404

Harvey W. *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus*. Frankfurt: Guillemo Fitzeri; 1628

Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S.W., Forsberg, E.C.,

Tanaka, M., van Rooijen, N., García-Sastre, A., Stanley, E.R., Ginhoux, F., Frenette, P.S., Merad, M., 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792–804. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.004

Hickey, W., Kimura, H., 1988. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239, 290–292. doi:10.1126/science.3276004

Hoeffel, G., Ginhoux, F., 2015. Ontogeny of tissue-resident macrophages. *Frontiers in Immunology*. doi:10.3389/fimmu.2015.00486

Houssaint E, Mansikka A, Vainio O (1991) Early separation of B and T lymphocyte precursors in chick embryo. *J Exp Med* 174:397–406

Houssaint, E., 1987. Cell lineage segregation during bursa of Fabricius ontogeny. *The Journal of Immunology*, 138(11), p.3626 LP-3634.

Huang, R., Zhi, Q., Patel, K., Wilting, J., Christ, B., 2000. Dual origin and segmental organisation of the avian scapula. *Development* 127, 3789–3794.

Huber, T.L., Kouskoff, V., Fehling, H.J., Palis, J., Keller, G., 2004. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* 432, 625–630. doi:10.1038/nature03122

Huret, J.L., Dessen, P., Bernheim, A., 2003. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, year 2003. *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/gkg126

Huss, D., Lansford, R., 2017. Fluorescent quail: A transgenic model system for the dynamic study of avian development, in: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 125–147. doi:10.1007/978-1-4939-7216-6\_8

Igyártó BZ, Lackó E, Oláh I, Magyar A (2006) Characterization of chicken epidermal dendritic cells. *Immunology* 119:278–288

Igyártó BZ, Nagy N, Magyar A, Oláh I (2008) Identification of the avian B-cell-specific Bu-1 alloantigen by a novel monoclonal antibody. *Poult Sci* 87:351–355

Imai, T., Hieshima, K., Haskell, C., Baba, M., Nagira, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Nomiya, H., Schall, T.J., Yoshie, O., 1997. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91, 521–530. doi:10.1016/S0092-8674(00)80438-9

Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A, Dieterlen-Lievre F (1998) Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* 125:4575–4583

Jaffredo, T., Gautier, R., Brajeul, V., Dieterlen-Lièvre, F., 2000. Tracing the progeny of the aortic hemangioblast in the avian embryo. *Developmental Biology* 224, 204–214. doi:10.1006/dbio.2000.9799

Jeurissen SH, Claassen E, Janse EM (1992) Histological and functional differentiation of non-lymphoid cells in the chicken spleen. *Immunology* 77:75–80

Ji, K., Akgul, G., Wollmuth, L.P., Tsirka, S.E., 2013. Microglia Actively Regulate the Number of Functional Synapses. *PLoS ONE* 8. doi:10.1371/journal.pone.0056293

Kaplan, D., Smith, D., 2000. Enzymatic amplification staining for flow cytometric analysis of cell surface molecules. *Cytometry Part A* 40, 81–85.

Katevuo K, Imhof BA, Boyd R, Chidgey A, Bean A, Dunon D, Gobel TW, Vainio O (1999) ChT1, an Ig superfamily molecule required for T cell differentiation. *J Immunol* 162:5685–5694

Kau, C.L., Turpen, J.B., 1983. Dual contribution of embryonic ventral blood island and dorsal lateral plate mesoderm during ontogeny of hemopoietic cells in *Xenopus laevis*. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 131, 2262–2266.

Keirstead, H.S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., Steward, O., 2005. Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cell Transplants Remyelinate and Restore Locomotion after Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience* 25, 4694–4705. doi:10.1523/JNEUROSCI.0311-05.2005



Knapp, W., Strobl, H., Scheinecker, C., Bello-Fernandez, C., Majdic, O., 1995. Molecular characterization of CD34+ human hematopoietic progenitor cells. *Annals of Hematology*. doi:10.1007/BF01696614

Komuro, T., Baluk, P., Burnstock, G., 1982. An ultrastructural study of nerve profiles in the myenteric plexus of the rabbit colon. *Neuroscience* 7, 295–305. doi:10.1016/0306-4522(82)90167-1

Körbling, M., Katz, R.L., Khanna, A., Ruifrok, A.C., Rondon, G., Albitar, M., Champlin, R.E., Estrov, Z., 2002. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *The New England journal of medicine* 346, 738–746. doi:10.1056/NEJMoa3461002

