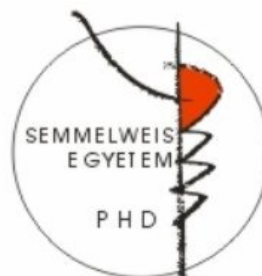


A nyirokerek fejlődését irányító mechanizmusok szervspecifikus szerepének vizsgálata a keményagyhártyában és a placentában

Doktori értekezés

Bálint László

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Jakus Zoltán, PhD., egyetemi docens

Hivatalos Bírálók:

Dr. Wiener Zoltán, PhD., egyetemi docens

Dr. Domoki Ferenc, PhD., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Nagy György, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Tóth Zsuzsanna, PhD., tudományos főmunkatárs

Prof. Dr. Józsi Mihály, DSc., egyetemi tanár

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	1
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. IRODALMI HÁTTÉR	8
1.1. A SZERVEZET KERINGÉSI RENDSZEREI	8
1.2. A NYIROKÉRHÁLÓZAT FELÉPÍTÉSE.....	9
1.3. A NYIROKEREK FUNKCIÓI	11
1.4. A NYIROKEREK FEJLŐDÉSI ÉS ÉRÉSI FOLYAMATAI	12
1.4.1. Az embrionális nyirokérfejlődésben szerepet játszó főbb molekuláris mechanizmusok	12
1.4.2. A nyirokerek fejlődésének szervspecifikus sajátosságai	15
1.4.3. Az érett nyirokérhálózat kialakulásának általános lépései	16
1.4.4. A vérrendszer és nyirokérrendszer elkülönülésében szerepet játszó folyamatok	17
1.4.5. A nyirokáramlás szerepe a nyirokerek fejlődési és érési folyamataiban.....	18
1.5. A KEMÉNYAGYHÁRTYA NYIROKÉRHÁLÓZATA.....	21
1.5.1. A meningeális nyirokerek felfedezése.....	21
1.5.2. A meningeális nyirokérhálózat felépítése.....	22
1.5.3. A meningeális nyirokérhálózat élettani és kórélettani szerepe.....	23
1.5.3.1. <i>A központi idegrendszer folyadékháztartásának klasszikus elmélete</i>	23
1.5.3.2. <i>A keményagyhártya nyirokereinek szerepe a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódásában</i>	24
1.5.3.3. <i>A keményagyhártya nyirokereinek feltételezett szerepe központi idegrendszert érintő megbetegedésekben</i>	24
1.5.4. A meningeális nyirokerek fejlődési programja	25
1.6. HIBRID TULAJDONSÁGÚ EREK A SZERVEZETBEN.....	27
1.6.1. A Schlemm-csatorna endothelsejtjei	27
1.6.2. A <i>vasa recta</i> felszálló szárának endothelsejtjei.....	28
1.6.3. A placenta spirális artériái, mint potenciális hibrid tulajdonságú erek.....	29
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	31

3. MÓDSZEREK	32
3.1. MUNKÁNK SORÁN HASZNÁLT KÍSÉRLETI ÁLLATOK	32
3.2. SZÖVETEK KIMETSZÉSE ÉS FIXÁLÁSA	33
3.2.1. Keményagyhártya kimetszése	33
3.2.2. Nyirokcsomók kimetszése	34
3.3. ALKALMAZOTT SZÖVETTANI ELJÁRÁSOK ÉS FESTÉSEK	34
3.3.1. Izolált szövetek dehidrálása, paraffinba ágyazása és metszése	34
3.3.2. Szövettani metszetek festése fluoreszcens immunhisztokémiai és rutin hematoxilin-eozin festési eljárással	34
3.4. A KEMÉNYAGYHÁRTYA-MINTÁK FESTÉSE TELJES SZÖVETI (WHOLE MOUNT) IMMUNFESTÉSI ELJÁRÁSSAL	36
3.5. A NYIROKÉRFUNKCIÓ JELLEMZÉSÉRE ALKALMAZOTT KÍSÉRLETES ELJÁRÁSOK ...	37
3.5.1. A nyirokérfunkció jellemzése a vékonybélben	37
3.5.2. A nyirokérfunkció követése a hátsó végtagban	38
3.5.3. A meningeális nyirokérfunkció jellemzése	38
3.6. A PLC γ 2 HIÁNYOS EGEREKBEN MEGFIGYELT FENOTÍPUS KVANTITATÍV JELLEMZÉSE	40
3.6.1. A vérerek és nyirokerek károsodott elkülönülésének követése a vékonybélben	40
3.6.2. A nyirokcsomók vérrel való kitöltöttségének jellemzése	40
3.6.3. A meningeális nyirokérhálózat strukturális jellemzése	41
3.7. A SPIRÁLIS ARTÉRIÁK STRUKTURÁLIS ÁTALAKULÁSA SORÁN LEZAJLÓ FOLYAMATOK JELLEMZÉSE	42
3.8. PREECLAMPZIA FENOTÍPUS JELLEMZÉSE	43
3.8.1. A szisztolés vérnyomás meghatározása	43
3.8.2. Proteinuria vizsgálata	44
3.8.3. Embriók, placenták, anyai veseminták tömegének meghatározása késő embrionális korban	44
3.9. A MÉRÉSI EREDMÉNYEK STATISZTIKAI ANALÍZISE ÉS BEMUTATÁSA	45
4. EREDMÉNYEK	46
4.1. A MENINGEÁLIS NYIROKÉRHÁLÓZAT FELÉPÍTÉSÉNEK VIZSGÁLATA	46

4.2. A KEMÉNYAGYHÁRTYA NYIROKÉRHÁLÓZATÁNAK A MAKROMOLEKULÁK KÖZPONTI IDEGRENDSZERBŐL VALÓ ELSZÁLLÍTÓDÁSÁBAN BETÖLTÖTT SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA.....	48
4.2.1. A központi idegrendszerbe injektált makromolekulák elvezetődésének vizsgálatára alkalmazott kísérleti eljárás beállítása	48
4.2.2. A meningeális nyirokerek szerepének vizsgálata a központi idegrendszerbe injektált makromolekulák felvételében	51
4.3. A MENINGEÁLIS NYIROKÉRHÁLÓZAT FEJLŐDÉSI PROGRAMJÁNAK VIZSGÁLATA ..	52
4.3.1. A meningeális nyirokérstruktúrák fejlődésének követése	52
4.3.2. A makromolekulák agyszövetből való elszállítódásának követése a meningeális nyirokerek fejlődési programja során.....	54
4.4. AZ ÁRAMLÁS MENINGEÁLIS NYIROKÉRHÁLÓZAT FEJLŐDÉSI PROGRAMJÁBAN BETÖLTÖTT SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA.....	56
4.4.1. A PLC γ 2 hiányos egértörzsben megfigyelhető fenotípus jellemzése.....	56
4.4.1.1. A PLC γ 2 hiányában kialakuló nyirokér-fenotípus jellemzése embrionális korú egerekben	56
4.4.1.2. A PLC γ 2 hiányában kialakuló nyirokér-fenotípus jellemzése fiatal felnőtt egerekben.....	58
4.4.1.3. A nyirokcsomók jellemzése PLC γ 2 hiányos egérmodellben	60
4.4.2. A nyirokérfunkció jellemzése PLC γ 2 hiányos egértörzsben.....	63
4.4.2.1. A nyirokérfunkció jellemzése a vékonybélben	63
4.4.2.2. A nyirokérfunkció jellemzése a hátsó végtagban.....	64
4.4.2.3. A meningeális nyirokérhálózat funkciójának jellemzése	65
4.4.3. A károsodott nyirokáramlás hatása a keményagyhártya nyirokérhálózatának fejlődési programjára	67
4.4.4. A makromolekulák központi idegrendszerből való felvételének vizsgálata fiatal felnőtt PLC γ 2 hiányos egerekben.....	70
4.5. A VEGFR-3 NYIROKÉRNÖVEKEDÉSI JELPÁLYA SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A PLACENTA SPIRÁLIS ARTÉRIÁINAK STRUKTURÁLIS ÁTALAKULÁSÁBAN	72
4.5.1. Nyirokér-markerek kifejeződése a spirális artériák endothelsejtjeiben a spirális artériák strukturális átalakulása során	72

4.5.2. A VEGFR-3 jelátviteli útvonal spirális artériák strukturális átalakulásában betöltött szerepének vizsgálata	73
4.5.2.1. <i>A spirális artériák strukturális átalakulási folyamatának jellemzése VEGFR-3 jelátviteli útvonalának sérülése esetén</i>	73
4.5.2.2. <i>A VEGFR-3 tirozin kináz aktivitásának jellemzése $Flt4^{kd/+}$ egerek spirális artériáiban</i>	76
4.5.3. A károsodott VEGFR-3 jelpálya következményeinek vizsgálata a vemhesség során $Flt4^{kd/+}$ egértörzsben	77
4.5.3.1. <i>Az embriók, illetve placenták tömegének változása a VEGFR-3 jelpálya károsodásának hatására</i>	78
4.5.3.2. <i>A VEGFR-3 jelpálya károsodásának hatására a vemhes nőstényekben kialakuló fenotípus jellemzése</i>	79
5. MEGBESZÉLÉS	82
6. KÖVETKEZTETÉSEK	91
7. ÖSSZEFOGLALÁS	93
8. SUMMARY	94
9. IRODALOMJEGYZÉK	95
10. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	122
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	123

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	magyar elnevezés	angol elnevezés
α -SMA	α -simaizomaktin	α -Smooth Muscle Actin
BglII	<i>Bacillus globigii</i> restriktációs endonukleáz II	Type II Restriction Endonuclease of <i>Bacillus globigii</i>
BODIPY C16	4,4-Difluoro-5,7-Dimetil-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacén-3-Hexadekánsav	4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Hexadecanoic Acid
CLEC-2	C-típusú lektin-szerű receptor 2	C-type Lectin-like Receptor 2
CSF	Cerebrospinális folyadék	Cerebrospinal Fluid
Cy2	Cianin fluorofor 2	Cyanine Dye 2
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol	4',6 diamidino-2-phenylindole
DNS	Dezoxiribonukleinsav	Deoxyribonucleic Acid
E9.5	Az embrionális fejlődés 9.5-ik napja	Embryonic Day 9.5
ERK	Extracellulárisan szabályozott mitogén-aktivált fehérje kináz	Extracellular Regulated Mitogen-activated Protein Kinase
F4/80	Epidermális növekedési faktor-szerű egységet tartalmazó mucin-szerű hormonreceptor-szerű fehérje 1	Epidermal Growth Factor-like Module-containing Mucin-like Hormone Receptor-like Protein 1
<i>Flt4</i>	Kolóniastimuláló faktor 1-hez (FMS) köthető receptor tirozin kináz 4	Colony Stimulating Factor 1 (FMS)-related Receptor Tyrosine Kinase 4
FOXC2	Targoncafehérje C2	Forkhead Box Protein C2
GATA2	GATA-kötő fehérje 2	GATA Binding Protein 2

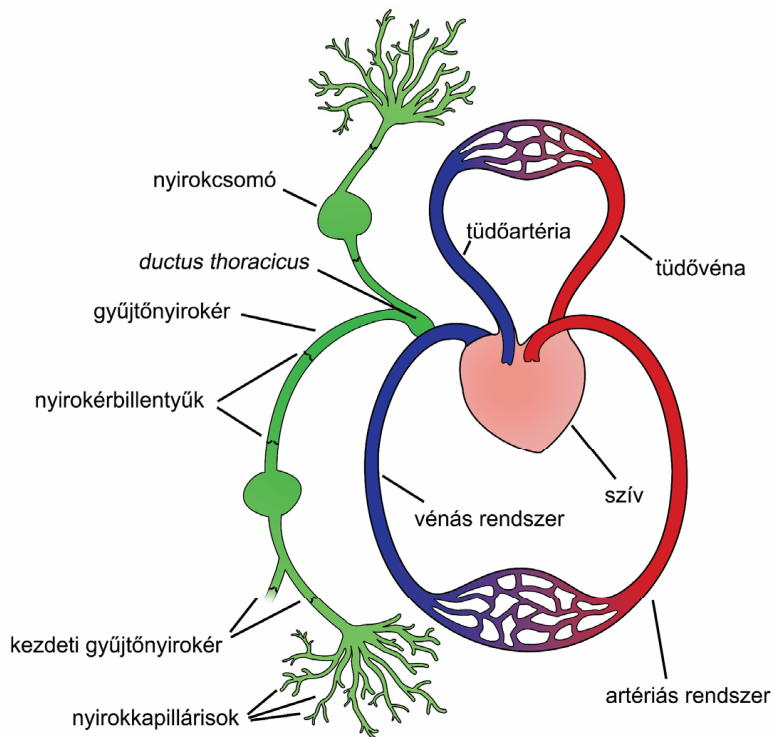
GD11.5	A vemhesség 11.5-ik napja	Gestational Day 11.5
GFP	Zöld fluoreszcens fehérje	Green Fluorescent Protein
HE	Hematoxin-eozin	Hematoxylin-eosin
IgG	Immunglobulin G	Immunoglobulin G
kd	Károsodott kinázaktivitás	Kinase dead
kDa	Kilodalton	Kilodalton
LEC	Nyirokendothelsejt	Lymphatic Endothelial Cell
LYVE-1	Nyirokendothel hialuronsav-receptor 1	Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor 1
MFI	Átlagos fluoreszcens jelintenzitás	Mean Fluorescent Intensity
P21	A születést követő 21-ik nap	Postnatal Day 21
PBS	Foszfátpufferelt sóoldat	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimeráz láncreakció	Polymerase Chain Reaction
PDPN	Podoplanin	Podoplanin
PECAM	Vérlemezke- és endothelsejt adhéziós molekula	Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule
p-ERK	Foszforilált ERK	phosphorylated ERK
PFA	Paraformaldehid	Paraformaldehyde
PIEZO1	Piezo-típusú mechanoszenzitív ioncsatorna komponens 1	Piezo-Type Mechanosensitive Ion Channel Component 1
PLC γ 2	Foszfolipáz C γ 2	Phospholipase C γ 2
PROX-1	Prospero homeobox fehérje 1	Prospero Homeobox Protein 1
RhD	Rhodamin dextrán	Rhodamine dextran
SEM	Az átlag standard hibája	Standard Error of Mean

SLP-76	Limfocita citoszol fehérje 2	Lymphocyte Cytosolic Protein 2
SOX-18	Y kromoszóma nemmeghatározó régió transzkripció faktor 18	Sex Determining Region of Chromosome Y (SRY)-Box Transcription Factor 18
SPF	Meghatározott kórokozóktól mentes	Specific Pathogen-free
SYK	Lép tirozin kináz	Spleen Associated Tyrosine Kinase
TIE-2	Angiopoietin-1 receptor	Angiopoietin-1 Receptor
uNK	Uterinális természetes ölósejt	Uterine Natural Killer Cell
VEGF-C	Érendothel növekedési faktor C	Vascular Endothelial Growth Factor C
VEGF-D	Érendothel növekedési faktor D	Vascular Endothelial Growth Factor D
VEGFR-3	Érendothel növekedési faktor receptor 3	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3
YFP	Sárga fluoreszcens fehérje	Yellow Fluorescent Protein

1. Irodalmi háttér

1.1. A szervezet keringési rendszerei

Szervezetünkben az egyes szövetek és szervek közötti kapcsolat két, egymással összehangoltan működő érhalózat, a vérérhalózat és a nyirokérhalózat közvetítése révén valósul meg. A vérrendszer egy cirkuláris rendszer, amelyben a vér a szívből kiindulva az artériákon, arteriolákon, kapilláris plexusokon, venulákon és vénákon végighaladva visszatér a szívbe. A vérkeringés elsődleges feladata a szervezet sejtjeinek oxigén- és tápanyagellátásának biztosítása, valamint az anyagcseretermékek és szabályozó molekulák szállítása. A nyirokérhalózat egy vakon kiinduló, lineáris rendszer, amely a kezdeti, nyirokkapilláris szakaszán felvételre kerülő szövetközi folyadékot, sejteket, makromolekulákat (összefoglaló elnevezés: nyirok) gyűjtő nyirokerekre és nyirokcsomókra keresztülhaladva továbbítja a vénás keringésbe (1. ábra). A két érhalózat a *ductus thoracicus* és a *truncus lymphaticus dexter* révén kapcsolódik egymáshoz, amelyeken keresztül a nyirok a vérérhalózatba továbbítódik [1-3].



1. ábra: Szervezet keringési rendszerei

Bár e két érhalózat számos funkcionális, strukturális és anatómiai hasonlóságot hordoz, a róluk rendelkezésre álló tudományos és orvosi ismereteink nagyon eltérőek. Míg a vérrendszer felépítése és működése jól dokumentált, a nyirokrendszert sokáig csak egyfajta „másik keringésként” tartották számon, és a rendelkezésre álló ismeretanyag is szerényebb [1, 4-6].

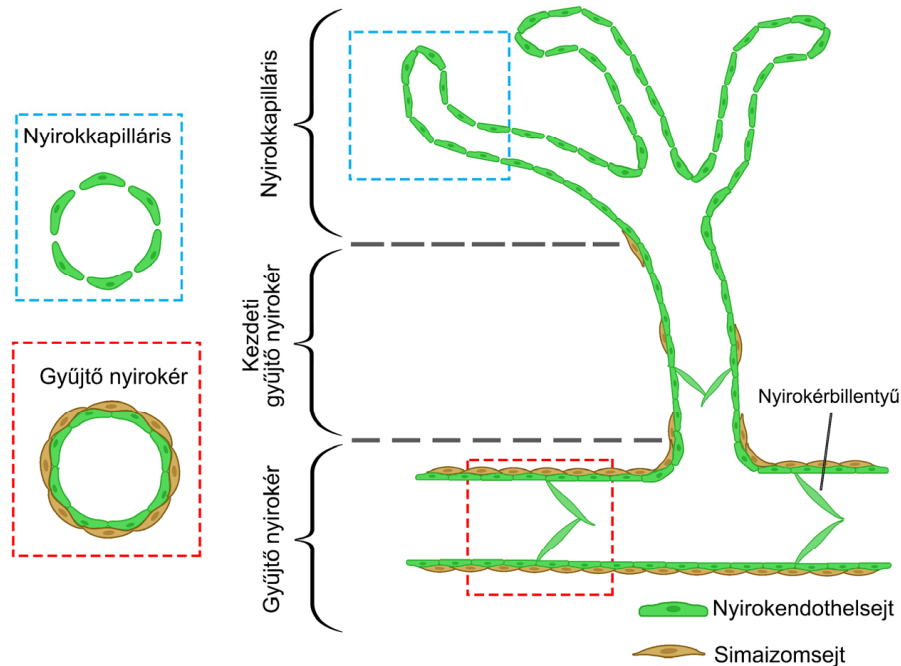
Az elmúlt időszakban azonban számos új információ látott napvilágot ennek a kevésbé ismert keringési rendszernek a felépítéséről és fejlődéséről, valamint olyan régiókban is fedeztek fel nyirokereket, amelyekre a korábbi elképzelések szerint nem jellemző azok jelenléte. Ezen túlmenően számos olyan élettani és kórélettani folyamatban mutatták ki a nyirokerek szerepét, amelyről korábban nem is gondoltuk, hogy szerepet játszhat bennük a nyirokrendszer [1, 4-7]. A nyirokerek újonnan felfedezett szervspecifikus funkcióinak részletesebb megismerésével közelebb kerülhetünk számos, jelenleg nem gyógyítható megbetegedés kialakulásának és kórfolyamatának megértéséhez, valamint ezen megbetegedések gyógyítását megcélzó terápiák potenciális célpontjainak azonosításához.