Kulkarni, S., Micci, M.-A., Leser, J., Shin, C., Tang, S.-C., Fu, Y.-Y., Liu, L., Li, Q., Saha, M., Li, C., Enikolopov, G., Becker, L., Rakhilin, N., Anderson, M., Shen, X., Dong, X., Butte, M.J., Song, H., Southard-Smith, E.M., Kapur, R.P., Bogunovic, M., Pasricha, P.J., 2017. Adult enteric nervous system in health is maintained by a dynamic balance between neuronal apoptosis and neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E3709–E3718. doi:10.1073/pnas.1619406114

Kurz H, Christ B (1998) Embryonic CNS macrophages and microglia do not stem from circulating, but from extravascular precursors. *Glia* 22:98–102

Kurz H, Korn J, Eggli PS, Huang R, Christ B (2001) Embryonic central nervous system angiogenesis does not involve blood-borne endothelial progenitors. *J Comp Neurol* 436:263–274

Lahiri,S.K., Keizer,H.J., and van Putten,L.M., The efficiency of the assay for haemopoietic colony forming cells, *Cell Tissue Kinet*, 3 (1970) 355-62.

Lampisuo, M., Liippo, J., Vainio, O., McNagny, K.M., Kulmala, J., Lassila, O., 1999. Characterization of prethymic progenitors within the chicken embryo. *International Immunology* 11, 63–69. doi:10.1093/intimm/11.1.63

Landsman, L., Liat, B.O., Zerneck, A., Kim, K.W., Krauthgamer, R., Shagdarsuren, E., Lira, S.A., Weissman, I.L., Weber, C., Jung, S., 2009. CX3CR1 is required for

monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* 113, 963–972. doi:10.1182/blood-2008-07-170787

LaRue, A.C., Lansford, R., Drake, C.J., 2003. Circulating blood island-derived cells contribute to vasculogenesis in the embryo proper. *Developmental Biology* 262, 162–172. doi:10.1016/S0012-1606(03)00358-0

Lassila, O., Eskola, J., Toivanen, P., Dieterlen-Lièvre, F., 1980. Lymphoid Stem Cells in the Intraembryonic Mesenchyme of the Chicken. *Scandinavian Journal of Immunology* 11, 445–448. doi:10.1111/j.1365-3083.1980.tb00011.x

Le Douarin, N.M., 1980. The ontogeny of the neural crest in avian embryo chimaeras. *Nature* 286, 663–669. doi:10.1038/286663a0

Le Douarin, N.M., 1984. Cell migrations in embryos. *Cell*. doi:10.1016/0092-8674(84)90490-2

Le Douarin, N.M., 1988. The Claude Bernard lecture, 1987. Embryonic chimeras: a tool for studying the development of the nervous and immune systems. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 235, 1–17.

Le Douarin, N.M., Teillet, M. a, 1973. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *Journal of embryology and experimental morphology* 30, 31–48.

Leeson, T.S. and Leeson, C.R. (1963). The Chorio-Allantois Of The Chick. Light And Electron Microscopic Observations At Various Times Of Incubation. *J Anat* 97: 585-595.

Lindvall, O., 2003. Stem cells for cell therapy in Parkinson's disease. *Pharmacological Research* 47, 279–287. doi:10.1016/S1043-6618(03)00037-9

Lippincott-Schwartz J, Fambrough DM (1986) Lysosomal membrane dynamics: structure and interorganellar movement of a major lysosomal membrane glycoprotein. *J Cell Biol* 102:1593–1605

Luo, C., Jian, C., Liao, Y., Huang, Q., Wu, Yuejuan, Liu, X., Zou, D., Wu, Yuan, 2017. The role of microglia in multiple sclerosis. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. doi:10.2147/NDT.S140634

Maéno, M., Tochikai, S., Katagiri, C., 1985. Differential participation of ventral and dorsolateral mesoderms in the hemopoiesis of *Xenopus*, as revealed in diploid-triploid or interspecific chimeras. *Developmental Biology* 110, 503–508. doi:10.1016/0012-1606(85)90108-3

Mallet, V.O., Mitchell, C., Mezey, E., Fabre, M., Guidotti, J.E., Renia, L., Coulombel, L., Kahn, A., Gilgenkrantz, H., 2002. Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. *Hepatology* 35, 799–804. doi:10.1053/jhep.2002.32530

Malpighi M. De formatione pulli in ovo. London: Royal Society: 1672

Maniaia A, Lemarchandel V, Klaine M, Max-Audit I, Romeo P, Dieterlen-Lievre F, Godin I (2000) Lmo2 and GATA-3 associated expression in intraembryonic hemogenic sites. *Development* 127:643–653

Masteller EL, Larsen RD, Carlson LM, Pickel JM, Nickoloff B, Lowe J, Thompson CB, Lee KP (1995) Chicken B cells undergo discrete developmental changes in surface carbohydrate structure that appear to play a role in directing lymphocyte migration during embryogenesis. *Development* 121:1657–1667

McGrath, K.E., Frame, J.M., Fegan, K.H., Bowen, J.R., Conway, S.J., Catherman, S.C., Kingsley, P.D., Koniski, A.D., Palis, J., 2015. Distinct Sources of Hematopoietic Progenitors Emerge before HSCs and Provide Functional Blood Cells in the Mammalian Embryo. *Cell Reports* 11, 1892–1904. doi:10.1016/j.celrep.2015.05.036

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, 728–733. doi:10.1038/sj.embor.7400171

McIntyre, B.A.S., Alev, C., Tarui, H., Jakt, L.M., Sheng, G., 2008. Expression profiling of circulating non-red blood cells in embryonic blood. *BMC Developmental Biology* 8. doi:10.1186/1471-213X-8-21

McNagny, K.M., Lim, F., Grieser, S., Graf, T., 1992. Cell surface proteins of chicken hematopoietic progenitors, thrombocytes and eosinophils detected by novel monoclonal antibodies. *Leukemia* 6, 975–984.

Meamar, R., Nematollahi, S., Dehghani, L., Mirmosayyeb, O., Shayegannejad, V., Basiri, K., Tanhaei, A., 2016. The role of stem cell therapy in multiple sclerosis: An overview of the current status of the clinical studies. *Advanced Biomedical Research* 5, 46. doi:10.4103/2277-9175.178791

Medvinsky, A., Dzierzak, E., 1996. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897–906. doi:10.1016/S0092-8674(00)80165-8

Medvinsky, A., Rybtsov, S., Taoudi, S., 2011. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development* 138, 1017–1031. doi:10.1242/dev.040998

Medvinsky, A.L., Samoylina, N.L., Müller, A.M., Dzierzak, E.A., 1993. An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364, 64–67. doi:10.1038/364064a0

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., Mortha, A., 2013. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annual Review of Immunology* 31, 563–604. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950

Mikkelsen, H.B., 1995. Macrophages in the external muscle layers of mammalian intestines. *Histology and Histopathology*.

Mikkelsen, H.B., Garbarsch, C., Tranum-Jensen, J., Thuneberg, L., 2004. Macrophages in the small intestinal muscularis externa of embryos, newborn and adult germ-free mice. *Journal of Molecular Histology* 35, 377–387. doi:10.1023/B:HIJO.0000039840.86420.b7

Miller, J.F.A.P., 1960. Studies on mouse leukaemia. The role of the thymus in leukaemogenesis by cell-free leukaemic filtrates. *British Journal of Cancer* 14, 93–98. doi:10.1038/bjc.1960.11

Milstein, C., 1999. The hybridoma revolution: An offshoot of basic research. *BioEssays*. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199911)21:11<966::AID-BIES9>3.0.CO;2-Z

Minko K, Bollerot K, Drevon C, Hallais MF, Jaffredo T (2003) From mesoderm to blood islands: patterns of key molecules during yolk sac erythropoiesis. *Gene Expr Patterns* 3:261–272

Minot, C.S., 1912. Development of the blood, the vascular system, the spleen. *Human Embryology*, 2.

Moore, M.A., Metcalf, D., 1970. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *British journal of haematology* 18, 279–296. doi:10.1111/j.1365-2141.1970.tb01443.x

Moore, M.A.S., Owen, J.J.T., 1965. Chromosome marker studies on the development of the haemopoietic system in the chick embryo. *Nature* 208, 956–990. doi:10.1038/208956a0

Moore, M.A.S., Owen, J.J.T., 1967. Chromosome marker studies in the irradiated chick embryo [17]. *Nature*. doi:10.1038/2151081a0

Morrison, S.J., Uchida, N., Weissman, I.L., 1995. The biology of hematopoietic stem cells. *Annual review of cell and developmental biology* 11, 35–71. doi:10.1146/annurev.cb.11.110195.000343

Morrison, S.J., Weissman, I.L., 1994. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1, 661–673. doi:10.1016/1074-7613(94)90037-X