1.2. A nyirokérhálózat felépítése

A nyirokérhálózat kezdeti szakaszát alkotó nyirokkapillárisok jellemzően a szervezet összes szervében megfigyelhetőek. Kivételt képeznek az avaszkuláris szövetek, mint a porcok, cornea, epidermis, valamint egyes vaszkularizált szövetek, mint a csontvelő, retina, illetve a korábbi elgondolás szerint a központi idegrendszer [1-3, 8, 9]. A nyirokkapillárisok keresztmetszeti képén jellemzően – a hemodinamikai nyomás hiányában – összeesett, konkáv lumen figyelhető meg [10]. A nyirokkapillárisok egyrétegű, részben átfedő nyirokendothelsejtekből állnak, amelyek körül nem figyelhető meg összefüggő bazális membrán, valamint sem vaszkuláris simaziomsejtek, sem periciták jelenléte nem jellemző [1, 11, 12]. A nyirokkapillárisok tölgyfalevél alakú nyirokendothelsejtjeinek szélei laza intercelluláris junkciók segítségével kapcsolódnak egymáshoz (úgynevezett gombszerű sejtkapcsolat) [11-13]. A nyirokendothelsejtek felszínén található filamentumok segítségével a nyirokerek abluminális felszíne az extracelluláris mátrixhoz horgonyzódik. Az intersticiális nyomás fokozódásakor a horgonyzó filamentumok húzóerőt fejtenek ki a sejtekre, ami következtében az

egymáshoz lazán kapcsolódó nyirokendothelsejtek közötti rések megnyílnak, amelyeken keresztül az intersticiális tér és a nyirokér lumen közötti nyomáskülönbség révén a sejtközötti térből folyadék, makromolekulák és sejtek jutnak a nyirokkapillárisok lumenébe [12, 14, 15].

A nyirok a nyirokkapillárisok felől az elszórtan simaizomszövettel borított, ám abszorbeáló képességgel is rendelkező kezdeti gyűjtő nyirokerekbe [16], majd az extravazális folyadék felvételére nem képes, simaizomszövettel borított gyűjtő nyirokerekbe kerül. A nyirokkapillárisokkal ellentétben a gyűjtő nyirokerek nyirokendothelsejtjei (a vérerek endothelsejtjeihez hasonlóan) szorosan kapcsolódnak egymáshoz (úgynevezett cipzár-szerű sejtkapcsolat) és körülöttük bazális membrán, periciták és izomsejtek figyelhetők meg [13]. A környező harántcsíkolat izomszövetek, valamint a gyűjtő nyirokerek falában található simaizomsejtek összehúzódásai, valamint a gyűjtő nyirokerek intraluminális billentyűi biztosítják a nyirok egyirányú áramlását a nyirokcsomók, majd a vénás rendszer irányába [17, 18]. A nyiroktörzsekké alakuló gyűjtő nyirokerekből a nyirokfolyadék a *ductus thoracicuson*, illetve a *truncus lymphaticus dexterem* keresztül a *vena subclavia* és *vena jugularis interna* találkozásánál jut vissza a vénás rendszerbe [19, 20]. A nyirokérhálózat főbb elemeit és a nyirokrendszer felépítésének sematikus ábrázolását a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra: A nyirokérhálózat felépítésének sematikus ábrázolása

1.3. A nyirokerek funkciói

A nyirokrendszer fő feladata a szövetközötti folyadék elszállítása, és ezáltal a szöveti folyadék egyensúly fenntartása [1-3]. A szervezet folyadék egyensúlyának szabályozásán túl a nyirokérhálózat fontos feladatot tölt be az immunsejtek szállításában is. A vakon kiinduló nyirokkapillárisokba belépő leukociták a gyűjtő nyirokerek alkotta hálózat révén, kemokinek, illetve citokinek irányításával jutnak el a regionális nyirokcsomókba [1-3]. A leukociták passzív szállításán túlmenően a nyirokendothelsejtek sejtadhéziós molekulák [21-25], valamint citokinek és kemokinek [21, 26-31] kifejezése révén aktívan képesek elősegíteni a fehérvérsejtek nyirokerekbe történő belépését és szállítását. Ezen túlmenően antigén-prezentáló sejtekként a nyirokendothelsejtek képesek a T-sejtes immunválasz befolyásolására [32-35]. E folyamatok révén a nyirokerek fontos szerepet játszanak a szervezet immunválaszának meghatározásában.

A szervezet folyadék egyensúlyának biztosításán és a leukociták transzportján túlmenően jól ismert, hogy a bélbolyhokban található chyluserek (vagy más néven: centrális nyirokerek) feladata a lipidek lipoproteinek formájában történő felvétele és elszállítása [1-3].

A nyirokérhálózat előzőekben bemutatott, széleskörűen ismert funkcióin túlmenően az elmúlt időszakban a nyirokereknek számos, korábban ismeretlen szerepe is fény derült.

Egerekén végzett kísérletek eredményei alapján a lipidek tápcsatornából való felvételében betöltött szerepük mellett a nyirokerek fontos szerepet játszanak a lipidek perifériás szövetekből májba történő szállításában is (reverz koleszterintranszport), ami felveti a nagy erek falában elhelyezkedő nyirokerek szerepét a hiperkoleszterinémia és az atheroszklerózis kialakulásában [36-38].

Mindemellett rácsálókon végzett megfigyelések szerint a bőr nyirokereit az intersticiális folyadék egyensúly meghatározása révén részt vesznek a szisztémás vérnyomás szabályozásában, ezáltal szerepük lehet a magasvérnyomás-betegség kórélettani folyamataiban [39-41].

A születést követő első levegővétel során az addig folyadékkal telt alveolusok levegővel való megtöltéséhez rendkívül nagy mechanikai erő szükséges [42]. Egerekén végzett kísérleti eredmények alapján a tüdő nyirokereit a surfactanttól független módon

fontos szerepet játszanak a tüdő első légvételre való felkészítésében a vemhesség késői szakaszában. A megfigyelések szerint a nyirokérnövekedési jelpálya zavara esetén nyirokerek hiányában az egerek születésüket követően cianotikussá válnak és rövid időn belül elpusztulnak [43].

A nyirokerek kutatására alkalmas kísérletes megközelítések gyarapodásával és finomodásával nemcsak a nyirokerek élettani és kórélettani szerepéről áll rendelkezésre egyre több adat, hanem egyúttal egyre szélesebb körű ismerettel rendelkezünk azok fejlődési és érési folyamatairól is.

1.4. A nyirokerek fejlődési és érési folyamatai

A nyirokerek fejlődéséről szóló első kutatások a XX. század elejéről származnak és Florence Rena Sabin és Frederic Thomas Lewis amerikai kutatók nevéhez köthetőek. Eredményeik arra utaltak, hogy az embrionális fejlődés során a nyirokerek a vénás erek endothelsejtjeiből képződnek [44-46]. A megfigyeléseiken alapuló „centrifugális” elmélet szerint a korai embrionális fejlődés során a vénákról leváló endothelsejtekből kialakuló kezdetleges nyirokstruktúrák centrifugálisan növekedve kapillarisokat alakítanak ki a periféria irányában, és behálózzák a szerveket [1-3, 8, 9, 47]. Számos vizsgálat megerősíti, hogy a fejlődő nyirokérhálózat sejtjei főként az embrionális vénákból lefűződő nyirokendothelsejtekből származtathatóak [48-56].

Egyes kísérleti eredmények ugyanakkor arra utalnak, hogy a nyirokendothelsejtek perivaszkulárisan elhelyezkedő progenitor sejtjeiből, úgynevezett limfangioblasztokból is származhatnak („centripetális” elmélet) [1, 2, 8, 9, 47, 57]. A megfigyelések szerint a nyirokendothelsejtek között találhatóak mezenhimális [58-63], valamint homogén eredetű [64-66] nyirokendothelsejtek is, amely eredmények felvetik a nyirokendothelsejt-progenitorok heterogén eredetének lehetőségét.

1.4.1. Az embrionális nyirokérfejlődésben szerepet játszó főbb molekuláris mechanizmusok

A nyirokérhálózat fejlődése a korai embrionális időszakban – emberek esetén a megközelítőleg 40 hétig tartó várandósság 6-7. hetében, míg egereknél a nagyságrendileg 21 napig tartó vemhesség 9.0. embrionális napján (E9.0) – kezdődik meg.

Egérembriókban a *vena cardinalis anterior* egyes laterálisan elhelyezkedő endothelsejtek felszínén E9.0 korban megjelenő nyirokendothel hialuronsav-receptor 1 (LYVE-1, Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor 1) az egyik első indikátora az endothelsejtek nyirokendothel irányú elköteleződésnek [51]. A LYVE-1 mellett E9.5 korú egérembriókban a *vena cardinalis* endothelsejtjeiben megkezdődik a Prospero homeobox fehérje 1 (PROX-1, Prospero Homeobox Protein 1) transzkripciós faktor kifejeződése, amely kettős pozitív sejtek a vénából leágazva, polarizált módon vándorolva megalkotják a primer nyirokciszternákat [50-52, 54-56, 67]. Egérmodelleken, valamint humán primer vérérendothel-sejttenyészetben végzett kísérletek eredményei alapján a PROX-1 transzkripciós faktor az endothelsejtek nyirokendothelsejt irányába történő differenciációjának elengedhetetlen szereplője. Hatására az endothelsejtekben megnő a nyirokérendothel-specifikus fehérjék kifejeződése, mellyel párhuzamosan csökken a vérérendothelsejtekre jellemző fehérjék jelenléte [51, 56, 68, 69]. PROX-1 hiányos egerekben a vérérképződés nem szenved zavart, azonban elmarad a primer nyirokciszternák megjelenése, valamint nem fejlődnek ki nyirokerek [50, 51]. A PROX-1 kifejeződése a nyirokerek fejlődési folyamatainak befejeződését követően is folyamatosan fennmarad a nyirokendothelsejtekben [70].

Jelenleg kevésbé ismertek a PROX-1 transzkripciós faktor kifejeződésének indukálásában részt vevő molekuláris mechanizmusok. A *Prox1* gén promóter szekvenciájában megtalálható az Y kromoszóma nemmeghatározó régió transzkripciós faktor 18-ra (SOX-18, Sex Determining Region of Chromosome Y (SRY)-Box Transcription Factor 18) specifikus kötőhely, ráadásul a megfigyelések szerint a PROX-1 pozitívást megelőző időszakban (E9.0 korban) a SOX-18 transzkripciós faktor kifejeződik a *vena cardinalis* azon endothelsejtjeiben, amely sejtek később nyirokendothel irányban köteleződnek el. A nyirokendothelsejtekben a nyirokrendszer fejlődésének kezdeti lépéseit követően nem mutatható ki a SOX-18 jelenléte, ami arra enged következtetni, hogy a SOX-18 nem szükséges a nyirokendothelsejtek identitásának fennmaradásához [71].

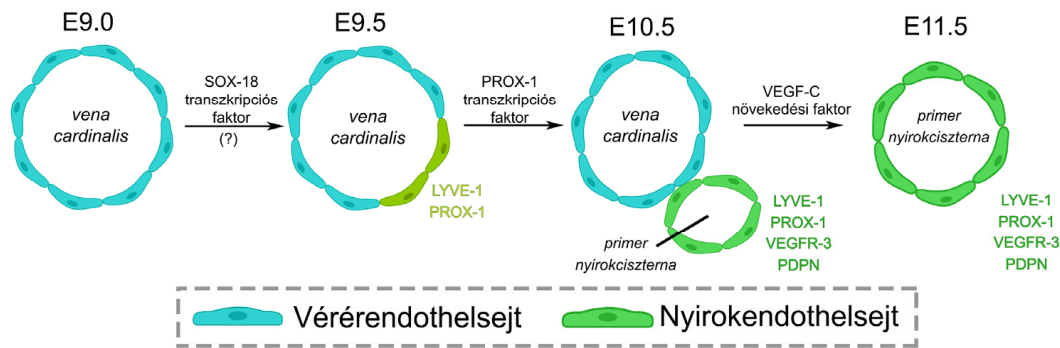
A kísérleti eredmények szerint a PROX-1 transzkripciós faktor hatására a *vena cardinalisból* lefűződő nyiroké-rogenitorsejtjeiben fokozódik a nyirokerek fejlődési és érési folyamataiban központi szerepet betöltő érendothel növekedési faktor receptor 3 (VEGFR-3, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3) fehérjét kódoló

kolóniastimuláló faktor 1-hez (FMS) köthető receptor tirozin kináz 4 (*Flt4*, Colony Stimulating Factor 1 (FMS)-related Receptor Tyrosine Kinase 4) gén kifejeződése [51, 69]. A VEGFR-3 tirozin kináz receptor jelpályája elengedhetetlen a nyirokendothelsejtek túléléséhez, fennmaradásához és migrációjához a nyirokerek fejlődése során, valamint a VEGFR-3 pozitív visszacsatolásként elősegíti a PROX-1 kifejeződését, ezáltal fenntartva a nyirokér-progenitor sejtek identitását a nyirokerek fejlődése során [72].

A VEGFR-3 jelenleg ismert ligandjai az érendothel növekedési faktor C (VEGF-C, Vascular Endothelial Growth Factor C) és VEGF-D [73-75]. A VEGF-C fehérjét kódoló gén hiánya esetén, bár megfigyelhető a *vena cardinalis* egyes sejtjeinek nyirokendothelsejtek irányába mutató differenciációja, azonban nem alakulnak ki a primer nyirokciszternák és nem fejlődik ki nyirokérhálózat [76]. VEGF-D hiányában csak részleges nyirokérhiány figyelhető meg, ami arra utal, hogy a VEGF-D megkerülhető a nyirokerek fejlődése során [77]. A VEGFR-3 ligand általi aktivációját követően a receptorról kiinduló intracelluláris jelpálya hozzájárul a nyirokendothelsejtek proliferációjához, túléléséhez, migrációjához és a nyirokerek képződéséhez [74, 78-81].

Egérmodellen végzett kísérleti eredmények alapján az embrionális fejlődés korai szakaszában a VEGFR-3 általánosan megjelenik minden endothelsejt felszínén [82], és a VEGF-C növekedési faktortól független módon részt vesz a kardiovaszkuláris rendszer fejlődésében [83, 84]. Egérembriókban az E10.5 kort követően a VEGFR-3 kifejeződése azonban már csak a nyirokendothelsejtekre jellemző [82, 85, 86].

E11.5 kortól kezdődően a nyirokendothelsejtek felszínén megjelenik a podoplanin (PDPN; egyéb elterjedt elnevezései: T1 α , gp38, E11 antigén) sejt felszíni fehérje, és kialakul a centrifugális irányban növekvő, LYVE-1, PROX-1, VEGFR-3 és PDPN fehérjéket egyaránt kifejező nyirokerekből álló kezdetleges nyirokérhálózat [67, 86, 87] (3. ábra).



3. ábra: A nyirokerek általános fejlődése során lezajló folyamatok sematikus ábrázolása

A primer nyirokciszterna vena cardinalisról való lefűződésének egyes folyamatait irányító főbb molekuláris faktorok, illetve a nyirokendothelsejteken megjelenő molekuláris markerek időzítésének sematikus ábrázolása.

1.4.2. A nyirokerek fejlődésének szervspecifikus sajátosságai

Az egyes szerveket behálózó nyirokérstruktúrák nemcsak eredetüket tekintve mutatnak heterogenitást, hanem fejlődési és érési programjuk megvalósulásának időpontjában és módjában is jelentős különbségeket figyelhetünk meg. A nyirokerek fejlődési és érési folyamatai jellemzően az embrionális fejlődés során lejátszódnak, azonban bizonyos szervekben a szervspecifikus nyirokérfejlődés és -érés részben vagy teljes mértékben a születést követő időszakban valósul meg.

A vékonybél nyirokereinek fejlődése során egerekben elsőként E13.5 korban figyelhetők meg a *vena mesenterica superior* endothelsejtjei között PROX-1 pozitivitást mutató nyirokendothelsejtek, és a kezdeti éretlen mezenterialis nyirokérstruktúrák az E14.5 korban alakulnak ki. Ezt követően az E17.5 időszakban jelennek meg az érett nyirokerek a mezentériumban és a vékonybélben [88]. Habár a legtöbb esetben a nyirokerekre – a patológias folyamatoktól eltekintve – a fejlődési és érési folyamataikat követően nem jellemző nyirokérújdonképződés, a vékonybél nyirokereiben azok fejlődési programjának befejeződését követően is megfigyelhető a nyirokendothelsejtek folyamatos proliferációja [89, 90].

A bőr nyirokernövekedési programja során egémbriókban a juguláris primer nyirokciszternából eredő első nyirokerek E12.5 korban érik el a bőr rétegeit. Ezt

követően, az E12.5-E14.5 időszakban a vénás és hemogenikus eredetű prekursorokból megkezdődik a kezdetleges szubkután dermális nyirokérhálózat kialakulása [66]. A szív nyirokereinek kialakulása egerekben E12.5 korban kezdődik meg, s a teljesen kifejlett nyirokérhálózat két héttel születést követően figyelhető meg a szívben [65]. Egerekben a fül kialakulása posztnatálisan történik, ennek megfelelően a fül nyirokérhálózatának fejlődése is a születést követő időszakra esik. Ezen túlmenően a megfigyelések szerint a rekeszizom nyirokérhálózatának fejlődési és érési folyamatai is a születést követően játszódnak le – annak ellenére, hogy a rekeszizom kialakulása már az embrionális fejlődés során megtörténik [91].

1.4.3. Az érett nyirokérhálózat kialakulásának általános lépései

Egerekben az E10.5-E11 korban kialakuló kezdetleges nyirokérplexus jellemzően a vérrendszerhez kapcsolódó kapilláriszerű kezdetleges nyirokérstruktúrákból áll [45], amelyek E14.5 korra behálózzák az embriót [92]. Ezt követően az elsőként kialakuló éretlen nyirokerek szervenként eltérő időpontban és mechanizmussal megvalósuló érési folyamatokon mennek keresztül. Ennek során a különálló nyirokkapilláris-hálózatok egymáshoz kapcsolódnak és a már meglévő nyirokerekhez csatoltan további nyirokerek jönnek létre, valamint az éretlen nyirokerek strukturális átalakuláson mennek keresztül. A nyirokerek strukturális átalakulása során elkülönülnek a kapilláris és gyűjtő nyirokerek, a gyűjtő nyirokerek endothelsejtjei körül simaizom-borítás alakulhat ki, valamint lumenükben megjelenhetnek a nyirok egyirányú áramlását biztosító lumenális billentyűk [92, 93].