Mosenson, J.A., McNulty, J.A., 2006. Characterization of lymphocyte subsets over a 24-hour period in Pineal-Associated Lymphoid Tissue (PALT) in the chicken. *BMC Immunology* 7. doi:10.1186/1471-2172-7-1

Mueller, M., Wacker, K., Ringelstein, E.B., Hickey, W.F., Imai, Y., Kiefer, R., 2001. Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. *American Journal of Pathology* 159, 2187–2197. doi:10.1016/S0002-9440(10)63070-2

Muller, P.A., Koscsó, B., Rajani, G.M., Stevanovic, K., Berres, M.L., Hashimoto, D., Mortha, A., Leboeuf, M., Li, X.M., Mucida, D., Stanley, E.R., Dahan, S., Margolis, K.G., Gershon, M.D., Merad, M., Bogunovic, M., 2014. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell* 158, 300–313. doi:10.1016/j.cell.2014.04.050

Murray, P.D.F., 1932. The Development in vitro of the Blood of the Early Chick Embryo. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 111, 497–521. doi:10.1098/rspb.1932.0070

Nagai, H., Sheng, G., 2008. Definitive erythropoiesis in chicken yolk sac. *Developmental Dynamics* 237, 3332–3341. doi:10.1002/dvdy.21746

Nagy N, Barad C, Graham HK, Hotta R, Cheng LS, Fejszak N, Goldstein AM (2016b) Sonic hedgehog controls enteric nervous system development by patterning the extracellular matrix. *Development* 143:264–275

Nagy N, Bodi I, Olah I (2016a) Avian dendritic cells: phenotype and ontogeny in lymphoid organs. *Dev Comp Immunol* 58:47–59

Nagy N, Goldstein AM (2006) Intestinal coelomic transplants: a novel method for studying enteric nervous system development. *Cell Tissue Res* 326:43–55

Nagy N, Magyar A, Toth M, Olah I (2004) Origin of the bursal secretory dendritic cell. *Anat Embryol (Berl)* 208:97–107

Nagy, N., Goldstein, A.M., 2017. Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. doi:10.1016/j.semcdb.2017.01.006

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, 73–83. doi:10.1002/dvdy.20933

Nagy, N., Bíró, É., Takaács, Á., Pólos, M., Magyar, A., Oláh, I., 2005. Peripheral blood fibrocytes contribute to the formation of the avian spleen. *Developmental Dynamics* 232, 55–66. doi:10.1002/dvdy.20212

Nagy, N., Burns, A.J., Goldstein, A.M., 2012. Immunophenotypic characterization of enteric neural crest cells in the developing avian colorectum. *Developmental Dynamics* 241, 842–851. doi:10.1002/dvdy.23767

Nagy, N., Magyar, A., Dávid, C., Gumati, M.K., Oláh, I., 2001. Development of the follicle-associated epithelium and the secretory dendritic cell in the bursa of Fabricius of the guinea fowl (*Numida Meleagris*) studied by novel monoclonal antibodies. *Anatomical Record* 262, 279–292. doi:10.1002/1097-0185(20010301)262:3<279::AID-AR1038>3.0.CO;2-I

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, 123–34. doi:10.1007/s004290100192

Nagy, N., Oláh, I., 2007. Pyloric tonsil as a novel gut-associated lymphoepithelial organ of the chicken. *Journal of Anatomy* 211, 407–411. doi:10.1111/j.1469-7580.2007.00766.x

Nakazawa, F., Nagai, H., Shin, M., Sheng, G., 2006. Negative regulation of primitive hematopoiesis by the FGF signaling pathway. *Blood* 108, 3335–3343. doi:10.1182/blood-2006-05-021386

Neudert, F., Redies, C., 2008. Neural circuits revealed by axon tracing and mapping cadherin expression in the embryonic chicken cerebellum. *Journal of Comparative Neurology* 509, 283–301. doi:10.1002/cne.21743

Nishikawa, S.I., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N., Kodama, H., 1998. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+

cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* (Cambridge, England) 125, 1747–1757.

Nussbaum, J., Minami, E., Laflamme, M.A., Virag, J.A.I., Ware, C.B., Masino, A., Muskheli, V., Pabon, L., Reinecke, H., Murry, C.E., 2007. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *The FASEB Journal* 21, 1345–1357. doi:10.1096/fj.06-6769com

O., L., J., E., 1979. Prebursal stem cells in the intraembryonic mesenchyme of the chick embryo at 7 days of incubation. *Journal of Immunology*.

O'Halloran, E.K., Oesterle, E.C., 2004. Characterization of leukocyte subtypes in chicken inner ear sensory epithelia. *Journal of Comparative Neurology* 475, 340–360. doi:10.1002/cne.20162

Ogawa, M., 1991. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *Journal of Experimental Medicine* 174, 63–71. doi:10.1084/jem.174.1.63

Ogawa, M., Tajima, F., Ito, T., Sato, T., Laver, J.H., Deguchi, T., 2001. CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. Developmental changes and kinetic alterations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 938, 139–45. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03583.x

Oláh, I., Glick, B., 1987. Bursal secretory cells: an electron microscope study. *The Anatomical record* 219, 268–74. doi:10.1002/ar.1092190307

Oláh, I., Gumati, K.H., Nagy, N., Magyar, A., Kaspers, B., Lillehoj, H., 2002. Diverse expression of the K-1 antigen by cortico-medullary and reticular epithelial cells of the bursa of Fabricius in chicken and guinea fowl. *Developmental and Comparative Immunology* 26, 481–488. doi:10.1016/S0145-305X(01)00094-5

Olah, I., Kendall, C., Glick, B., 1992. Anti-vimentin monoclonal antibody recognizes a cell with dendritic appearance in the chicken's bursa of fabricius. *The Anatomical Record* 232, 121–125. doi:10.1002/ar.1092320113



Oláh, I., Nagy, N., 2013. Retrospection to discovery of bursal function and recognition of avian dendritic cells; Past and present. *Developmental and Comparative Immunology* 41, 310–315. doi:10.1016/j.dci.2013.03.007

Oldfors, A., 1980. Macrophages in peripheral nerves - An ultrastructural and enzyme histochemical study on rats. *Acta Neuropathologica* 49. doi:10.1007/BF00692218

Orandle, M.S., Veazey, R.S. & Lackner, A.A., 2007. Enteric Ganglionitis in Rhesus Macaques Infected with Simian Immunodeficiency Virus. *Journal of Virology*, 81(12), pp.6265–6275.

Ottersbach, K., Dzierzak, E., 2005. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Developmental Cell* 8, 377–387. doi:10.1016/j.devcel.2005.02.001

Palis, J., Yoder, M.C., 2001. Yolk-sac hematopoiesis: The first blood cells of mouse and man. *Experimental Hematology*. doi:10.1016/S0301-472X(01)00669-5

Palis, J., 2016. Hematopoietic stem cell-independent hematopoiesis: emergence of erythroid, megakaryocyte, and myeloid potential in the mammalian embryo. *FEBS Letters*. doi:10.1002/1873-3468.12459

Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., Gross, C.T., 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456–1458. doi:10.1126/science.1202529

Pardanaud L, Eichmann A (2006) Identification, emergence and mobilization of circulating endothelial cells or progenitors in the embryo. *Development* 133:2527–2537

Pardanaud, L., Eichmann, A., 2011. Extraembryonic origin of circulating endothelial cells. *PLoS ONE* 6. doi:10.1371/journal.pone.0025889

Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates, J.R., Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., Gan, W.B., 2013. Microglia promote learning-dependent synapse

formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155, 1596–1609. doi:10.1016/j.cell.2013.11.030

Patel, V.S., Cooper, S.J.B., Deakin, J.E., Fulton, B., Graves, T., Warren, W.C., Wilson, R.K., Graves, J.A.M., 2008. Platypus globin genes and flanking loci suggest a new insertional model for beta-globin evolution in birds and mammals. *BMC Biology* 6. doi:10.1186/1741-7007-6-34

Perdiguero, E.G., Geissmann, F., 2013. Myb-independent macrophages: A family of cells that develops with their tissue of residence and is involved in its homeostasis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 78, 91–100. doi:10.1101/sqb.2013.78.020032

Pharr T, Olah I, Bricker J, Olson WC, Ewert D, Marsh J, Glick B (1995) Characterization of a novel monoclonal antibody, EIV-E12, raised against enriched splenic ellipsoid-associated cells. *Hybridoma* 14:51–57

Phillips, R.J., Powley, T.L., 2012. Macrophages associated with the intrinsic and extrinsic autonomic innervation of the rat gastrointestinal tract. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 169, 12–27. doi:10.1016/j.autneu.2012.02.004

Reif, A.E., Allen, J.M., 1964. The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. *The Journal of experimental medicine* 120, 413–33. doi:10.1084/jem.120.3.413

Rio-Hortega, D. & P, 1919. El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglia en estados normal. II. Intervencio de la microglia en los procesos patologicas. III. Naturaleza probable de la microglia. *Bol Soc Espanola Biol*, 9, pp.69–120.