A nyirokerek fejlődése során, illetve felnőtt korban a gyűjtő nyirokerek billentyűiben nagy mennyiségben kifejeződő targoncafehérje C2 (FOXC2, Forkhead Box Protein C2) transzkripció faktor fontos szerepet játszik abban, hogy a kezdetleges nyirokerekből kapilláris és gyűjtő nyirokerek jöjjenek létre [94, 95]. FOXC2 hiányában a nyirokérfejlődés kezdeti szakaszaiban nem figyelhető meg eltérés, azonban a nyirokerek érése során nem alakulnak ki billentyűk a gyűjtő nyirokerekben, a nyirokkapillárisok endothelsejtjein vérerendothel-specifikus fehérjék kifejeződése figyelhető meg, és falukban ektópiás bazális lamina és simaizomsejtrétegek jelennek meg [95]. A FOXC2 ezen túlmenően a PROX-1 és GATA-kötő fehérje 2 (GATA2, GATA Binding Protein 2) transzkripció faktorokkal együttesen fontos szerepet tölt be a nyirokérbillentyűket alkotó

sejtek szegregációjában és a nyirok egyirányú transzportját biztosító nyirokérbillentyűk kialakulásában [96-100].

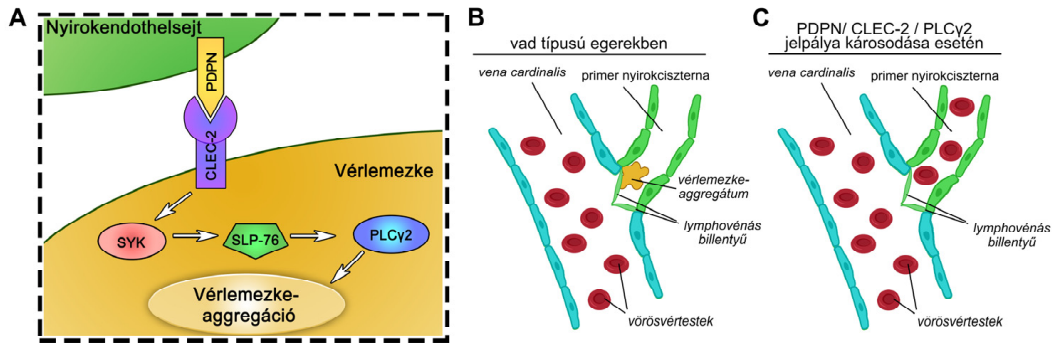
1.4.4. A vérrendszer és nyirokrendszer elkülönülésében szerepet játszó folyamatok

Fiziológias körülmények között a nyirokérhálózat a vérrendszertől elkülönült keringést alkot. Egyes genetikailag módosított egértörzsekben azonban azt figyelték meg, hogy sérül a két keringési rendszer elkülönülése. A nyirokendothelsejteken általánosan kifejeződő PDPN hiányában habár a vérérhálózat nem károsodik, sérül a vérerek és nyirokerek szeparációja és a nyirokerek vérrel kitöltötté és tágulttá válnak [87, 101]. Ezen túlmenően a szinte kizárólag hematopoetikus sejtekben kifejeződő lép tirozin kináz (SYK, Spleen Associated Tyrosine Kinase), illetve adaptorfehérjéje, a limfocita citoszol fehérje 2 (SLP-76, Lymphocyte Cytosolic Protein 2), és a SYK által aktivált foszfolipáz C γ 2 (PLC γ 2, Phospholipase C γ 2) fehérje [102-107], továbbá vérlemezkék [108, 109], és vérlemezke-aktivációban központi szerepet betöltő C-típusú lektin-szerű receptor 2 (CLEC-2, C-type Lectin-like Receptor 2) [110-113] hiánya esetén is azt figyelték meg, hogy nem valósul meg a vérerek és nyirokerek szeparációja az embrionális fejlődés során, ami következtében a nyirokerek vérrel kitöltötté válnak.

Ma már ismert, hogy a nyirokendothelsejtek membránjában E11.5 kortól kezdődően kifejeződő PDPN aktiválja a véráramlásban keringő vérlemezkék által kifejezett, és a vérlemezke-aktivációban központi szerepet betöltő CLEC-2 fehérjét [114], ami a SYK, SLP-76, PLC γ 2 fehérjék által közvetített jelátviteli útvonalon keresztül kiváltja a vérlemezkék aktivációját (4. ábra A panel) [115, 116].

Felnőtt állatokban és emberben a nyirokrendszer a *vena subclaviaba* torkolló *ductus thoracicuson* és *truncus lymphaticus dexterem* keresztül kapcsolódik a vérrendszerhez [2, 4, 8, 92]. Egerekben a vér- és nyirokérhálózat elkülönülésének biztosítására az E11.5-13.5 közötti időszakban a két keringési rendszer találkozásánál úgynevezett lymphovénás billentyűk alakulnak ki (4. ábra B panel) [117]. A lymphovénás billentyűk és a nyirokérbillentyűk fontos szerepet töltenek be a vér nyirokerekbe történő retrográd áramlásának megakadályozásában, azonban önmagukban nem képesek a két keringési rendszer elkülönülésének biztosítására.

A megfigyelések szerint a PDPN – CLEC2 – PLC γ 2 jelátviteli útvonal következtében vérlemezke-aggregáció alakul ki a primer nyirokciszterna és a *vena cardinalis* között az E12.5-E13.5 közötti időszakban, amely folyamat kritikus szerepet tölt be a két keringési rendszer szeparációjában (4. ábra B és C panel) [101, 110, 111, 113]. A megfigyelhető vérlemezke-aggregátum vélhetően időszakosan oldódik, illetve újjáépül, ezáltal biztosítva a nyirok vénás rendszerbe való továbbítását, valamint megátolva a vér nyirokerekbe történő retrográd áramlását [118].



4. ábra: A vérrendszer és a nyirokrendszer elkülönülését biztosító jelpálya és a két keringési rendszer károsodott elkülönülésének sematikus ábrázolása

A: A nyirokendothelsejt indukálta vérlemezke-aggregáció folyamatának sematikus ábrázolása **B:** A vér- és nyirokérhálózatok elkülönülésének kialakulása a *vena cardinalis* és a primer nyirokciszterna találkozásánál. **C:** A vérrendszer és a nyirokrendszer sérült elkülönülése a PDPN – CLEC-2 jelpálya károsodása esetén.

A jelátviteli útvonal gátlószerekkel és genetikai módon megvalósított születést követő gátlása során egyaránt megfigyelték, hogy a jelpálya nemcsak a két rendszer embrionális korban megvalósuló elkülönüléséhez szükséges, hanem elengedhetetlen a két keringési rendszer szeparációjának fenntartásához is [113, 119].

1.4.5. A nyirokáramlás szerepe a nyirokerek fejlődési és érési folyamataiban

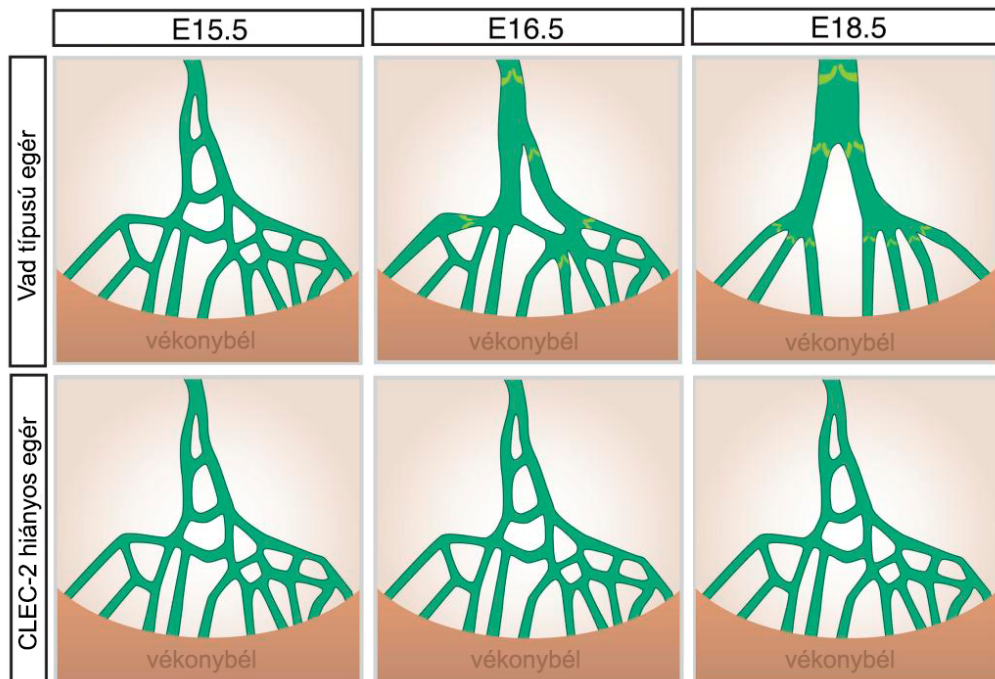
Az értekezésemben korábban ismertetett molekuláris faktorokon túlmenően a megfigyelések szerint a nyirokáramlás keltette mechanikai erők is befolyásolják az endothelsejtek tulajdonságait, valamint a nyirokerek fejlődési és érési folyamatait.

In vitro kísérleti eredmények felvetik, hogy az áramlás keltette mechanikai erők hozzájárulhatnak az endothelsejtek nyirokendothel irányú elköteleződéséhez [120], illetve a nyirokendothelsejtek osztódásához [121], és az áramlás iránya meghatározza a nyirokendothelsejtek alkotta struktúrák növekedési irányát [122]. Ezen túlmenően *in vitro* és *in vivo* kísérleti eredmények alapján a nyirokerekre jellemző áramlás során jelentkező oszcillatorikus nyírófeszültség hatására fokozódik a GATA2, FOXC2 és PROX-1 transzkripció faktorok kifejeződése a nyirokendothelsejtekben, amely faktorok a korábban bemutatott módon hozzájárulnak a nyirokerek érési folyamataihoz [123, 124]. Ezen eredmények alapján felmerül, hogy az áramlás fontos szerepet játszhat a nyirokerek érési folyamatai során. Egyes szervek gyűjtő nyirokereiben a nyirokerek érési folyamatai során intraluminális billentyűk alakulnak ki. A megfigyelések szerint a nyirokérbillentyűk kialakulása a nyirokáramlás intenzitásának emelkedését követően indul meg, és a kialakuló nyirokérbillentyűkben megemelkedik az áramlás-indukálta gének kifejeződése [98, 100]. A megfigyelések alapján a nyirokérbillentyűk jellemzően az erek elágazódásainál alakulnak ki [96, 98], ahol az áramlás lamináris jellege megtörik [125], ami tovább erősíti azt az elméletet, miszerint a nyirokáramlás dinamikája és a nyíróerő jellege döntően befolyásolja a nyirokérbillentyűk kialakulásának helyét.

A piezo-típusú mechanoszenzitív ioncsatorna komponens 1 (PIEZO1, Piezo-Type Mechanosensitive Ion Channel Component 1) nevű mechanoszenzitív ioncsatornát kódoló gén hiánya, illetve funkcióvesztéses mutációja humán vizsgálati eredmények alapján örökletes nyirokódémát eredményez [126, 127]. Egérmodelleken végzett kísérletek során a *Piezol* gén nyirokendothelsejtekben történő sejtvonalspecifikus deléciója esetén a nyirokérbillentyűk fejlődésének zavarát, valamint éretlen struktúrájú mezenteriális nyirokérhálózatot figyeltek meg, amely elváltozások következtében a hasüregben chylus folyadék jelentkezik [128, 129]. Ezen megfigyelések arra utalnak, hogy a nyirokerek érési folyamataiban fontos szerepet játszik a PIEZO1 mechanoszenzitív ioncsatorna. Az állatmodelleken végzett kísérletek alapján egyelőre nem egyértelmű, hogy a nyirokérbillentyűk kialakulásában és nyirokerek érésében fontos szereppel bír FOXC2 és GATA2 fehérjék oszcillatorikus nyíróerő-mediálta fokozott kifejeződése kizárólag a PIEZO1 mechanoszenzitív ioncsatornán keresztül valósul meg, vagy más mechanoszenzitív fehérje is részt vesz a nyirokerek érésében szerepet játszó áramlás-indukálta folyamatok szabályozásában [123, 128].

A korábban bemutatott eredmények szerint a CLEC-2 jelátviteli útvonal fontos szerepet játszik a vérér- és nyirokérhálózatok elkülönülésének kialakulásában és fenntartásában. Az egérmodell vizsgálata során azt tapasztalták, hogy a CLEC-2 hiányos egérembriók mezenteriális nyirokereiben nem figyelhető meg azoknak a géneknek a kifejeződése, amely gének az *in vitro* megfigyelések alapján csak a csak a nyirokáramlásra jellemző nyíróerő jelenlétében fejeződnek ki [123, 124], valamint kimutatták, hogy az egerekben károsodik a nyirokáramlás [123, 130]. Ezen kísérleti eredmények alapján azon egérmodellek, amelyekben sérül a vérér- és nyirokérhálózatok elkülönülésének kialakulása és fenntartása, kiválóan alkalmazhatóak lehetnek a nyirokáramlás a nyirokerek szervspecifikus érésében betöltött szerepének vizsgálatára.

A megfigyelések szerint a CLEC-2 hiányos egerekben a nyirokáramlás károsodása a mezenteriális nyirokérhálózat fejlődésének kezdeti szakaszaiban nem okoz eltérést, azonban elmarad a mezenteriális nyirokerek strukturális átalakulása azok érési folyamata során az E15.5-E18.5 időszakban, aminek következtében az E18.5 korú CLEC-2 hiányos embriókban nem figyelhető meg a vad típusú kontroll embriókban jellemző érett, hierarchiálisan strukturált mezenteriális nyirokérhálózat (5. ábra) [123].



5. ábra: A mezentérium nyirokérhálózatának érési programja vad típusú és károsodott nyirokáramlású CLEC-2 hiányos egértörzsben

(szerkesztett ábra Sweet és mtsai., *J Clin Invest*, 2015 közleménye [123] alapján)

Nemrégiben közölt kísérleti eredmények alapján a CLEC-2 hiányában kialakuló nyirokáramlási zavar következtében a mezenterialis nyirokerek mellett károsodik a tüdő nyirokereinek érési folyamata is [130].

Ezen kísérleti eredmények arra engednek következtetni, hogy a nyirokáramlás fontos szerepet játszhat a nyirokerek szervspecifikus érési folyamatai során.

1.5. A keményagyhártya nyirokérhálózata

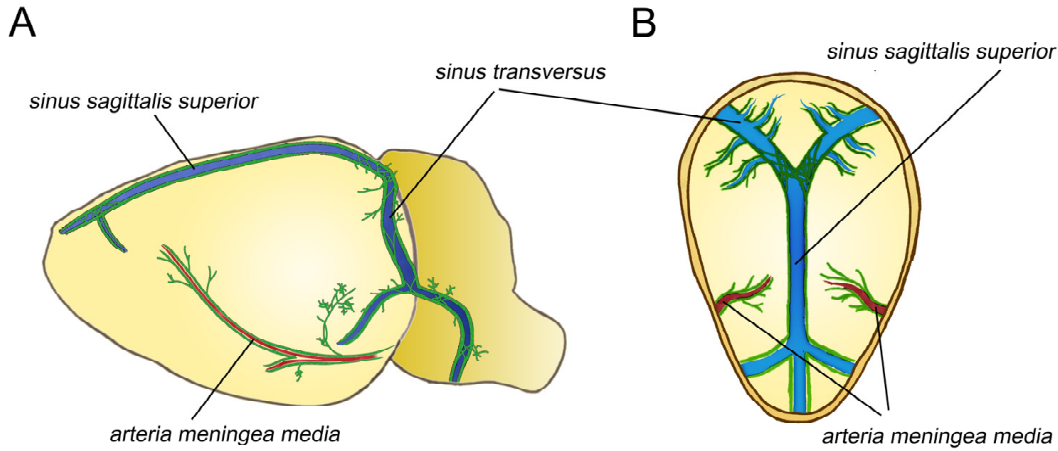
A rendelkezésre álló kísérletes eszközök fejlődése nem csupán a nyirokrendszer felépítésének, fejlődési és érési folyamatainak, valamint általános és szervspecifikus funkcióinak megismerését segítette elő. Az elmúlt időszakban olyan területeken is nyirokereket figyeltek meg – például a keményagyhártyában – amelyekre a közelmúltig általánosan elfogadott nézet szerint nem jellemző a nyirokerek jelenléte [1-3].

1.5.1. A meningeális nyirokerek felfedezése

Annak ellenére, hogy a közelmúltig általánosan elfogadott nézet szerint a központi idegrendszerre nem jellemző a nyirokrendszer jelenléte, egyes tanulmányok felvetették annak lehetőségét, hogy a keményagyhártyában jelen lehetnek nyirokerek. A XVIII. században Paulo Mascagni „*Vasorum lymphaticorum corporis humani historia et ichonographia*” című művében említést tesz nyirokerek jelenlétéről a *dura materben* [131]. Habár megfigyeléseit viaszmodellek segítségével is megörökítette, a keményagyhártyában megfigyelt nyirokérhálózat feledésbe merült [132]. A XX. század második felében olasz, magyar és német kutatók is megfigyeltek nyirokérstruktúrákat a keményagyhártyában [133-135], azonban ezek a felfedezések nem voltak elegendőek ahhoz, hogy megváltoztassák a klasszikus nézetet, amely szerint a központi idegrendszerben nem találhatóak nyirokerek. Az 1990-es években pásztázó elektronmikroszkópos megközelítéssel figyeltek meg nyirokerekhez hasonló érstruktúrákat a keményagyhártyában, amelyekről azonban nem tudták egyértelműen megállapítani, hogy ténylegesen nyirokerek [136].

2015-ben két kutatócsoport fluoreszcens mikroszkópai megközelítés segítségével egymástól függetlenül mutatta ki a meningeális nyirokerek jelenlétét egerekben. [137, 138]. Megfigyeléseik szerint ezen nyirokérstruktúrák jellemzően a vénás szinuszokkal és

nagyobb erekkel párhuzamos lefutást mutatnak (6. ábra). Ezen tanulmányok hatására megváltozott a korábban elfogadott paradigma, amely szerint a központi idegrendszerre nem jellemző a nyirokerek jelenléte.



6. ábra: Az egerek meningeális nyirokérhálózatának sematikus ábrázolása

A: Laterális irányból **B:** Dorzális irányból (zöld: nyirokerek; kék: vénák; piros: artériák)

Későbbi vizsgálatok során megfigyeltek a kisebb vérerek mentén lefutó nyirokereket is a keményagyhártyában [139], valamint az intracranialisan elhelyezkedő meningeális nyirokerekben túlmenően az elmúlt időszakban nyirokerek jelenlétét írták le a gerinccsatorna meningeális kompartmentjében is [140-142]. A meningeális nyirokérhálózat meglétét az elmúlt időszakban megerősítették zebraalakban [143], patkányban [144], főemlősökben és emberben is [138, 145, 146].