Romanoff, A.L., 1960. The avian embryo. Structural and functional development, The avian embryo. Structural and functional development. The Macmillan Co., NY.

Sabin F. Studies on the origin of blood vessels and of red blood corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Contr. Embryol.* 1920; 9:215–262

Samokhvalov, I.M., Samokhvalova, N.I., Nishikawa, S.I., 2007. Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. *Nature* 446, 1056–1061. doi:10.1038/nature05725

Säynäjäkangas, R., Uchida, T., Vainio, O., 2009. Differential gene expression in CD45+ cells at para-aortic foci stage of chicken haematopoiesis. *Scandinavian Journal of Immunology* 70, 288–294. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02304.x

Schoenwolf, G.C., Garcia-Martinez, V., Dias, M.S., 1992. Mesoderm movement and fate during avian gastrulation and neurulation. *Developmental Dynamics* 193, 235–248. doi:10.1002/aja.1001930304

Schusser, B., Collarini, E.J., Yi, H., Izquierdo, S.M., Fesler, J., Pedersen, D., Klasing, K.C., Kaspers, B., Harriman, W.D., van de Lavoie, M.-C., Etches, R.J., Leighton, P.A., 2013. Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 20170–20175. doi:10.1073/pnas.1317106110

Serbedzija, G.N., Fraser, S.E., Bronner-Fraser, M., 1990. Pathways of trunk neural crest cell migration in the mouse embryo as revealed by vital dye labelling. *Development (Cambridge, England)* 612, 605–612.

Sheng, G., 2010. Primitive and definitive erythropoiesis in the yolk sac: A bird's eye view. *International Journal of Developmental Biology*. doi:10.1387/ijdb.103105gs

Sheng, J., Ruedl, C., Karjalainen, K., 2015. Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* 43, 382–393. doi:10.1016/j.immuni.2015.07.016

Sheridan, G.K., Murphy, K.J., 2013. Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. *Open Biology* 3, 130181–130181. doi:10.1098/rsob.130181

Shin, M., Nagai, H., Sheng, G., 2009. Notch mediates Wnt and BMP signals in the early separation of smooth muscle progenitors and blood/endothelial common progenitors. *Development* 136, 595–603. doi:10.1242/dev.026906

Spangrude, G.J., Johnson, G.R., 1990. Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 7433–7. doi:10.1073/pnas.87.19.7433

Squarzoni, P., Oller, G., Hoeffel, G., Pont-Lezica, L., Rostaing, P., Low, D., Bessis, A., Ginhoux, F., Garel, S., 2014. Microglia Modulate Wiring of the Embryonic Forebrain. *Cell Reports* 8, 1271–1279. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.042

Staines K, Hunt LG, Young JR, Butter C (2014) Evolution of an expanded mannose receptor gene family. *PLoS One* 9:e110330

Steinman, R.M., 2012. Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. *Annual Review of Immunology* 30, 1–22. doi:10.1146/annurev-immunol-100311-102839

Steinman, R.M., Cohn, Z.A., 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* 137, 1142–62. doi:10.1084/jem.137.5.1142

Stiller, D., Katenkamp, D., Fritzsche, V., 1978. Ultrastructural relations of macrophages to Schwann cells. An experimental study on regenerating peripheral nerves. *Exp Pathol (Jena)* 16, 16–22.

Stremmel, C., Schuchert, R., Wagner, F., Thaler, R., Weinberger, T., Pick, R., Mass, E., Ishikawa-Ankerhold, H.C., Margraf, A., Hutter, S., Vagnozzi, R., Klapproth, S., Frampton, J., Yona, S., Scheiermann, C., Molkentin, J.D., Jeschke, U., Moser, M., Sperandio, M., Massberg, S., Geissmann, F., Schulz, C., 2018. Yolk sac macrophage progenitors traffic to the embryo during defined stages of development. *Nature Communications* 9. doi:10.1038/s41467-017-02492-2

Szalay, G., Martinecz, B., Lénárt, N., Környei, Z., Orsolits, B., Judák, L., Császár, E., Fekete, R., West, B.L., Katona, G., Rózsa, B., Dénes, Á., 2016. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nature Communications* 7. doi:10.1038/ncomms11499

Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024

Tavian, M., Biasch, K., Sinka, L., Vallet, J., Péault, B., 2010. Embryonic origin of human hematopoiesis. *International Journal of Developmental Biology*. doi:10.1387/ijdb.103097mt

Tavian, M., Hallais, M.F., Péault, B., 1999. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Development (Cambridge, England)* 126, 793–803.