1.5.2. A meningeális nyirokérhálózat felépítése

Az egereken végzett kísérletek eredményei alapján a meningeális nyirokerek struktúrájában egyaránt megfigyelhetőek a nyirokkapillárisokra és gyűjtő nyirokerekre jellemző tulajdonságok is. A koponya dorzális részén futó nyirokerekre a nyirokkapillárisokhoz hasonlóan nem jellemző a billentyűk jelenléte [137], valamint falukban nem figyelhető meg simaizom-borítás [138]. A sejtek főleg cipzár-szerű sejtkapcsolatokkal kapcsolódnak egymáshoz, ami azonban inkább a gyűjtő nyirokerekre jellemző [147]. A bazális régió nyirokerei rendelkeznek nyirokérbillentyűkkel [137, 147], valamint nagyobb mértékben jellemző rájuk a gombszerű sejtkapcsolatok jelenléte. A

bazális meningeális nyirokerek esetében a dorzális nyirokerekhez viszonyítva gyakrabban figyelhetőek meg elágazások, illetve a nyirokerek átlagos átmérője is nagyobb. A bazális régió nyirokérhálózatának ezen tulajdonságai a kezdeti gyűjtő nyirokerek esetén megfigyelttekkel mutatnak hasonlóságot [147].

1.5.3. A meningeális nyirokérhálózat élettani és kórélettani szerepe

A meningeális nyirokérhálózat felfedezésével felmerült a kérdés, hogy az újonnan felfedezett nyirokérhálózat milyen módokon járul hozzá a központi idegrendszer élettani és kórélettani folyamataihoz.

1.5.3.1. A központi idegrendszer folyadékháztartásának klasszikus elmélete

A központi idegrendszer élettani működéséhez elengedhetetlenül szükséges az agyszövet intersticiális folyadékának megfelelő megtisztulása, amely funkciót a szervezetben általában a nyirokérrendszer látja el. A klasszikus elgondolás szerint a központi idegrendszerrel összeköttetésben levő nyirokérrendszer híján az agyszövet folyadékháztartása egyedi módon valósul meg. A központi idegrendszer és a nyirokrendszer közötti kapcsolatot elsőként a XIX. század második felében Gustav Schwalbe német anatómus írta le [148]. Ezt követően számos kutatás során megfigyelték, hogy a cerebrospinalis folyadékba (CSF, Cerebrospinal Fluid), illetve az agyszövetbe injektált jelölt molekulák a nyaki régió nyirokcsomóiban jelennek meg [149]. Nyirokérhálózat híján a korabeli megfigyelések szerint a CSF kétféle módon hagyja el a koponyát [149, 150]: a szaglóideg mentén, a nazális mukóza nyirokerein át a nyaki nyirokcsomókba jutva [151-153], valamint az arachnoidréteg villusai közvetítésével, a meningeális szinuszokon keresztül a *vena jugularisba* jutva [154, 155]. A megfigyelések szerint a CSF-elvezetődés közel 30-50%-a a nazális mukóza nyirokereit által valósul meg a nyaki nyirokcsomók irányába, míg a fennmaradó rész az arachnoidréteg villusai révén kerül elvezetődésre [156-159]. Az elmúlt időszakban felmerült, hogy az injektált makromolekulák artériák mentén is eljuthatnak a fej bőr alatti nyirokereikhez [160]. Emellett megfigyelték, hogy az agykamrába injektált jelölt makromolekula hamarabb éri el a nyaki nyirokcsomókat, mint a szisztémás vérkeringést, ami azt valószínűsíti, hogy a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódása nem valósulhat meg a meningeális szinuszokon keresztül [160].

1.5.3.2. A keményagyhártya nyirokereinek szerepe a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódásában

A meningeális nyirokerek létét leíró közlemények egy része szerint a meningeális nyirokérhálózat szerepet játszik az agyszövetbe, illetve *cisterna magna* injektált jelölt makromolekulák felvételében, és a mély nyaki nyirokcsomók irányába történő elvezetődésében [137, 138, 141, 147, 161]. Más kutatási eredmények arra utalnak, hogy a gerincsatorna meningeális nyirokereit szintén részt vehetnek a makromolekulák regionális nyirokcsomók irányába történő elszállításában [162]. Habár ezen megfigyelések alapján a keményagyhártya nyirokérhálózata részt vesz a makromolekulák központi idegrendszerből való felvételében és elszállítódásában, más kutatók azonban nem tudták detektálni a cerebrospinális folyadékba injektált makromolekulák meningeális nyirokereken keresztüli elszállítódását [160, 163, 164]. A jelenleg rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján nem dönthető el egyértelműen, hogy a meningeális nyirokerek részt vesznek-e a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódásában, így ennek megállapítására további kísérletek szükségesek.

1.5.3.3. A keményagyhártya nyirokereinek feltételezett szerepe központi idegrendszert érintő megbetegedésekben

A kísérleti eredmények alapján a meningeális nyirokerek struktúrája a kor előrehaladtával károsodik. Ezen túlmenően mind a keményagyhártya nyirokereinek lokális törlése esetén, mind az idős korú egerek esetében azt figyelték meg, hogy sérül a makromolekulák agyszövetből való elszállítása és ezzel párhuzamosan károsodnak az egerek kognitív funkciói [161]. Ismeretes, hogy a memóriazavarok és kognitív hanyatlás formájában jelentkező Alzheimer-kór neuropatológiai folyamatai során az amiloid- β polipeptidekből álló plakkok és a hiperfoszforilált tau-fehérjékből álló rendezetlen fibrillumok felhalmozódása figyelhető meg a központi idegrendszerben [165]. Ennek alapján felmerült, hogy a meningeális nyirokerek károsodása szerepet játszhat az Alzheimer-kór kórélettani folyamataiban. A kísérleti eredmények alapján a meningeális nyirokerek részt vesznek az amiloid- β plakkok [161, 166] és a tau fehérje [167] központi idegrendszerből való elszállítódásában. Ezen kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a meningeális nyirokerek fontos szerepet tölthetnek be az Alzheimer-kór kórélettani

folyamataiban, ezáltal a megbetegedés gyógyítását megcélzó terápiák potenciális célpontjai lehetnek.

Egy munkacsoport kísérleti eredményei alapján a meningeális nyirokerek fontos szerepet játszanak a leukociták központi idegrendszerből a regionális nyirokcsomókba való elszállításában, valamint aktivációjában, ezáltal meghatározva az immunválasz kialakulását. Felmerült továbbá, hogy a keményagyhártya nyirokérhálózata hozzájárulhat a gyulladással járó neurológiai megbetegedések, mint a szklerózis multiplex, vagy az autoimmun agyvelőgyulladás kórfolyamataihoz [141]. Egy nemrégiben megjelent közlemény ezeken túlmenően felveti annak lehetőségét, hogy a meningeális nyirokerek a leukocitasejtek szállítása révén részt vehetnek az agyi tumorok elleni immunválasz szabályozásában is [168].

A jelenlegi elképzelés szerint tehát a meningeális nyirokérhálózat valószínűsíthetően a perineurális és perivaszkuláris CSF-transzportot kiegészítve részt vesz a központi idegrendszer folyadékgyensúlyának fenntartásában, a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódásában, valamint a leukociták szállítása révén fontos szereplője a központi idegrendszer és az immunrendszer kapcsolatának [169, 170]. Annak megismeréséhez, hogy a keményagyhártya nyirokérhálózata pontosan milyen módon és milyen mértékben vesz részt a fenti folyamatokban azonban még számos további vizsgálat szükséges.

1.5.4. A meningeális nyirokerek fejlődési programja

Ahogy az értekezésem korábbi részeiben bemutatásra került, a szervezet egyes régióit behálózó nyirokerek eredetükben, fejlődésükben, valamint funkciójukban egyaránt igen jelentős eltéréseket mutathatnak. A meningeális nyirokérhálózat élettani és kórélettani folyamatokban betöltött szerepének jobb megértéséhez fontos ismereteket szolgáltatnak azok szervspecifikus fejlődésében és érésében szerepet játszó folyamatok minél részletesebb megismerése. Ezen folyamatok feltérképezésével a fentebb említett központi idegrendszert érintő megbetegedések gyógyítását megcélzó terápiák új potenciális célpontjai is azonosításra kerülhetnek.

A keményagyhártya nyirokereinek fejlődési és érési folyamatairól jelenleg szűkös ismeretekkel rendelkezünk. Az eddigi kísérleti eredmények alapján a meningeális

nyirokérhálózat a korábban bemutatott szisztémás nyirokérfejlődési programtól eltérően, az egerek születését követően alakul ki. A jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján a meningeális nyirokérhálózat a koponya bázisa felől kiindulva, a *sinus transversus* és az *arteria meningea media* mentén fokozatosan terjeszkedve a születést követő második-harmadik hétre éri el a koponya dorzális részét, amelyet követően alakulnak ki a *sinus sagittalis superior* mentén futó nyirokerek. A folyamat eredményeként a születést követő első hónap során alakul ki a felnőtt egerekre jellemző meningeális nyirokérhálózat [140, 171].

A jelenleg rendelkezésre álló tanulmányokban a VEGF-C – VEGFR-3 jelpálya a meningeális nyirokérhálózat fejlődésében betöltött szerepét is vizsgálták. A VEGF-C születéskori deléciója esetén a fiatal felnőtt korú egerek keményagyhártyájának vizsgálatakor azt figyelték meg, hogy az egerekben károsodott a meningeális nyirokerek kialakulása. Ezzel szemben VEGF-D hiányos egereket vizsgálva azt találták, hogy az egerekben nem sérült a keményagyhártya nyirokérhálózatának kialakulása. A VEGFR-3 születéskori deléciója esetén azt figyelték meg a születést követő harmadik hét végén, hogy károsodott a meningeális nyirokerek kialakulása (a VEGF-C kondicionális géntkiűtött egerekben megfigyeltekhez hasonlóan). VEGFR-3 ellen termeltetett antitest újszülött vad típusú egerekbe való injektálása esetén az egerek keményagyhártyájának felnőtt korban való vizsgálatakor szintén azt tapasztalták, hogy az egerekben nem alakulnak ki a meningeális nyirokerek [140]. A VEGFR-3 jelpálya károsodása esetén a kísérleti eredmények szerint nem figyelhető meg az agyszövetbe [137], illetve a *cisterna magna* [140] injektált jelölt makromolekulák elszállítódása a mély nyaki nyirokcsomókba. A rendelkezésre álló eredmények tehát arra utalnak, hogy a VEGFR-3 fehérje a nyirokrendszer embrionális korban megvalósuló szisztémás fejlődési programjában betöltött szerepéhez hasonlóan fontos szerepet játszik a meningeális nyirokérhálózat születést követő időszakban lezajló szervspecifikus fejlődési programjában is. Nem tisztázott azonban az általános nyirokérfejlődési programot meghatározó egyéb mechanizmusok szerepe a meningeális nyirokerek szervspecifikus fejlődési programjában.

Az értekezésemben korábban bemutatott *in vitro* és *in vivo* kísérleti eredmények alapján a nyirokerek fejlődését és érését meghatározó molekuláris faktorokon túlmenően az áramlás keltette mechanikai erők és nyíróerő szintén fontos szerepet tölthetnek be a

nyirokerek szisztémás fejlődési és érési folyamatai során [98, 118, 123, 128-130, 172-175], ami felveti annak lehetőségét, hogy az áramlás keltette mechanikai erők meghatározó jelentőséggel bírhatnak a meningeális nyirokerek szervspecifikus fejlődési és érési folyamataiban is. Erről azonban egyelőre nem áll rendelkezésre kísérletes adat. Az áramlás meningeális nyirokerek fejlődési programjában betöltött szerepének feltérképezésével közelebb kerülhetünk a keményagyhártya nyirokereinek élettani és kórélettani folyamatokban betöltött szerepének megismeréséhez is.

1.6. Hibrid tulajdonságú erek a szervezetben

A korai elgondolások szerint a vérerek és nyirokerek egymástól strukturálisan és molekuláris mintázatukban is jól megkülönböztethető, különálló érhálózatokat alkotnak, és ennek megfelelően a nyirokerek növekedésében szerepet játszó molekulák nem fejeződnek ki a vérerek endothelsejtjeiben. Mai ismereteink szerint azonban a különböző értípusokat alkotó endothelsejtek identitása sokkal heterogénebb, mint korábban gondoltuk [176]. Az elmúlt időszakban – a meningeális nyirokérhálózat felfedezésével szinte párhuzamosan – több érstruktúráról is leírták, hogy egyaránt kifejeznek vérerekre és nyirokerekre jellemző markereket, valamint felmerült, hogy a nyirokérnövekedési jelpályák szerepet játszhatnak ezen hibrid tulajdonságú erek fejlődésében.

1.6.1. A Schlemm-csatorna endothelsejtjei

Az ínhártyában a szaruhártyával párhuzamosan futó, endothelsejtek által bélelt Schlemm-csatorna feladata a csarnokvíz továbbítása a kardiovaszkuláris rendszer irányába, ezáltal meghatározva a cornea és a szemlencse közötti térben uralkodó nyomást [177]. A Schlemm-csatorna bazális membránja nem folytonos, és periciták jellemzően nem figyelhetők meg a környezetében, ezáltal struktúrája hasonlóságot mutat a nyirokkapillárisokkal [178].

A kísérleti eredmények alapján a Schlemm-csatorna sejtjei a születést követő időszakban vérerekből alakulnak ki, azonban fejlődésük során a sejtek a klasszikus angiogenezis folyamatától eltérő módon kifejezik a nyirokendothelsejtek identitásának kialakulásában és fennmaradásában fontos szerepet betöltő PROX-1 transzkripció

faktort, valamint a VEGFR-3 fehérjét és a FOXC2 transzkripciós faktort is – azonban nem figyelhető meg bennük a LYVE-1 és PDPN kifejeződése [179-182].

A kutatási eredmények szerint a Schlemm-csatorna kialakulása során fontos szerepet játszik az elsősorban a vérerek fejlődésében részt vevő angiopoietin és az angiopoietin-1 receptor (TIE-2) [183, 184]. Ezen túlmenően azonban a Schlemm-csatorna fejlődéséhez az endothelsejtjeiben kifejeződő nyirokendothel-specifikus markerek is hozzájárulnak. A kísérleti eredmények alapján a VEGFR-3 aktivációjában szerepet játszó VEGF-C és VEGF-D fehérjék kondicionális deléciója esetén bár kialakul a Schlemm-csatorna, azonban erősen hipopláziás struktúra figyelhető meg. [180]. A megfigyelések alapján a PROX-1 transzkripciós faktor elengedhetetlen a Schlemm-csatorna működéséhez, azonban aktiválódása SOX-18-független módon valósul meg. A vizsgálati eredmények alapján a csarnokvíz áramlása okozta nyíróerő fontos szerepet tölt be abban, hogy a Schlemm-csatorna endothelsejtjein megjelenjenek a PROX-1 és VEGFR-3 markerek [181]. A rendelkezésre álló adatok alapján tehát a Schlemm-csatorna egy egyedi fejlődési programmal rendelkező, szervspecifikus funkciót ellátó hibrid tulajdonságú érstruktúra.

1.6.2. A *vasa recta* felszálló szárának endothelsejtjei

A vese kiválasztó funkciójához és a koncentrált vizelet létrehozásához szükséges medulláris hiperozmolaritás kialakításában elengedhetetlen a Henle-kacsból és a vese gyűjtőcsatornájából visszaszívásra került intersticiális folyadék eliminálása [185]. Az intersticiális folyadék azon részének, amely a periférián nem lép be a vénás rendszerbe, jellemzően a nyirokerek által szállítódik el a vérkeringésbe, azonban a renális medullában nem, vagy csak igen kis számban figyelhető meg nyirokerek [186, 187]. Az intersticiális folyadék vénás rendszerbe történő visszajuttatását a renális medullában megvalósító *vasa recta* felszálló szára vékony, lyukacsos endothelréteggel, valamint fenesztrált bazális membránnal rendelkezik és kevésbé jellemző rá a perivaszkuláris simaizom- és pericitasejtek jelenléte [188, 189], amely tulajdonságok a kezdeti nyirokerekre hasonló struktúrát eredményeznek. A *vasa recta* felszálló ágában az áramlás sebessége jóval alacsonyabb, mint a leszálló ágában [190], ami tovább növeli a nyirokerekkel való hasonlóságukat.

Egy kutatócsoport nemrégiben megjelent közleményében azon felül, hogy kísérletesen bizonyította, hogy *vasa recta* felszálló ága fontos szerepet tölt be az

intersticiális folyadék renális medullából való elszállítódásában, megfigyelte azt is, hogy a *vasa recta* endothelsejtjei a vérérspecifikus markereken felül kifejezik a nyirokerekre jellemző PROX-1 és VEGFR-3 markereket is, azonban a Schlemm-csatorna sejtjeihez hasonlóan nem jellemző rájuk a LYVE-1 és PDPN kifejeződése [191]. A VEGFR-3 és PROX-1 fehérjéknek a Schlemm-csatornában és a *vasa recta* felszálló ágában betöltött szervspecifikus szerepének, valamint az aktiválódásukat kiváltó folyamatok megismeréséhez további kísérletek szükségesek.

1.6.3. A placenta spirális artériái, mint potenciális hibrid tulajdonságú erek

A placenta anyai oldalán található spirális artériák kanyarulatós vérerek, amelyek feladata az anyai vér szállítása a placenta anyai oldala felől a magzati oldal irányába, ezáltal biztosítva a magzat oxigén- és tápanyagellátását. Ahhoz, hogy a spirális artériák a terhesség során végig biztosítani tudják a fejlődő magzat folyamatosan növekvő tápanyag- és oxigénszükségletét, a terhesség középső szakaszában az eredetileg simaizom-borítással és bazális membránnal rendelkező spirális artériák és a környező extracelluláris mátrix strukturális átalakuláson mennek keresztül. Ezen folyamat során a megnövekedett vérellátás biztosítása érdekében megnő az erek átmérője, fokozódik az endothelsejtek sejtosztódása, csökken az ereket borító simaizom és bazális membrán mértéke, valamint az erek endothelrétegébe endovaszkuláris trophoblasztsejtek befűződése figyelhető meg [192-196]. A spirális artériák strukturális átalakulása az emberi várandósság első trimeszterében, illetve a második trimeszter kezdetén [192, 193], míg egerekben a gesztációs periódus 10.5 és 14.5 napja (GD10.5 – GD14.5) közötti időszakban valósul meg [197]. Jelenleg nem ismertek pontosan a spirális artériák strukturális átalakulását szabályozó folyamatok, és a strukturális átalakulás elmaradásához vezető mechanizmusok [193]. Mindazonáltal a spirális artériák endotheliumába beágyazódó trophoblasztsejtek és az uterinális természetes ölüsejtek feltételezhetően fontos szerepet játszanak a spirális artériák strukturális átalakulása során [198-200].

A humán várandósságok 3-5%-ában preeclampsia alakul ki. A humán preeclampsia a várandósság 20. hetét követően *de novo* kialakuló magas vérnyomás, ami mellé társulhat proteinuria, akut anyai veseelégtelenség, májelégtelenség, neurológiai tünetek, hemolízis, thrombocytopenia, valamint a magzati növekedés károsodása. Ezen hatások

következtében mind az anyára, mind a magzatra nézve veszélyt hordoz a preeclampsia [192, 201-203]. Több megfigyelés is megerősíti, hogy a spirális artériák strukturális átalakulásának károsodása esetén nagyobb valószínűséggel alakul ki preeclampsia, azonban a spirális artériák strukturális átalakulásának hiánya nem minden esetben okoz magas vérnyomást és proteinuriát [192, 193]. Jelenleg nem ismert a preeclampsia kialakulásának pontos háttere, ennek következtében nem állnak rendelkezésre olyan vizsgálatok és biomarkerek, amelyek alkalmasak a preeclampsia kockázatának megbízható vizsgálatára [192, 193, 203]. A preeclampsiahoz vezető folyamatok feltérképezése révén azonosíthatóak olyan molekulák, amelyek potenciális biomarkerei, valamint terápiás célpontjai lehetnek a preeclampsia számára.

Habár a megfigyelések szerint a placentára nem jellemző a klasszikus nyirokrendszer jelenléte [204-206], egy nemrégiben közzétett tanulmány eredményei alapján a humán placenták spirális artériáinak endothelsejtjei, valamint az endotheliumba befűződő trophoblasztsejtek egyaránt kifejezik a VEGFR-3 fehérjét [207]. A humán trophoblasztsejtek ráadásul a megfigyelések szerint a VEGFR-3-on túlmenően kifejezik a VEGF-C fehérjét is az első trimeszter során, és a VEGF-C VEGFR-3-hoz való kötődésének gátlása esetén csökken a trophoblasztsejtek endotheliumba való beágyazódásának mértéke [208], ami a humán spirális artériák strukturális átalakulásának egyik lépése [196, 199]. Ezen túlmenően humán és egérmodellen végzett vizsgálatok során azt találták, hogy a terhesség kezdeti szakaszában a deciduális leukocita-populáció jelentős részét alkotó, és a spirális artériák strukturális átalakulásában fontos szerepet betöltő uterinális természetes ölősejtek (uNK, Uterine Natural Killer Cells) [200, 209] a klasszikus nyirokérfejlődésben szerepet játszó VEGF-C-t, valamint a vérér- és nyirokérfejlődésben egyaránt fontos funkcióval rendelkező angiopietineket és ephrineket is kifejezik [210-212], amely molekuláris faktorok feltételezhetően szerepet játszanak a spirális artériák strukturális átalakulásában [213].

Ezen eredmények alapján felmerül, hogy a spirális artériák az előzőekben bemutatott erekhez hasonlóan hibrid molekuláris mintázattal rendelkezhetnek, másrészt pedig felvetik a VEGFR-3 jelpálya szerepét a spirális artériák strukturális átalakulása során.

2. Célkitűzések

A bemutatott irodalmi adatok alapján jelenleg nem dönthető el egyértelműen, hogy a meningeális nyirokerek részt vesznek-e a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódásában. Nem tisztázott továbbá a VEGF-C – VEGFR-3 jelátviteli útvonalon túlmenően az általános nyirokérfejlődési programot meghatározó egyéb mechanizmusok, így az áramlás szerepe a keményagyhártya nyirokereinek szervspecifikus fejlődési programjában. A meningeális nyirokerek funkciói, valamint a fejlődési programjukat meghatározó folyamatok feltérképezésével közelebb kerülhetünk a keményagyhártya nyirokereinek élettani és kórélettani folyamatokban betöltött szerepének megismeréséhez.

Ezen túlmenően jelenleg nem ismertek a placenta spirális artériáinak strukturális átalakulását meghatározó folyamatok, valamint a preeclampsia kialakulásának pontos háttere. Az irodalmi adatok alapján felmerül, hogy a spirális artériák hibrid molekuláris mintázattal rendelkezhetnek, és hogy a VEGFR-3 nyirokérnövekedési jelpálya szerepet játszhat a strukturális átalakulásuk során. A VEGFR-3 jelpálya spirális artériák strukturális átalakulásában betöltött szerepének megismerésével közelebb kerülhetünk a folyamatot meghatározó mechanizmusok megértéséhez, valamint eredményeink hozzájárulhatnak a preeclampsia potenciális biomarkereinek, illetve terápiás célpontjainak azonosításához.

Kísérleteink során célul tűztük ki, hogy jellemezzük a nyirokerek fejlődését irányító mechanizmusok szerepét a keményagyhártyában, valamint a placenta spirális artériáinak strukturális átalakulása során.

Vizsgáltuk:

1. A keményagyhártya nyirokérhálózatának szerepét a központi idegrendszerbe injektált makromolekulák elszállítódásában.
2. A meningeális nyirokérhálózat fejlődési folyamatait.
3. Az áramlás szerepét a meningeális nyirokerek szervspecifikus növekedési programjában.
4. A VEGFR-3 jelátviteli útvonal szerepét a placenta spirális artériáinak strukturális átalakulása során.

3. Módszerek

3.1. Munkánk során használt kísérleti állatok

Kísérleteink során különböző korú hím és nőstény C57BL/6 vad típusú egerek mellett *Prox1^{GFP}* [214] és *Flt4^{YFP}* [215] nyirokendothel-specifikus riporter egértörzseket használtunk, amelyekben a fluoreszcens riporterfehérje [zöld fluoreszcens fehérje (GFP, Green Fluorescent Protein), illetve sárga fluoreszcens fehérje (YFP, Yellow Fluorescent Protein)] átíródását nyirokendothel-specifikus kifejeződést mutató gének (*Prox1*, illetve *Flt4*) promótere hajtja. A C57BL/6 vad típusú egereket kereskedelmi forrásokból, a *Prox1^{GFP}* egértörzset pedig a Mutant Mouse Regional Resource Centers-től szereztük be. Az *Flt4^{YFP}* egértörzset Jean-Léon Thomas (Yale School of Medicine, New Haven, Connecticut, Amerikai Egyesült Államok) bocsátotta rendelkezésünkre.

Az áramlás szerepét a nyirokerek fejlődési folyamataiban és a makromolekulák elszállítódásában *Plcγ2^{-/-}* egértörzs [106] segítségével vizsgáltuk. A *Plcγ2^{-/-}* egértörzset James Ihle (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, Amerikai Egyesült Államok) bocsátotta rendelkezésünkre. A nyirokér-riporter egértörzseket és a *Plcγ2^{-/-}* egértörzset C57BL/6 genetikai háttéren, heterozigóta formában tartottuk fenn és transzgen-specifikus polimeráz láncreakció (PCR, Polymerase Chain Reaction) segítségével genotipizáltuk. A *Plcγ2^{-/-}* egereket *Plcγ2^{+/+}*, valamint *Plcγ2^{+/-}* testvérkontroll egerekkel hasonlítottuk össze.

A VEGFR-3 jelátviteli útvonal spirális artériák strukturális átalakulásában betöltött szerepének vizsgálatára *Flt4^{kd/+}* egértörzset alkalmaztuk. Az *Flt4^{kd}* allél esetében a VEGFR-3 fehérjét kódoló *Flt4* gén tirozin kináz domént kódoló szakaszán található pontmutáció eredményeként a gátlódik a receptor tirozin kináz aktivitása (úgynevezett „kinase-dead” fenotípus, amelyből ered az allél rövidítése: kd) [216]. Az *Flt4^{kd/+}* egértörzset NMRI genetikai háttéren tartottuk fenn, és allél-specifikus PCR-t követően *Bacillus globigii* restriktív endonukleáz II (BglII, Type II Restriction Endonuclease of *Bacillus globigii*) enzimmel való emésztés segítségével genotipizáltuk. A placenták és embriók generálásához időzített vemhességeket hoztunk létre, amelyek során *Flt4^{kd/+}* és kontroll vad típusú NMRI nőstényeket vad típusú NMRI hímekkel pároztattunk. Az időzített vemhességek során a vaginális plug megjelenését reggel 8 órakor ellenőriztük,

és a vaginális plug megjelenésének reggelét tekintettük GD0.5 időpontnak. A placenták és embriók izolálásához az *Flt4^{kd/+}* és testvérkontroll *Flt4^{+/+}* nőtényeket GD11.5, GD13.5, illetve GD18.5 időpontban áldoztuk fel.

A kísérleti állatokat meghatározott kórokozóktól mentes (SPF, Specific Pathogen-free), illetve konvencionális állatházban tartottuk 12-12 órás fény/sötétség ciklusokkal. Az egereket normál táppal, *ad libitum* tápláltuk. Az értekezésemben bemutatott állatkísérletek a Semmelweis Egyetem Állatjóléti Bizottsága és a Pest Megyei Kormányhivatal által elfogadásra kerültek.

3.2. Szövetek kimetszése és fixálása

3.2.1. Keményagyhártya kimetszése

A meningeális nyirokerek fejlődési programjának jellemzéséhez különböző korú vad típusú, nyirokér-riporter, valamint *Plcy2^{-/-}* és testvérkontroll egereket használtunk fel újszülött (P0) és 21 napos (P21, Postnatal Day 21) időpontok között. A keményagyhártyák izolálását az Antonie Louveau és Jonathan Kipnis által leírt preparálási protokoll alapján végeztük [138, 217]. P8 korú, illetve idősebb egerek esetében az egereket 2,5%-os Avertin (Sigma-Aldrich, T48402) oldattal való altatást követően 10 ml foszfátpufferelt sóoldattal (PBS, Phosphate Buffered Saline), majd 10 ml 4%-os paraformaldehid-oldattal (PFA, Paraformaldehyde) transzkardiálisan perfundáltuk. A P0 és P8 kor közötti egerek esetében a transzkardiális perfúziót 5 ml PBS és 5 ml 4%-os PFA oldattal végeztük. A perfúziót követően az állatokat dekapitáltuk, majd olló és csipeszek segítségével eltávolítottuk a fejbőrt, a koponyán tapadó izmokat, a szemgolyókat és a látóidegeket. Ezt követően olló segítségével átmetsztük és eltávolítottuk a járomcsontokat, az állkapocscsontot, valamint a rágóizmokat. Következő lépésként transzverzális irányban átmetsztük az orrcsontot, majd a koponyát a pikkelyvarrat mentén körbemetszve eltávolítottuk a koponya bázisát és az agyszövetet.

Kísérleteinkben a keményagyhártyát a koponya belső felszínéhez tapadva vizsgáltuk. A megközelítés előnye, hogy a keményagyhártya nem sérül az eljárás során, és megőrzi térbeli anatómiai struktúráját. Hátránya, hogy a koponya optikai tulajdonságaiból adódóan a képalkotás során nagyobb háttérjel tapasztalható, ami megnehezíti a fluoreszcens képalkotást. A koponya belső felszínén elhelyezkedő keményagyhártyát

4%-os PFA oldatban egy éjszakán keresztül 4°C hőmérsékleten inkubáltuk, majd három lépésben PBS oldatban mostuk.

3.2.2. Nyirokcsomók kimetszése

A nyirokcsomók szövettani elemzésére az egerek különböző régiókban található nyirokcsomóinak (felszíni nyaki, mély nyaki, inguinális, popliteális, mezenterialis nyirokcsomók) kimetszését követően 4%-os PFA oldatban egy éjszakán keresztül 4°C hőmérsékleten inkubáltuk, majd három lépésben PBS oldatban mostuk, amelyet követően a nyirokcsomókat szövettani eljárásban használtuk fel.

3.3. Alkalmazott szövettani eljárások és festések

3.3.1. Izolált szövetek dehidrációja, paraffinba ágyazása és metszése

Az izolált szövetmintákat fixálást követően felszálló alkoholsorban dehidráltuk (2 óra inkubáció 50%-os etanolban, 4 óra inkubáció 70%-os etanolban, éjszakán keresztüli inkubáció 95%-os etanolban, 8 óra inkubáció abszolút etanolban) 4°C hőmérsékleten, majd 2x10 percig szobahőmérsékleten xilolban tartottuk, amelyet követően 3x1 órán át 65°C hőmérsékleten paraffinban inkubáltuk. Ezt követően a szöveteket paraffinba (Leica) ágyasztuk Leica EG1150 szövettani beágyazókészülék segítségével. A beágyazást követően a paraffinblokkokat -20°C hőmérsékleten tartottuk egy éjszakán keresztül, majd a szöveteket tartalmazó paraffinblokkból Thermo Scientific HM340E mikrotóm segítségével 7 µm vastagságú metszeteket készítettünk.

A szövettani metszeteket ezt követően hematoxilin-eozin (HE, Hematoxylin-eosin) (Leica) alapú rutin szövettani festéssel, vagy fluoreszcens immunhisztokémiai eljárással festettük.

3.3.2. Szövettani metszetek festése fluoreszcens immunhisztokémiai és rutin hematoxilin-eozin festési eljárással

A szövettani metszetek fluoreszcens immunhisztokémiai festését a korábbiakban leírt immunfestési protokoll alapján [43] végeztük. A metszeteket először 48 órán keresztül 45°C hőmérsékleten tartottuk, majd 10% kecske- vagy lószérumot (Gibco life

Technologies, 16210-064; 16050-130), és 0,5% Tween-20 reagenst (Sigma-Aldrich, P1379) tartalmazó PBS oldatban szobahőmérsékleten inkubáltuk 1 órán keresztül. A mintákat ezt követően 24 órán keresztül 4°C hőmérsékleten inkubáltuk 1:50 arányban elsődleges antitestet és 0,1% arányban Tween-20 reagenst tartalmazó PBS oldatban. Kísérleteink során a következő fehérjék ellen termeltetett elsődleges antitest oldatokat alkalmaztuk: TER-119 vörösvértest-marker (R&D Systems, MAB1125) VEGFR-3 (R&D Systems, AF349), α -simaizomaktin (α -SMA, α -Smooth Muscle Actin) (Sigma-Aldrich, 1A4 klón), foszforilált extracellulárisan szabályozott mitogén-aktivált fehérje kináz (p-ERK, Extracellular Regulated Mitogen-activated Protein Kinase) (Cell Signaling Technology, 4370). Az inkubációs idő leteltével a mintákat háromszor mostuk 0,1% Tween-20 reagenst tartalmazó PBS-sel, majd 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk 1:250 arányban másodlagos antitestet, és 0,1% Tween-20 reagenst tartalmazó PBS oldatban. Kísérleteink során az alábbi másodlagos antitest oldatokat alkalmaztuk: kecskében vagy szamárban termeltetett, az egyes elsődleges antitest oldatnak megfelelően patkány, kecske, nyúl, vagy egér antigéneket felismerő, Alexa Fluor 488, Cianin fluorofor 2 (Cy2 Cyanine Dye 2), Cy3, vagy Cy5 fluoroforral konjugált immunglobulin G (IgG, Immunoglobulin G) antitest oldatok (Life Technologies A11006, Jackson ImmunoResearch 715-225-150, 711-165-152, 705-175-147). Az inkubációs idő leteltével a metszeteket háromszor mostuk 0,1% Tween-20 reagenst tartalmazó PBS-sel, majd 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 4',6 diamidino-2-phenylindole) tartalmú fedőoldattal (Vector Laboratories, H-1200) fedtük. A DAPI egy fluoreszcens tulajdonságú festőmolekula, ami erősen kötődik a DNS-szálhoz, ezáltal alkalmas a dezoxiribonukleinsav (DNS, Deoxyribonucleic Acid) és a DNS-t nagy mennyiségben tartalmazó sejtmagok láthatóvá tételére [218]. A metszeteket a fluoreszcens immunfestési eljárást követően -20°C hőmérsékleten tároltuk.

A metszetek rutin HE festését az általánosan alkalmazott protokoll szerint végeztük [219], majd a metszeteket szobahőmérsékleten tároltuk.

A rutin- és fluoreszcens immunhisztokémiai festési eljárással kezelt szövettani metszeteket Nikon Ni-U fordított állású mikroszkóppal (Nikon Instruments) vizsgáltuk. A mikroszkópos képek elkészítéséhez Nikon DS-Ri2 kamerát használtunk.

3.4. A keményagyhártya-minták festése teljes szöveti (whole mount) immunfestési eljárással

A teljes szöveti immunfestés során az agyhártyamintákat 10% kecske- vagy lószérumot tartalmazó PBS-ben 1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően a mintákat elsődleges antitesteket tartalmazó PBS oldatban 24 órán keresztül 4°C hőmérsékleten tartottuk. Az elsődleges ellenanyaggal való immunfestési lépés során használt PBS oldat 1:170 arányban tartalmazta az egyes antigének ellen termeltetett antitest oldatokat, 10%-ban tartalmazott ló- vagy kecskeszérumot, valamint 0,1%-ban tartalmazott Tween-20 reagenst. Kísérleteink során a következő molekuláris markerek ellen termeltetett elsődleges antitest oldatokat alkalmaztuk: LYVE-1 (R&D Systems, AF2125), PROX-1 (Abcam, AB76696), PDPN (Abcam, ab92319), vérlemezke- és endothelsejt adhéziós molekula (PECAM, Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule) (R&D Systems, MAB3628), epidermális növekedési faktor-szerű egységet tartalmazó mucin-szerű hormonreceptor-szerű fehérje 1 (F4/80, Epidermal growth factor-like Module-containing Mucin-like Hormone Receptor-like Protein 1) (BioLegend, 123101). Egyes kísérleteinkben a *Prox1^{GFP}* és *Flt4^{YFP}* nyirokér-riporter egértörzsekből származó mintákban a nyirokendothelsejtek által kifejezett GFP és YFP fehérjék natív fluoreszcens jelének felerősítésére GFP fehérje ellen termeltetett elsődleges antitestoldatot (Life Technologies, A11122) alkalmaztunk, ami a GFP és YFP fehérjék közötti hasonlóságból fakadóan specifikusan kötődik a GFP és YFP fehérjékhez egyaránt. Az elsődleges antitestoldattal való inkubációt követően a mintákat 3-szor PBS-sel mostuk, majd másodlagos antitesteket tartalmazó oldatban 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintákat. A másodlagos ellenanyaggal való immunfestési lépés során használt PBS oldat 1:1000 arányban tartalmazta kecskében vagy szamárbán termeltetett, az egyes elsődleges antitest oldatnak megfelelően nyúl, kecske, patkány, vagy szíriai aranyhőrcsög antigéneket felismerő, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 568, vagy Alexa Fluor 594 fluoroforral konjugált IgG antitest oldatot (Life Technologies, A21206; A11055; A11057; A11006; A11077; A21113), továbbá 2%-ban tartalmazott ló- vagy kecskeszérumot, és 0,1%-ban Tween-20 reagenst. A másodlagos antitestoldattal való inkubációt követően a mintákat 3-szor PBS oldatban mostuk, majd a mintákat 4°C hőmérsékleten PBS-ben tároltuk.

Annak vizsgálatára, hogy az egyes markerekre nézve pozitív sejtek ténylegesen nyirokendothelsejtek-e, kettős immunfestést alkalmaztunk, és a kettős pozitív sejteket tekintettük nyirokendothelsejteknek.