Theise, N.D., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Illei, P.B., Morgan, G., Teperman, L., Henegariu, O., Krause, D.S., 2000. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32, 11–16. doi:10.1053/jhep.2000.9124

Thomas JL, Pourquie O, Coltey M, Vaigot P, Le Douarin NM (1993) Identification in the chicken of GRL1 and GRL2: two granule proteins expressed on the surface of activated leukocytes. *Exp Cell Res* 204:156–166

Thomson, J.A., 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282, 1145–1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145

Tickle, C., 1995. Vertebrate limb development. *Current opinion in genetics & development* 5, 478–84. doi:10.1016/0959-437X(95)90052-I

Tindle, R.W., Nichols, R.A.B., Chan, L., Campana, D., Catovsky, D., Birnie, G.D., 1985. A novel monoclonal antibody BI-3C5 recognises myeloblasts and non-B non-T lymphoblasts in acute leukaemias and CGL blast crises, and reacts with immature cells in normal bone marrow. *Leukemia Research* 9, 1–9. doi:10.1016/0145-2126(85)90016-5

Tregaskes, C.A., Bumstead, N., Davison, T.F., Young, J.R., 1996. Chicken B-cell marker chB6 (Bu-1) is a highly glycosylated protein of unique structure. *Immunogenetics* 44, 212–217. doi:10.1007/s002510050113

Uchida, N., Weissman, I.L., 1992. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1<sup>lo</sup> Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *The Journal of experimental medicine* 175, 175–184. doi:10.1084/jem.175.1.175

Veromaa, T., Vainio, O., Eerola, E., Toivanen, P., 1988. Monoclonal antibodies against chicken Bu-1a and Bu-1b alloantigens. *Hybridoma* 7, 41–8. doi:10.1089/hyb.1988.7.41

Viertlboeck BC, Göbel TW (2007) Chicken thrombocytes express the CD51/CD61 integrin. *Vet Immunol Immunopathol* 119:137–141

Weber, C., Belge, K.U., von Hundelshausen, P., Draude, G., Steppich, B., Mack, M., Frankenberger, M., Weber, K.S., Ziegler-Heitbrock, H.W., 2000. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *Journal of leukocyte biology* 67, 699–704.

Weston, J.A., 1963. A radioautographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick. *Developmental Biology* 6, 279–310. doi:10.1016/0012-1606(63)90016-2

Wetts, R., Serbedzija, G.N., Fraser, S.E., 1989. Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. *Developmental Biology* 136, 254–263. doi:10.1016/0012-1606(89)90146-2

Wheeler, C., Eickhoff, C., Elias, A., Ibrahim, J., Ayash, L., McCauley, M., Mauch, P., Schwartz, G., Eder, J.P., Mazanet, R., Ferrara, J., Rimm, I.J., Guinan, E., Bierer, B., Gilliland, G., Churchill, W.H., Ault, K., Parsons, S., Antman, K., Schnipper, L., Tepler, I., Gaynes, L., Frei, E., Kadin, M., Antin, J., 1997. High-dose cyclophosphamide, carmustine, and etoposide with autologous transplantation in Hodgkin's disease: a prognostic model for treatment outcomes. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 3, 98–106.

Wolber, F.M., Leonard, E., Michael, S., Orschell-Traycoff, C.M., Yoder, M.C., Srour, E.F., 2002. Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic

system. *Experimental Hematology* 30, 1010–1019. doi:10.1016/S0301-472X(02)00881-0

Wu, D.C., Boyd, A.S., Wood, K.J., 2007. Embryonic stem cell transplantation: potential applicability in cell replacement therapy and regenerative medicine. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 12, 4525–35. doi:10.2741/2407

Wu, K.C., Streicher, J., Lee, M.L., Hall, B.K., Müller, G.B., 2001. Role of motility in embryonic development I: Embryo movements and amnion contractions in the chick and the influence of illumination. *Journal of Experimental Zoology* 291, 186–194. doi:10.1002/jez.1068

Yamanaka, S., 2012. Induced pluripotent stem cells: Past, present, and future. *Cell Stem Cell*. doi:10.1016/j.stem.2012.05.005

Yamasaki S, Nobuhisa I, Ramadan A, Taga T (2011) Identification of a yolk sac cell population with hematopoietic activity in view of CD45/c-Kit expression. *Dev Growth Differ* 53:870–877

Yarden, Y., Kuang, W.J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T.J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U., Ullrich, A., 1987. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *The EMBO journal* 6, 3341–51.

Yassine F, Fedecká-Bruner B, Dieterlen-Lievre F (1989) Ontogeny of the chick embryo spleen—a cytological study. *Cell Differ Dev* 27:29–45

Yokomizo, T., Takahashi, S., Mochizuki, N., Kuroha, T., Ema, M., Wakamatsu, A., Shimizu, R., Ohneda, O., Osato, M., Okada, H., Komori, T., Ogawa, M., Nishikawa, S.I., Ito, Y., Yamamoto, M., 2007. Characterization of GATA-1+ hemangioblastic cells in the mouse embryo. *EMBO Journal* 26, 184–196. doi:10.1038/sj.emboj.7601480

Young, P., Baumhueter, S., & Lasky, L. (1995). The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood*, 85(1), 96-

105. Accessed April 23, 2018. Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/85/1/96>.

Yuan, P.-Q. & Taché, Y., 2017. Abdominal surgery induced gastric ileus and activation of M1 like macrophages in the gastric myenteric plexus: prevention by central vagal activation in rats. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, p.ajpgi.00121.2017..

Yvernogeu, L., Robin, C., 2017. Restricted intra-embryonic origin of bona fide hematopoietic stem cells in the chicken. *Development* 144, 2352–2363. doi:10.1242/dev.151613

Zeigler, B.M., Sugiyama, D., Chen, M., Guo, Y., Downs, K.M., Speck, N. a, 2006. The allantois and chorion, when isolated before circulation or chorio-allantoic fusion, have hematopoietic potential. *Development (Cambridge, England)* 133, 4183–4192. doi:10.1242/dev.02596



## 10. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

### **10.1 A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:**

**Dora, D.**, Fejszák, N., Goldstein, A.M., Minkó, 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, 353–370. doi:10.1007/s00441-017-2595-y

**IF: 3,043**

**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. doi:10.1111/joa.12863

**IF: 2,479**

### **10.2 A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk:**

Nagy, N., Barad, C., Hotta, R., Bhave, S., Arciero, E., **Dora, D.**, Goldstein, A.M., 2018. Collagen 18 and agrin are secreted by enteric neural crest cells to remodel their microenvironment and regulate their migration during ENS development., n.d. . Development. doi:10.1242/dev.160317

**IF: 5,413**

## 11. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Nagy Nándor egyetemi docensnek, doktori munkám elvégzésében nyújtott szakmai és emberi támogatásáért, aki állandó optimizmusával, nagyszerű ötleteivel, energiáit nem kímélve egyengette és támogatta kutatói pályámat.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Szél Ágoston intézetigazgatónak, hogy az intézet minden támogatást megadott számomra, és lehetővé tette laborunk működését. Hálával tartozom ezen felül Dr. L. Kiss Anna egyetemi docensnek oktatói tevékenységem folyamatos támogatásáért és elismeréséért, illetve a disszertációm bírálata során általa megfogalmazott, rendkívül konstruktív kritikai észrevételeiért. Köszönöm Prof. Dr. Oláh Imre egyetemi tanárnak, hogy laborunk megalapításával és érdekeink folyamatos képviselésével lehetővé tette az összes laborban dolgozó kolléga oktatói-kutatói-asszisztensi munkáját.

Külön köszönettel tartozom laborunk jelenlegi PhD-hallgatóinak és TDK-sainak, Dr. Barad Csillának, Fejszák Nórának, és Kovács Tamásnak, akik idejüket és erejüket nem kímélve bármikor segítségemre voltak a kutatási feladatok elvégzésében, disszertációm elkészítésében.

Köszönettel tartozom Dr. Minkó Krisztina, Dr. Bódi Ildikó és Dr. Kocsis Katalin egyetemi adjunktusoknak, Orbán Edit, Orbán Lili, Vidra Zsuzsanna, Fölker Orsolya, Kovács Adrienn és Fügedi Jutka jelenlegi és egykori laborasszisztenseknek, hogy oktatói és kutatói munkámat mindvégig támogatták.

Hálával tartozom az Anatómiai Szövet- és Fejlődéstani Intézet valamennyi munkatársának barátságáért, támogatásáért és a pozitív kollegiális légkörért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, de különösképpen fantasztikus feleségemnek, Dóra Tímeának, aki mindig és mindenben mellettem állt.