A teljes szöveti mintákat Nikon DS-Ri2 kamerához csatlakoztatott Nikon SMZ-25 sztereomikroszkóp segítségével, illetve Yokogawa CSU-W1 konfokális egységhez csatlakoztatott Nikon Eclipse Ti2 mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.5. A nyirokérfunkció jellemzésére alkalmazott kísérletes eljárások

A nyirokerek specifikusan a nagy molekulatömegű [40 kilodalton (kDa) és nagyobb] molekulák elszállításában vesznek részt, az ennél kisebb molekulák felvétele és elszállítódása megtörténhet a vérerek által is [220]. A nyirokáramlás vizsgálatának széles körben alkalmazott módszere a fluoreszcensen jelölt makromolekulák nyirokerek általi eliminációjának és a nyirokcsomókba való elszállításának vizsgálata. Az eljárás kiválóan alkalmazható a nyirokérfunkció jellemzésére, a CLEC-2 hiányos egerek, valamint a keményagyhártya nyirokereinek funkcionális jellemzésére során is használták ezen megközelítéseket [123, 130, 137, 138, 140, 141, 147, 161, 220]. Kísérleteink során a nyirokerek funkcióját fluoreszcensen jelölt makromolekulák és lipidek injektálásával, és a molekulák elszállítódásának követésével jellemeztük a következőkben részletezett módokon.

3.5.1. A nyirokérfunkció jellemzése a vékonybélben

A nyirokérfunkció vékonybélben való jellemzésére *Plcγ2^{-/-}* és testvérkontroll egerektől egy éjszakan keresztül megvontuk a táplálékot, majd az egereket 100 μl napraforgóolajban (Sigma-Aldrich, S5007) 1:250 arányban feloldott jelölt lipiddel [4,4-Difluoro-5,7-Dimetil-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacén-3-Hexadekánsavat (BODIPY C16, 4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Hexadecanoic Acid)] (Thermo Fisher, D3821) etettük meg. A kísérleti egereket két órával később feláldoztuk, majd fluoreszcens sztereomikroszkópia segítségével követtük a jelölt lipidek vékonybél nyirokereit által megvalósuló felvételét és elszállítódását.

3.5.2. A nyirokérfunkció követése a hátsó végtagban

A nyirokérfunkció hátsó végtagban való követésére 2,5 µl 10 mg/ml koncentrációjú 70 kDa molekulatömegű rhodamin dextrán (RhD, Rhodamine dextran) oldatot injektáltunk fiatal felnőtt (21-32 napos korú) *Plcγ2^{-/-}* és testvérkontroll egerek talpbőrébe az állatok hátsó végtagján. A kísérleti állatokat az injektálást követően 100 perccel termináltuk, és a bőr eltávolítását követően fluoreszcens sztereomikroszkópia segítségével követtük a jelölt makromolekulák nyirokerek által megvalósuló elszállítódását a popliteális nyirokcsomó irányába.

3.5.3. A meningeális nyirokérfunkció jellemzése

Kísérleteink során többféle molekulásúlyú makromolekulával is jellemezni szeretnénk volna a keményagyhártya nyirokereinek funkcióját. Ezen kísérleteink során a következő oldatokat alkalmaztuk:

- 70 kDa molekulatömegű rhodamin dextrán (Life Technologies, D1818)
- 40 kDa molekulatömegű rhodamin dextrán (Life Technologies, D1842)
- 3 kDa molekulatömegű rhodamin dextrán (Life Technologies, D3308)
- PBS

Az oldatok 2,5 µl térfogatban kerültek injektálásra 2,5%-os Avertin oldattal altatott kísérleti egerek agyszövetébe, vagy cerebroszpinális folyadékába. A jelölt molekulákat 10 mg/ml-es koncentrációjú oldatként injektáltuk. Kísérleteinkben a 3 kDa molekulatömegű fluoreszcensen jelölt dextrán injektálását kontroll kísérletként végeztük el, tekintettel arra, hogy felvétele és elszállítódása megvalósul a vérerek által is. Annak vizsgálatára, hogy a nyaki nyirokcsomókban megjelenő jel mennyire specifikus, további kontroll kísérletként az agyszövetbe való injektálás helyén 70 kDa molekulatömegű rhodamin dextránt injektáltunk szubkután.

Az agyszövetbe való injektálás során a fejbőrön ollóval sagittalis irányú bemetszést ejtettünk a *sutura sagittalis* felett. A bregmától laterális irányban a koponyát átszúrva Hamilton-fecskendő segítségével lassan injektáltuk a jelölt makromolekulákat, vagy PBS oldatot ~2 mm mélységben. Az injektátum szivárgását elkerülendő a tűt az injektálást követően 5 perccel, lassú, óvatos mozdulattal távolítottuk el.

A cerebroszpinális folyadékba való injektáláshoz a nyakbőrön ollóval sagittális irányú bemetszést ejtettünk a cervikális szegmentben a dorzális oldalon, majd az izmok tompa preparálással való szétválasztását követően 70 kDa molekulásúlyú rhodamin dextrán-oldatot injektáltunk a *cisterna magna*-ba. Az injektátum szivárgását elkerülendő a tűt az injektálást követően 5 perccel lassú, óvatos mozdulattal távolítottuk el. Az injektálást követően az egereket 100 percig altatásban tartottuk, majd a kísérleti állatokat termináltuk, és vizsgáltuk a jelölt molekulák a nyaki nyirokcsomók irányába történő elvezetődését.

Annak vizsgálatára, hogy a központi idegrendszerbe injektált makromolekulák a meningeális nyirokerek közvetítésével jutnak-e el a nyaki nyirokcsomókba, 70 kDa molekulatömegű rhodaminnal jelölt dextránt injektáltunk fiatal felnőtt (21-32 napos korú) vad típusú, illetve *Flt4^{YFP}* nyirokendothel-specifikus riporteregekre agyszövetébe, majd az injektálást követően 100 perccel termináltuk a kísérleti egereket. Ezt követően a keményagyhártya izolálását és fixációját követően nyirokendothelmarker (LYVE-1), illetve GFP elleni teljes szöveti immunfestés alkalmazásával tettük láthatóvá a meningeális nyirokereket, és vizsgáltuk a jelölt makromolekulák és nyirokerek egymáshoz viszonyított elhelyezkedését a keményagyhártyában.

Annak jellemzésére, hogy a makromolekulák milyen mértékben szállíthatók el a központi idegrendszerből a nyaki nyirokcsomókba a különböző korú egereken, a 70 kDa rhodamin dextrán agyszövetbe való injektálását különböző korú nyirokér-riporter egereken végeztük el P0 és P21 időpontok között.

Annak megállapítására, hogy a nyirokáramlás hiánya hogyan befolyásolja a makromolekulák központi idegrendszerből a nyaki nyirokcsomók irányába történő elszállítását, 70 kDa rhodamin dextrán agyszövetbe és *cisterna magna*-ba történő injektálását végeztük el fiatal felnőtt *Plcy2^{-/-}* és vad típusú testvérkontroll egereken.

Az injektálás minőségét a kísérletek során szigorúan ellenőriztük. A nem megfelelő minőségű injektálás esetén az adott kísérlet eredményeit nem vettük figyelembe.

A nyirokér-funkció jellemzésére használt jelölt lipidek és makromolekulák elvezetődését Nikon DS-Ri2 kamerához csatlakoztatott Nikon SMZ-25 sztereomikroszkóp segítségével követtük. A nyirokcsomókba eljutott jelölt molekulák mennyiségi jellemzésére a nyirokcsomókban mérhető átlagos fluoreszcens jelintenzitását

(MFI, Mean Fluorescent Intensity) használtuk, melyhez a következő képletet alkalmaztuk:

$$MFI = MFI_{nyirokcsomó} - MFI_{háttér}$$

ahol MFI jelöli az adott mérési területen mért átlagos fluoreszcens jelintenzitás mértékét. Az egyes területek átlagos fluoreszcens jelintenzitásának meghatározásához a NIS Elements szoftvert alkalmaztuk.

3.6. A PLC γ 2 hiányos egerekben megfigyelt fenotípus kvantitatív jellemzése

3.6.1. A vérerek és nyirokerek károsodott elkülönülésének követése a vékonybélben

Annak jellemzésére, hogy a vérerek és nyirokerek elkülönülése milyen mértékben károsodik a PLC γ 2 hiányos egerekben, egy 0-4 pontig terjedő pontozási rendszert hoztunk létre, melyben figyelembe vettük az alábbi paramétereket:

- Vér megjelenése a vékonybél falának nyirokereiben
- Vér megjelenése a mezenterialis nyirokerekben
- Abnormális struktúrát mutató nyirokérhálózat a vékonybél falában
- Abnormális struktúrát mutató mezenterialis nyirokérhálózat

Minden egyes paraméter esetén 1 pontot adtunk, amennyiben megfigyelhető volt az adott elváltozás az egérben, és 0 pontot adtunk az egyes paraméterekre, amennyiben nem volt megfigyelhető az adott elváltozás. A négy pontszám számtani összegét tekintettük az adott egér vékonybélben a vérér- és nyirokérhálózatok elkülönülésének zavarát jellemző pontszámnak.

3.6.2. A nyirokcsomók vérrel való kitöltöttségének jellemzése

Az irodalmi adatok alapján a vérerek és nyirokerek elkülönülésében szerepet játszó PDPN – CLEC-2 jelpálya születést követő károsodása esetén a nyirokerek vérrel való kitöltöttségén túlmenően a nyirokcsomók is vérrel kitöltötté válhatnak [104, 113, 119, 221-223]. A nyirokcsomókban megjelenő vér megváltoztathatja a nyirokcsomók hemodinamikai tulajdonságait, ami hatással lehet arra, hogy milyen mértékű elvezetést detektálunk az injektálás helyének megfelelő regionális nyirokcsomóban. Ezért egy 0-4

pontig terjedő pontozási rendszert hoztunk létre annak jellemzésére, hogy a PLC γ 2 hiányos egerek nyirokcsomóiban milyen mértékben jelenik meg vér a vérér- és nyirokérhálózatok elkülönülésének zavara következtében. A pontozási rendszerben külön pontoztuk a *Plc γ 2^{-/-}* és testvérkontroll egerek mezenteriális, inguinális, felszíni nyaki és mély nyaki nyirokcsomóinak vérrel való kitöltöttségét az alábbiak szerint: 0 pont: nem figyelhető meg vér az adott nyirokcsomóban; 4 pont: a nyirokcsomó teljes mértékben vérrel kitöltött.

3.6.3. A meningeális nyirokérhálózat strukturális jellemzése

A meningeális nyirokérhálózat kvantitatív jellemzését kétféle megközelítéssel végeztük. Egyrészt létrehoztunk egy 0-15 pontig terjedő pontozási rendszert, amelyben figyelembe vettük a meningeális nyirokerek folytonosságát, a meningeális nyirokérhálózat strukturális érintetlenségét, a nyirokerek jelenlétét a *sinus sagittalis superior*, *sinus transversus* és *arteria meningea media* mentén, valamint a meningeális nyirokérhálózatban megfigyelhető elágazások számát a következők szerint:

- a meningeális nyirokerek folytonossága: 0-4 pont; 0 pont: nem figyelhetőek meg folytonos nyirokérstruktúrák; 4 pont: az összes megfigyelhető nyirokérstruktúra folytonos lefutást mutat
- a meningeális nyirokérhálózat strukturális érintetlensége: 0-3 pont; 0 pont: nagyszámban előforduló súlyos strukturális deformitás; 3 pont: ép nyirokérstruktúrák
- a nyirokerek jelenléte a *sinus sagittalis superior* mentén: 0-2 pont; 0 pont: nem figyelhető meg nyirokér a *sinus sagittalis superior* mentén; 1 pont: nyirokerek figyelhetőek meg a *sinus sagittalis superior* egyik oldalán; 2 pont: nyirokerek figyelhetőek meg a *sinus sagittalis superior* mindkét oldalán
- a nyirokerek jelenléte a *sinus transversus* mentén: 0-2 pont; 0 pont: nem figyelhető meg nyirokér a *sinus transversus* mentén; 1 pont: nyirokerek figyelhetőek meg a *sinus transversus* mentén a koponya egyik oldalán; 2 pont: nyirokerek figyelhetőek meg a *sinus transversus* mentén a koponya mindkét oldalán
- a nyirokerek jelenléte az *arteria meningea media* mentén: 0-2 pont; 0 pont: nem figyelhető meg nyirokér az *arteria meningea media* mentén; 1 pont:

nyirokerek figyelhetőek meg az *arteria meningeae media* mentén a koponya egyik oldalán; 2 pont: nyirokerek figyelhetőek meg az *arteria meningeae media* mentén a koponya mindkét oldalán

- a nyirokerek elágazódásának mértéke: 0-2 pont; 0 pont: nem figyelhetőek meg nyirokérelágazások, vagy legfeljebb 3 elágazás látható; 1 pont: 3-10 elágazás detektálható; 2 pont: 10-nél több elágazás detektálható

Az egyes paraméterekre kapott pontszámok számtani összegét tekintettük az adott egér meningeális nyirokérhálózatát jellemző pontszámnak.

A keményagyhártya nyirokérhálózatát ezen túlmenően a meningeális kompartmentben megfigyelhető nyirokerek összhosszúságának mérésével jellemeztük, amelyhez a NIS Elements szoftvert alkalmaztuk.

3.7. A spirális artériák strukturális átalakulása során lezajló folyamatok jellemzése

Annak vizsgálatára, hogy az *Flt4^{kd/+}* nőtényekben károsodik-e a spirális artériák strukturális átalakulása, időzített vemhességeket hoztunk létre vad típusú hímek, illetve *Flt4^{kd/+}* és vad típusú nőtények pároztatásával. GD11.5 és GD13.5 időpontokban a nőtények terminálását követően az embriókat és placentákat császármetszés segítségével kimetszettük, majd az embriókat és placentákat 4%-os PFA oldatban egy éjszakán keresztül 4°C hőmérsékleten inkubáltuk, amelyet követően a mintákat 3 lépésben PBS oldatban mostuk, majd a placentákból a korábban bemutatott protokollok segítségével szövettani metszetet készítettünk és rutin HE, valamint fluoreszcens immunhisztokémiai festési eljárással kezeltük.

A spirális artériák strukturális átalakulásának jellemzéséhez megmértük a spirális artériák lumenális keresztmetszetét, valamint meghatároztuk az erek lumenális keresztmetszetére vonatkoztatott relatív falvastagságát. A spirális artériák simaizomborítottságának vizsgálatához a spirális artériák fala körül kézzel kijelölt körvonal minden pontján meghatároztuk az α -simaizomaktin-ellenes immunfestés csatornáján mérhető fluoreszcens jelintenzitás értékét. Ezt követően a pontok fluoreszcens jelintenzitás-értékei alapján meghatároztuk a simaizomsejtek által fedett pontok és az érfal körül kijelölt körvonal pontjainak százalékos arányát. A foszforilált ERK fehérje szintjének

meghatározásához a spirális artériák endotheliumát kijelölve vizsgáltuk a kijelölt területen mérhető MFI értékét a foszforilált ERK-ellenes immunfestés csatornáján. A spirális artériák lumenális keresztmetszetének, az erek lumenális keresztmetszetére vonatkoztatott relatív falvastagságának, az erek simaizom-borítottságának, valamint a foszforilált ERK fehérje szintjének meghatározása ImageJ 1.51n program segítségével történt.

3.8. Preeclampsia fenotípus jellemzése

A preeclampsia kórfolyamata emberekben a terhesség során magas vérnyomással, proteinúriával, anyai veseelégtelenséggel, valamint a magzati növekedés károsodásával járhat, amely hatások mind az anyára, mind a magzatra nézve veszélyt hordoznak [192, 201, 203]. Annak vizsgálatára, hogy a humán preeclampsia során megfigyelhető tünetek jelentkeznek-e a VEGFR-3 tirozin kináz jelátviteli útvonalának károsodása esetén az *Flt4^{kd/+}* genotípusú nőstény egerekben, kísérletes rendszereket állítottunk be a kísérleti állatok szisztolés vérnyomásának követésére, a vizelet fehérjetartalmának, illetve placenták, embriók, valamint az anyai vesék tömegének meghatározására.

3.8.1. A szisztolés vérnyomás meghatározása

A humán preeclampsia során jelentkező magas vérnyomás egerekben való vizsgálatára vemhes és nem vemhes *Flt4^{kd/+}* és *Flt4^{+/+}* nőstények szisztolés vérnyomását a farokartérián kivitelezett mandzsettás módszerrel végeztük. A mérés során B60- ¼” szenzorral, ¼” mandzsettával felszerelt IITC Life Science 29 NIBP erősítőt alkalmaztunk, melyhez Biopac MP45 adatfeldolgozó egységen keresztül számítógéphez csatlakoztattuk. Az adatok rögzítése és feldolgozása Biopac Student Lab PRO 3.7.7 szoftver alkalmazásával történt. Az egereket a mérés során egyedi készítésű immobilizációs csőben helyeztük el, és 37°C hőmérsékleten tartottuk a mérés befejezéséig.

Vemhes egerek esetében az *Flt4^{kd/+}* és *Flt4^{+/+}* nőstények szisztolés vérnyomását GD13.5 és GD18.5 időszakban kora délutáni időpontban mértük, naponta egy alkalommal. A nőstényeket GD16.5-GD17.5 kor között metabolikus ketrecben helyeztük el, emiatt a GD16.5 korban a nőstények vérnyomását a többi naptól eltérően, 10.00 órakor

mértük. A nem vemhes *Flt4^{kd/+}* és *Flt4^{+/+}* nőtények vérnyomását 4 egymást követő napon át követtük kora délutáni időpontokban. A mérések előtt az egereket a környezethez való hozzászokás érdekében 5 percig az immobilizációs csőben tartottuk. A vérnyomásmérést egerenként alkalmanként legfeljebb 10 ismétléssel végeztük, az ismétlések között legalább 1 perc szünetet biztosítottunk a farokartériák falának regenerációjára. Az egyes egerek adott napi vérnyomásmérési értékeinek átlagát tekintettük az egér adott napi szisztolés vérnyomásértékének. A mérésorozatot megelőzően a kísérletbe bevont egereket egy egyhetes periódus során hozzászoktattuk a mérési körülményekhez.

3.8.2. Proteinuria vizsgálata

Annak vizsgálatára, hogy az *Flt4^{kd/+}* nőtényekben kialakul-e proteinuria a vemhesség során, vemhes és nem vemhes *Flt4^{kd/+}* és *Flt4^{+/+}* nőtényeket 24 órán keresztül metabolikus ketrecben tartottunk, és vizeletet gyűjtöttünk. A vemhes nőtények esetén úgy végeztük a kísérletet, hogy a nőtények által a metabolikus ketrecben eltöltött idő a GD16.5 és GD17.5 közötti időszakra essen. A nőtényektől a táplálékot a metabolikus ketrecben töltött időszakban megvontuk, elkerülendő, hogy a táp a vizeletmintákba kerüljön. A nőtények megfelelő ivóvíz-ellátását a metabolikus ketrecben töltött idő alatt is biztosítottuk. A gyűjtött vizeletmintákat felhasználásig -80°C hőmérsékleten tároltuk.

Ezt követően került sor a vizeletminták összfehérjetartalmának meghatározására. A minta összfehérjetartalmát a kreatinintartalomra nézve normalizáltuk.

3.8.3. Embriók, placenták, anyai veseminták tömegének meghatározása késő embrionális korban

A vemhes nőtények veseszöveti károsodásának vizsgálatára GD18.5 időpontban a vemhes *Flt4^{kd/+}* és *Flt4^{+/+}* nőtények cervikális diszlokációját követően kimetszettük az embriókat, placentákat, valamint az anyai veséket, majd analitikai mérleg segítségével meghatároztuk a kimetszett embriók, placenták és vesék tömegét.

3.9. A mérési eredmények statisztikai analízise és bemutatása

A vérér- és nyirokérhálózatok elkülönülésének *Plcy2^{-/-}* egérmodellben megfigyelhető zavarának, valamint a kísérleti állatok nyirokcsomóinak vérrel való kitöltöttségének jellemzésére, illetve a meningeális nyirokérhálózat kvantitatív jellemzésére létrehozott pontozási rendszerekben minden egyes paraméter két, egymástól független kutató által került pontozásra, akik nem rendelkeztek információval a kísérleti egerek genotípusáról, koráról, és egyéb, a pontozást esetlegesen befolyásoló paraméterekről. Ezen pontszámok statisztikai analízise során minden esetben a két megfigyelő által adott összpontszám matematikai átlagát vettük figyelembe.

A kísérletek kivitelezése és analízise során az azt végző kutató nem rendelkezett olyan információval az adott kísérlet kiértékelésének befejezéséig, ami befolyásolhatta a kísérlet kiértékelését és az eredmény pártatlanságát.

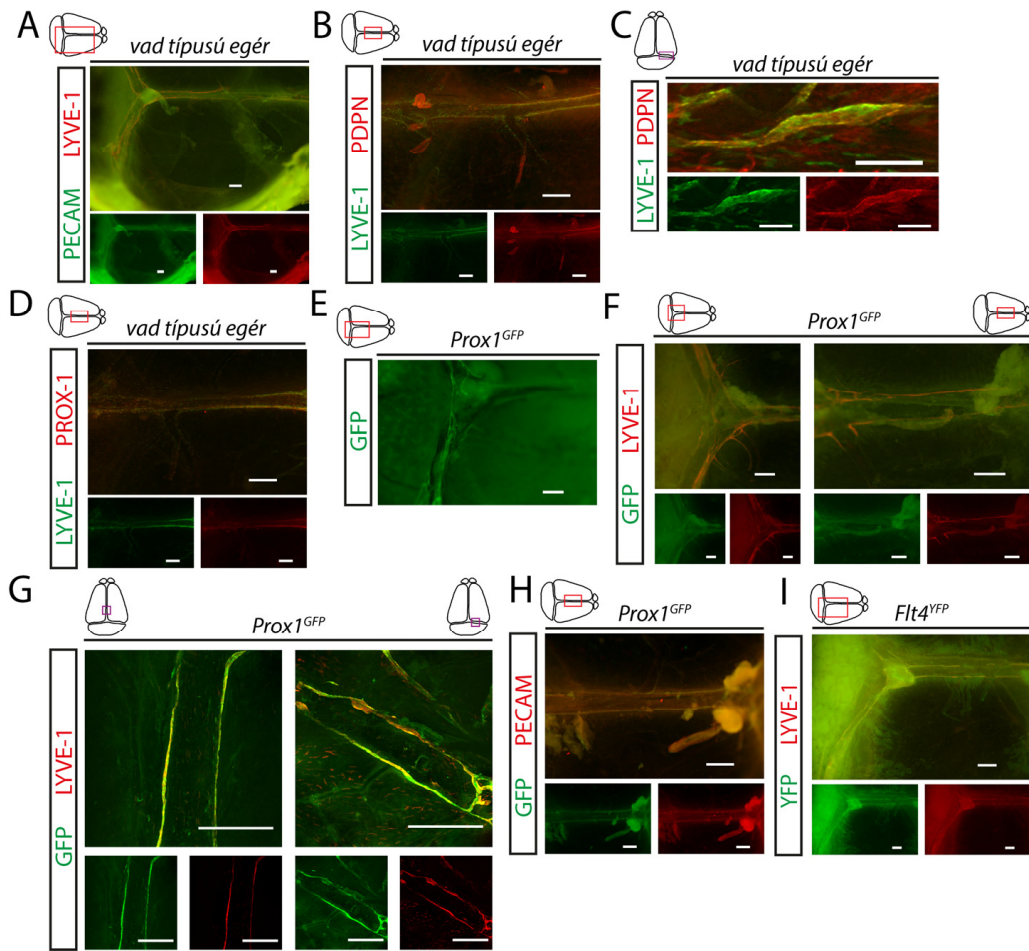
Az értekezésben bemutatott kísérletek elemszámait az adott kísérlet eredményeinek bemutatásakor jelölöm. A mérési eredményeket bemutató ábrákon pont formájában jelölöm az egyedi mérési eredményeket, valamint jelölöm az egyes csoportok számtani átlagát és standard hibáját (SEM, Standard Error of Mean) is. Az adatok kvantitatív elemzésére Microsoft Office Excel és Graph Pad Prism 7.0 szoftvereket alkalmaztunk. Az egyes méréseknél alkalmazott statisztikai próbákat minden egyes kísérletnél külön jelölöm. A statisztikai analízis során 0,05 alatti p-értékeket tekintettük szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. A meningeális nyirokérhálózat felépítésének vizsgálata

A keményagyhártya nyirokérhálózatának jellemzésére irányuló kísérleteink első lépéseként az érett meningeális nyirokérhálózat szerkezetét vizsgáltuk, melyhez az agyhártyaminták teljes szöveti fluoreszcens immunfestését alkalmaztuk. Kísérletünkben fiatal felnőtt vad típusú egerekben jellemeztük a vérér- és nyirokendothelsejteken egyaránt kifejeződő PECAM sejt felszíni markert, valamint a nyirokendothel-specifikus LYVE-1, PDPN, PROX1 molekulákat kifejező sejtek elhelyezkedését a keményagyhártyában.

Kísérleti eredményeink megerősítették a jellemzően a vénás szinuszokkal, illetve az *arteria meningea mediaval* párhuzamos lefutást mutató nyirokerek jelenlétét a keményagyhártyában, amelyek pozitívnak bizonyultak az összes, általunk vizsgált nyirokér-specifikus molekuláris markerre, valamint az összes endothelsejten kifejeződő PECAM-ra nézve (7. ábra A-D panel). A vad típusú egereken végzett megfigyeléseinket megerősítették a *Prox1^{GFP}* és *Flt4^{YFP}* nyirokendothel-specifikus riporter-egértörzseken végzett vizsgálataink is (7. ábra E-I panel). A *Prox1^{GFP}* és *Flt4^{YFP}* egerekben a fluoreszcens riporterfehérje (GFP, illetve YFP) átíródását nyirokendothel-specifikusan kifejeződő gének (*Prox1*, illetve *Flt4*) promótere hajtja, ezáltal a nyirokendothelsejtek (és így a nyirokerek) fluoreszcens technikával vizsgálva láthatóvá válnak. A riporterfehérjét kifejező PROX-1, illetve VEGFR-3 pozitív sejtek egyaránt kifejezték a LYVE-1 nyirokendothel markert, illetve a PECAM általános endothelmarkert is.



7. ábra: A keményagyhártya nyirokerei fiatal felnőtt egerekben

A: PECAM és LYVE-1 sejt felszíni markerfehérjék kifejeződésének vizsgálata a vénás szinuszok mentén fiatal felnőtt vad típusú egerek agyhártyájában. Méretlépték: 500 μ m.

B,C: LYVE-1 és PDPN sejt felszíni markerfehérjék kifejeződésének detektálása a vénás szinuszok mentén fiatal felnőtt vad típusú egerek agyhártyájának teljes szöveti immunfestését követően fluoreszcens sztereomikroszkópia (méretlépték: 500 μ m) (**B**), illetve konfokális mikroszkópia (méretlépték: 200 μ m) (**C**) segítségével.

D: LYVE-1 és PROX-1 nyirokendothel markerek kifejeződésének vizsgálata a vénás szinuszok mentén fiatal felnőtt vad típusú egerek agyhártyájában. Méretlépték: 500 μ m.

E-G: GFP és LYVE-1 fehérjék kifejeződésének vizsgálata a vénás szinuszok mentén fiatal felnőtt $Prox1^{GFP}$ egerek agyhártyájában. Natív GFP-jel (méretlépték: 500 μ m) (**E**), valamint GFP és LYVE-1 kifejeződés detektálása teljes szöveti immunfestést követően fluoreszcens sztereomikroszkópia (méretlépték: 500 μ m) (**F**), illetve konfokális mikroszkópia

(méretlépték: 200 μm) (G) segítségével. H: GFP és PECAM fehérjék kifejeződésének vizsgálata a sinus sagittalis superior mentén fiatal felnőtt *Prox1^{GFP}* egerek agyhártyájában teljes szöveti immunfestés segítségével. Méretlépték: 500 μm . I: YFP és LYVE-1 kifejeződés vizsgálata a vénás szinuszok mentén fiatal felnőtt *Flt4^{YFP}* egerek agyhártyájában teljes szöveti immunfestés segítségével. Méretlépték: 500 μm . A bemutatott reprezentatív képek minden esetben 2 vagy több független kísérletből származnak.

4.2. A keményagyhártya nyirokérhálózatának a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódásában betöltött szerepének vizsgálata

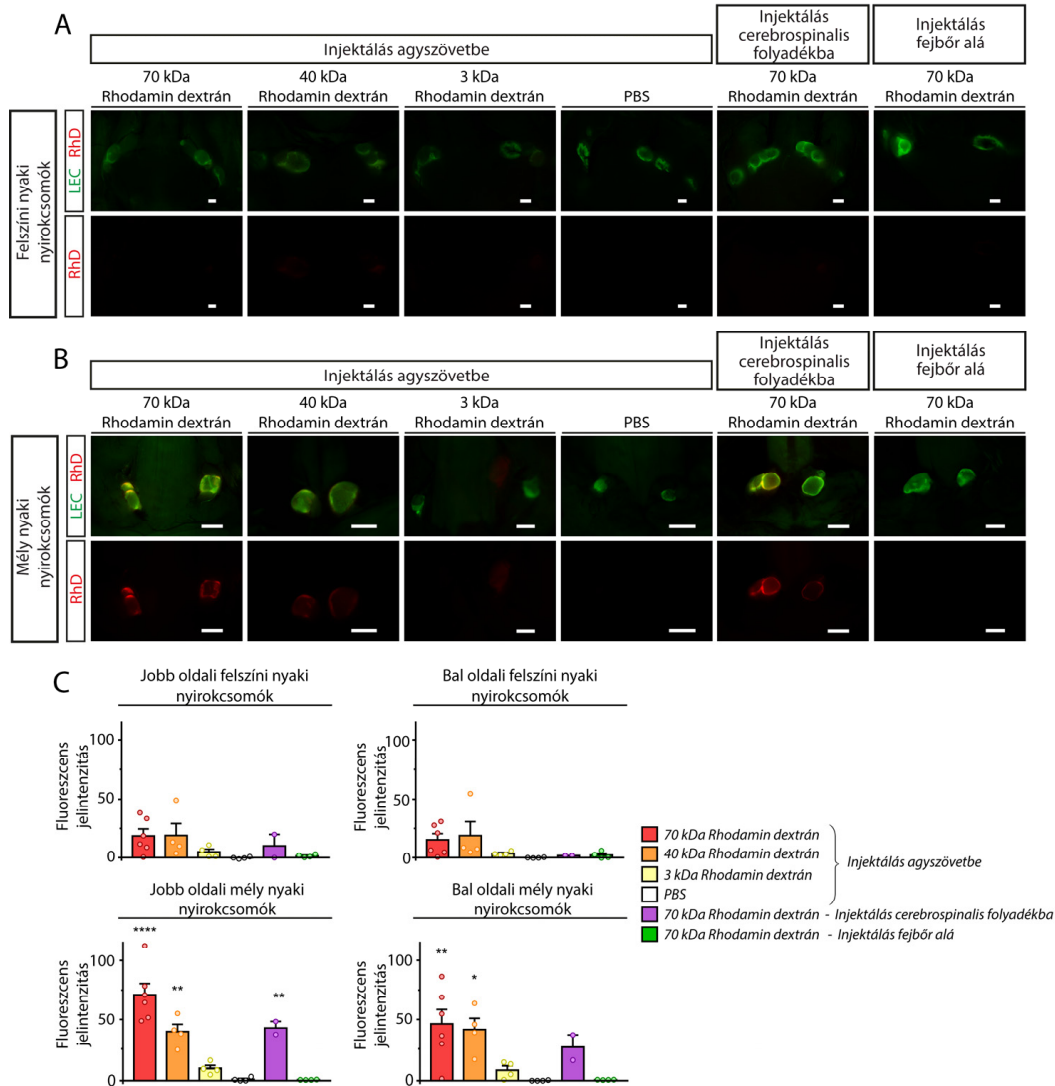
Míg az irodalomban rendelkezésre álló eredmények egy része azt támogatja, hogy a keményagyhártya nyirokereit részt vesznek a makromolekulák központi idegrendszerből való felvételében, más kutatók kísérleteikben nem tudták kimutatni a meningeális nyirokereik szerepét ebben a folyamatban [137, 138, 141, 147, 160, 161]. További kísérletek szükségesek annak eldöntésére, hogy a keményagyhártya nyirokereit részt vesznek-e a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódásában. Ezért kísérleteink során jellemezzük a keményagyhártya nyirokérhálózatának szerepét a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódásában.

4.2.1. A központi idegrendszerbe injektált makromolekulák elvezetődésének vizsgálatára alkalmazott kísérleti eljárás beállítása

A makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódásának vizsgálatára elterjedten alkalmazott módszer a fluoreszcensen vagy radioaktívan jelölt makromolekulák agyszövetbe, agykamrába, illetve *cisterna magna*ba való injektálása, majd az injektált makromolekula elszállítódásának követése. Kísérleteinkben különböző molekulatömegű (70 kDa, 40 kDa és 3 kDa) rhodaminnal jelölt dextránmolekulákat injektáltunk fiatal felnőtt korú *Prox1^{GFP}* és *Flt4^{YFP}* nyirokendothel riporter egerek agyszövetébe, illetve cerebrospinális folyadékába. A makromolekulák injektálását követően 100 perccel vizsgáltuk azok nyaki nyirokcsomók irányába történő elvezetődését. Annak kontrollálására, hogy a nyirokcsomókban detektálható fluoreszcens jel a jelölt makromolekulákból származik, kísérleti állatok agyszövetébe PBS-t

injektáltunk, majd monitoroztuk a fluoreszcens jelintenzitás mértékét a nyaki nyirokcsomókban. Annak vizsgálatára, hogy a nyaki nyirokcsomókban megjelenő jel mennyire specifikus, kontroll kísérletként az agyszövetbe való injektálás helyén 70 kDa rhodamin dextránt injektáltunk a bőr alá, és detektáltuk annak elszállítódását a nyaki nyirokcsomókba.

Kísérleteink során a jelölt molekulák injektálását követően a felszíni nyaki nyirokcsomókban elhanyagolhatóan kis mértékű fluoreszcens jelet tapasztaltunk (*8. ábra A panel*). Nagy molekulatömegű (70 kDa, illetve 40 kDa) rhodamin dextránmolekulák agyszövetbe és cerebrospinális folyadékban való injektálását követően azonban a jelölt makromolekulák jelentős mértékű felhalmozódását figyeltük meg a mély nyaki nyirokcsomókban (*8. ábra B panel*). Az injektálást követően a mély nyaki nyirokcsomókban mért fluoreszcens jelintenzitás-értékek számszerűsítése statisztikailag szignifikáns elvezetődést mutatott a jelölt makromolekulák (70 és 40 kDa) agyszövetbe, illetve cerebrospinális folyadékba való injektálása esetén (*8. ábra C panel*). A makromolekulák agyszövetbe való injektálásakor enyhe ipszilaterális dominanciát figyeltünk meg a molekulák mély nyaki nyirokcsomókba való elszállítódásában.



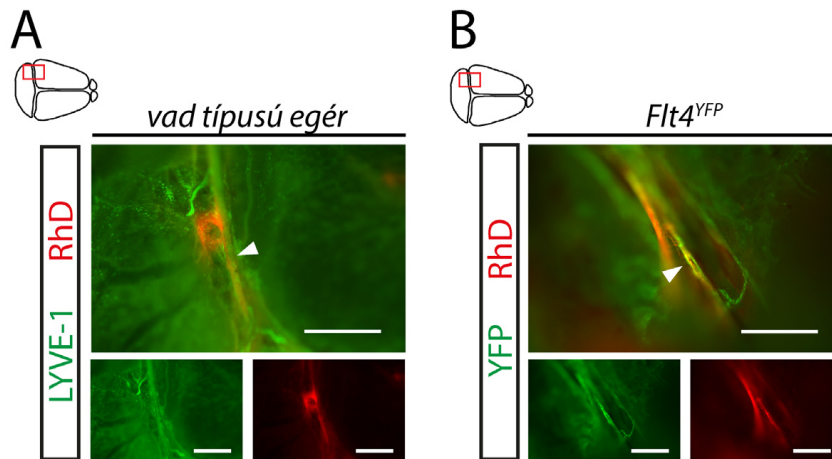
8. ábra: A központi idegrendszerbe injektált makromolekulák elszállítása a felszíni és mély nyaki nyirokcsomókba

A, B: Az injektált jelölt molekulák felhalmozódása a felszíni nyaki (A) és mély nyaki nyirokcsomókban (B) 70, 40, 3 kDa molekulatömegű rhodamin dextrán agyszövetbe, cerebrospinalis folyadékba, illetve bőr alá történő injektálását követően. LEC: nyirokendothelsejtek (Lymphatic Endothelial Cells). A mutatott képek 2 vagy több független kísérletből származó reprezentatív képek. Méretlépték: 1000 μ m. **C:** Az egyes injektálási eljárásokat követően a nyaki régió nyirokcsomóiban mérhető fluoreszcens jelintenzitás-értékek összehasonlítása a PBS injektálásakor mérhető fluoreszcens jelintenzitással. Egyutas varianciaanalízis, Dunnett-féle post-hoc teszt; átlag \pm SEM; $n \geq 2$

*minden injektálás esetén; szignifikanciaszintek: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$ az agyszövetbe injektált PBS csoporttal összehasonlítva.*

4.2.2. A meningeális nyirokerek szerepének vizsgálata a központi idegrendszerbe injektált makromolekulák felvételében

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a meningeális nyirokerek felveszik-e a központi idegrendszerbe injektált makromolekulát. Ehhez 70 kDa molekulatömegű rhodamin dextránt injektáltunk a kísérleti állatok agyszövetébe. Kísérleti eredményeink alapján az agyszövetbe injektált jelölt makromolekulák megjelennek a szinuszok mellett elhelyezkedő LYVE-1 és VEGFR-3 pozitív nyirokérstruktúrákban (9. ábra).



9. ábra: A meningeális nyirokerek szerepe a makromolekulák központi idegrendszerből való felvételében és elszállításában

A,B: Az agyszövetbe injektált 70 kDa rhodamin dextrán meningeális nyirokerek általi felvételének vizsgálata fiatal felnőtt egerek keményagyhártyájában. A nyirokerek láthatóvá tétele vad típusú egerek LYVE-1 ellenes immunfestése révén (A) és natív YFP jel $Flt4^{YFP}$ nyirokér-riporter egerekben való detektálásával (B) történt teljes szöveti keményagyhártyamintákon. A mutatott képek 3 független kísérletből származó reprezentatív képek. A fehér nyilak a nyirokerekben megfigyelhető rhodamin dextránt jelölik. Méretlépték: 500 μm .

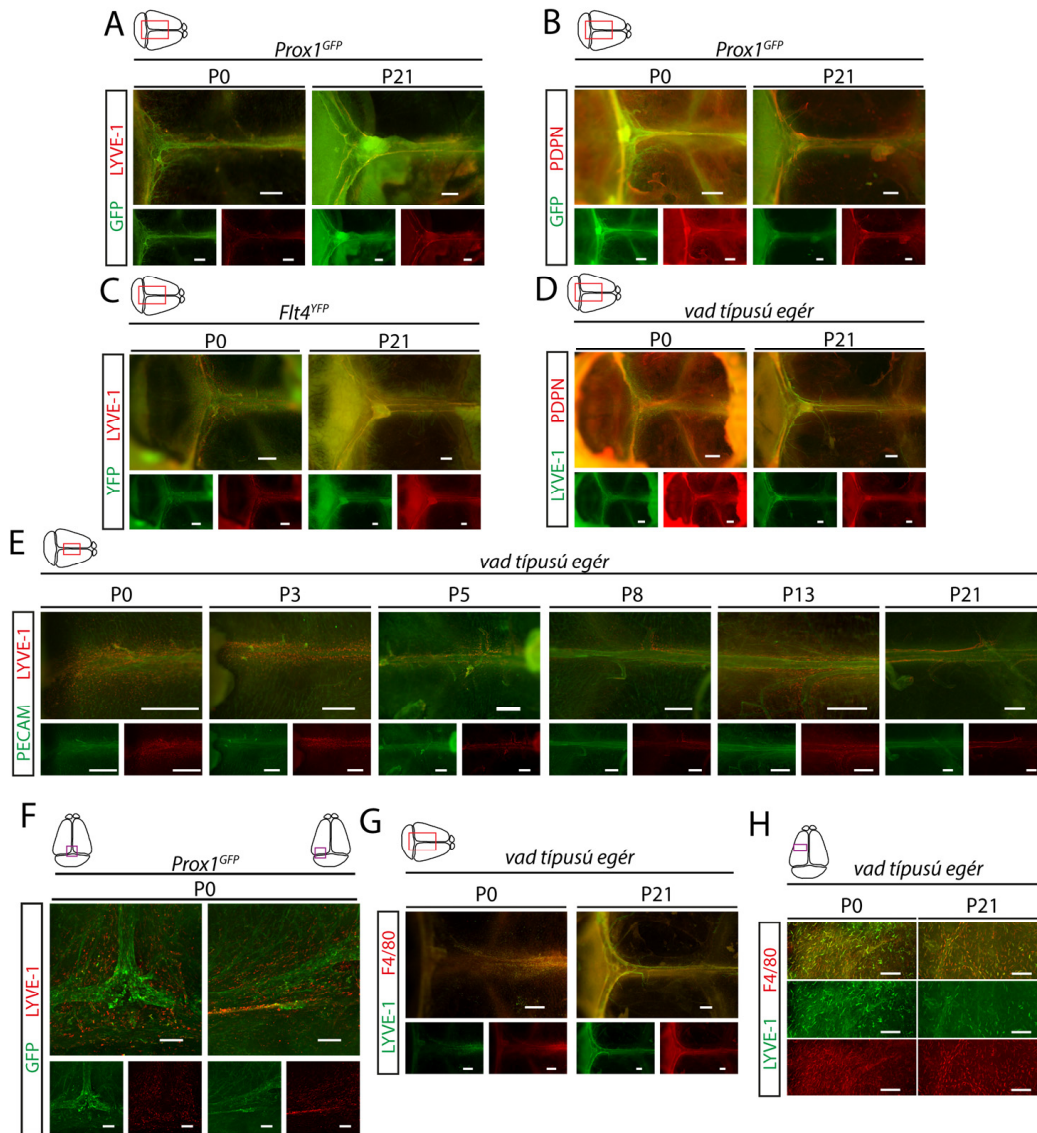
Ezen kísérleti eredményeink arra utalnak, hogy a keményagyhártya nyirokerei részt vesznek a központi idegrendszerbe injektált makromolekulák felvételében és mély nyaki nyirokcsomókba történő elszállításában.

4.3. A meningeális nyirokérhálózat fejlődési programjának vizsgálata

4.3.1. A meningeális nyirokérstruktúrák fejlődésének követése

Ezt követően a nemrégiben felfedezett meningeális nyirokérhálózat szervspecifikus fejlődési programját vizsgáltuk. Kísérleteinkben különböző korú egerekből származó agyhártyaminták teljes szöveti immunfestését végeztük el. P21 korú egerekben az értekezésemben korábban bemutatott eredményekhez hasonlóan érett, folytonos meningeális nyirokereket figyeltünk meg Prox1-GFP, Flt4-YFP, LYVE-1, PDPN és PECAM markerek segítségével. Újszülött korú (P0) egerekben Prox1-GFP, Flt4-YFP, PDPN pozitivitást mutató, éretlen nyirokérhálózatot figyeltünk meg, amelyek környezetében egymástól elkülönülten elhelyezkedő LYVE-1 pozitív sejteket detektáltunk (10. ábra A-F panel).

Ezt követően az agyhártyában megfigyelt LYVE-1 pozitív sejtek vizsgálatához fluoreszcens mikroszkópos technikák segítségével jellemeztük a mezenhimális eredetű sejtekre jellemző F4/80 fehérje kifejeződését a sejtekben. Azt tapasztaltuk, hogy az újszülött korú egerekben megfigyelhető, egymástól elkülönülten elhelyezkedő LYVE-1 pozitív sejtek nagy arányban kifejezték az F4/80 fehérjét. A fiatal felnőtt egerekben megfigyelhető F4/80 sejtek között azonban kisebb arányban találtunk LYVE-1 – F4/80 kettős pozitív sejteket (10. ábra G-H panel).



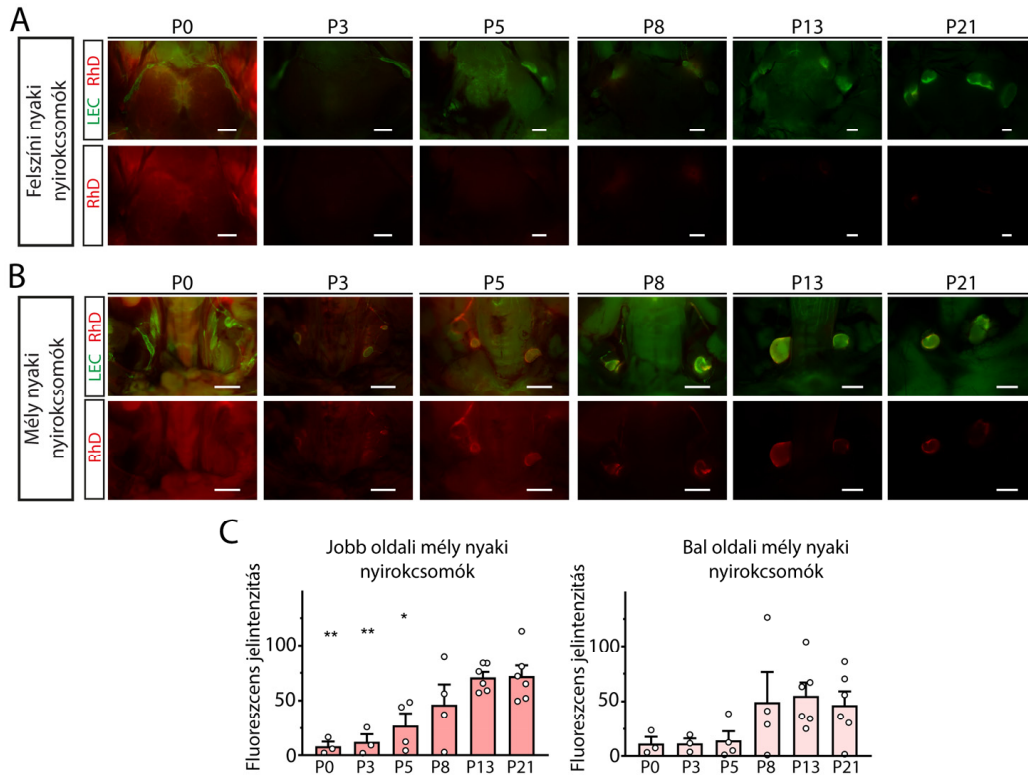
10. ábra: A keményagyhártyában megfigyelhető nyirokérstruktúrák fejlődési programja

A: GFP és LYVE-1 kifejeződésének vizsgálata a vénás szinuszok mentén újszülött és fiatal felnőtt korú *Prox1^{GFP}* egerek agyhártyájában. Méretlépték: 500 μ m. **B:** GFP és PDPN kifejeződésének vizsgálata a vénás szinuszok mentén újszülött és fiatal felnőtt korú *Prox1^{GFP}* egerek agyhártyájában. Méretlépték: 500 μ m. **C:** YFP és LYVE-1 kifejeződésének vizsgálata a vénás szinuszok mentén újszülött és fiatal felnőtt korú *Flt4^{YFP}* egerek agyhártyájában. Méretlépték: 500 μ m. **D:** LYVE-1 és PDPN kifejeződésének vizsgálata a vénás szinuszok mentén újszülött és fiatal felnőtt korú vad típusú egerek agyhártyájában. Méretlépték: 500 μ m. **E:** PECAM és LYVE-1 kifejeződésének vizsgálata

a sinus sagittalis superior mentén P0, P3, P5, P8, P13 és P21 korú vad típusú egerek agyhártyájában. Méretlépték: 500 µm. F: GFP és LYVE-1 kifejeződésének detektálása újszülött Prox1^{GFP} egerekből származó agyhártyában konfokális mikroszkópiával. Méretlépték: 200 µm. G,H: LYVE-1 és F4/80 markerek kifejeződésének detektálása újszülött és fiatal felnőtt egerek agyhártyájában fluoreszcens sztereomikroszkópia (méretlépték: 500 µm) (G), illetve konfokális mikroszkópia (méretlépték: 200 µm) (H) segítségével. A bemutatott reprezentatív képek minden esetben 2 vagy több független kísérletből származnak.

4.3.2. A makromolekulák agyszövetből való elszállítódásának követése a meningeális nyirokerek fejlődési programja során

Ezt követően a makromolekulák elszállítódását vizsgáltuk a nyirokérhálózat fejlődési programja során. Ehhez 70 kDa rhodamin dextránt injektáltunk különböző korú egerek agyszövetébe. Fiatal felnőtt korú egerekben a korábbi kísérleteinkben megfigyeltekhez hasonlóan jelentős mértékű elvezetődést tapasztaltunk a mély nyaki nyirokcsomókban, míg fiatalabb korú egerekben kisebb mértékű elvezetődést detektáltunk, és az újszülött egerekben szinte egyáltalán nem volt megfigyelhető elvezetődés (11. ábra A,B panel). A nyirokcsomókban mért fluoreszcens jel statisztikai analízise megerősítette, hogy az agyszövetbe injektált makromolekula megjelenése a mély nyaki nyirokcsomókban a születés időpontjától kezdődően folyamatosan növekszik a meningeális nyirokérhálózat fejlődési programjának ideje alatt, a születést követő harmadik hét végéig (11. ábra C panel). Ezen megfigyeléseink alapján a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódásának megindulása egybeesik a meningeális nyirokerek fejlődési programjának időpontjával.



11. ábra: A központi idegrendszerbe injektált makromolekulák elszállítása a felszíni és mély nyaki nyirokcsomókba a születést követő első három hét során

A,B: Az agyszövetbe injektált jelölt molekulák felhalmozódása a felszíni nyaki (A) és mély nyaki nyirokcsomókban (B) 70 kDa molekulatömegű rhodamin dextrán különböző korú nyirokendothel-riporter egerek (*Prox1^{GFP}*, *Flt4^{YFP}*) agyszövetébe való injektálását követően a születést követő három hét során. A mutatott képek 3 vagy több független kísérletről származó reprezentatív képek. Méretlépték: 1000 μ m. **C:** A különböző korú egerek mély nyaki nyirokcsomóiban mérhető fluoreszcens jelintenzitás-értékek összehasonlítása a fiatal felnőtt (P21 korú) egerekben mérhető fluoreszcens jelintenzitással 70 kDa rhodamin dextrán agyszövetbe való injektálását követően. Egyutas varianciaanalízis, Dunnett-féle post-hoc teszt; átlag \pm SEM; $n \geq 3$ minden injektálás esetén; szignifikanciaszintek: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ a 21 napos egerek csoportjával összehasonlítva.

4.4. Az áramlás meningeális nyirokérhálózat fejlődési programjában betöltött szerepének vizsgálata

Korábbi vizsgálatok során már jellemzésre került a VEGFR-3 jelátviteli útvonal meningeális nyirokerek növekedésében betöltött szerepe [140]. Kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy a nyirokérfejlődési folyamatok egyik meghatározó tényezőjének számító áramlás keltette mechanikai erők miként befolyásolják a meningeális nyirokérhálózat fejlődési programját.

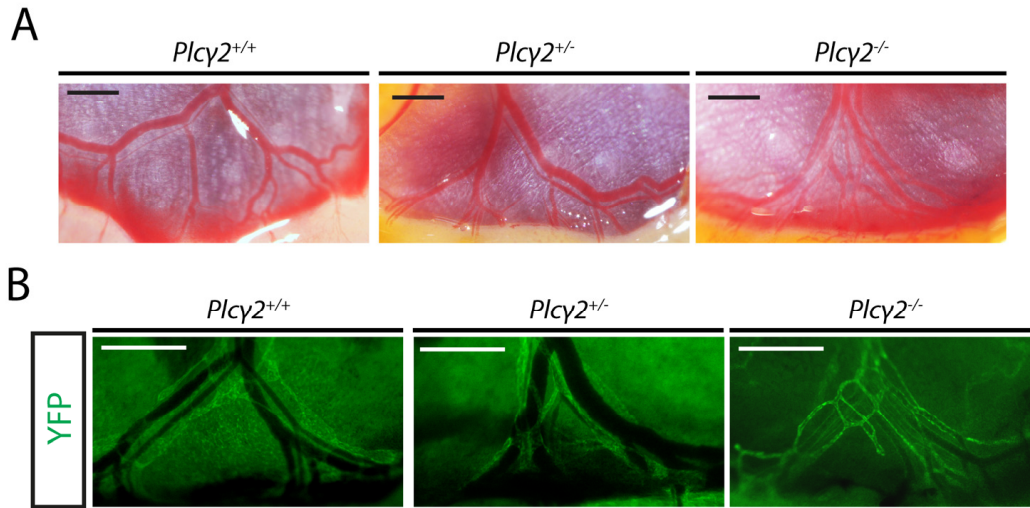
4.4.1. A PLC γ 2 hiányos egértörzsben megfigyelhető fenotípus jellemzése

Jól ismert, hogy a vérlemezkék aggregációjában fontos szereppel bíró CLEC-2, SYK, SLP-76 és PLC γ 2 fehérjék hiányában az értekezés első részében bemutatott okokból kifolyólag sérül a vérér- és nyirokérhálózatok vérlemezke-mediálta elkülönülése az embrionális időszakban, aminek következtében a nyirokerek vérrel kitöltötté válnak [101, 104, 105, 107, 110-113]. A kísérleti eredmények szerint a vér- és nyirokrendszer elkülönülésének zavara esetén a vérrel kitöltött nyirokerekben károsodik a nyirokáramlás, ami következtében sérül a mezentérium és a tüdő nyirokereinek szervspecifikus érési programja [123, 130]. Ezen megfigyelések alapján felmerül, hogy a PLC γ 2 hiányos egértörzs ígéretes modell lehet az áramlás szervspecifikus nyirokérfejlődési programban betöltött szerepének vizsgálatára [107].

4.4.1.1. A PLC γ 2 hiányában kialakuló nyirokér-fenotípus jellemzése embrionális korú egerekben

Kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a CLEC-2 hiányos egerekhez hasonlóan a PLC γ 2 hiányában is megfigyelhető-e a vérér- és nyirokérhálózatok elkülönülésének zavara, valamint sérül-e a vékonybél nyirokérhálózatának érése az egerek embrionális korában. Ennek vizsgálatához a PLC γ 2 egértörzset kereszteztük az *Flt4^{YFP}* nyirokér-riporter egértörzssel, majd vizsgáltuk az egérembriók nyirokérhálózatát. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a CLEC-2 hiányos egértörzshöz hasonlóan [113, 123], a PLC γ 2 hiányában is károsodik a vérér- és nyirokérhálózatok elkülönülése és a nyirokerek vérrel kitöltötté válnak, amely fenotípus jól megfigyelhető a mezentérium nyirokereiben (12.

ábra A panel). Ezen túlmenően azt is megfigyeltük, hogy a $Plc\gamma 2^{-/-}$ egémbriókban sérül a vékonybél nyirokereinek érése (12. ábra B panel).

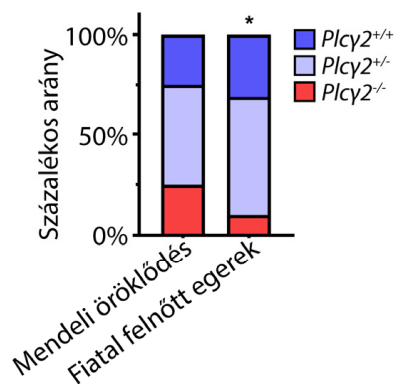


12. ábra: A PLC γ 2 hiányában kialakuló fenotípus jellemzése embrionális korú egerekben

A: A vékonybél és mezentérium vérér- és nyirokérhálózata E19.5 korú $Plc\gamma 2^{+/+}$, $Plc\gamma 2^{+/-}$ és $Plc\gamma 2^{-/-}$ egémbriókban. **B:** A vékonybél és mezentérium YFP pozitív nyirokereinek szerkezete E19.5 korú $Plc\gamma 2^{+/+}$, $Plc\gamma 2^{+/-}$ és $Plc\gamma 2^{-/-}$ egémbriókban $Flt4^{YFP}$ genetikai háttéren. A mutatott képek 3 vagy több független kísérletből származó reprezentatív képek. Méretlépték: 500 μ m.

A $Plc\gamma 2^{+/-} \times Plc\gamma 2^{+/-}$ keresztezésekből született utódok genotípusainak összehasonlításakor azt tapasztaltuk, hogy az utódok között a $Plc\gamma 2^{-/-}$ egerek aránya a születést követő harmadik héten 9,9%, ami jelentősen elmarad a mendeli öröklésmentnél jellemző 25%-tól (13. ábra). Ezen megfigyeléseink alapján a $Plc\gamma 2^{-/-}$ egereknek több, mint fele nem éri meg a születést követő három hetes kort.

Genotípus	Mendeli eloszlás	Fiatal felnőtt egerek	
		Arány	N
<i>Plcy2^{+/+}</i>	25,0%	31,4%	117
<i>Plcy2^{+/-}</i>	50,0%	58,7%	219
<i>Plcy2^{-/-}</i>	25,0%	9,9%	37
Összesen	100,0%	100,0%	373

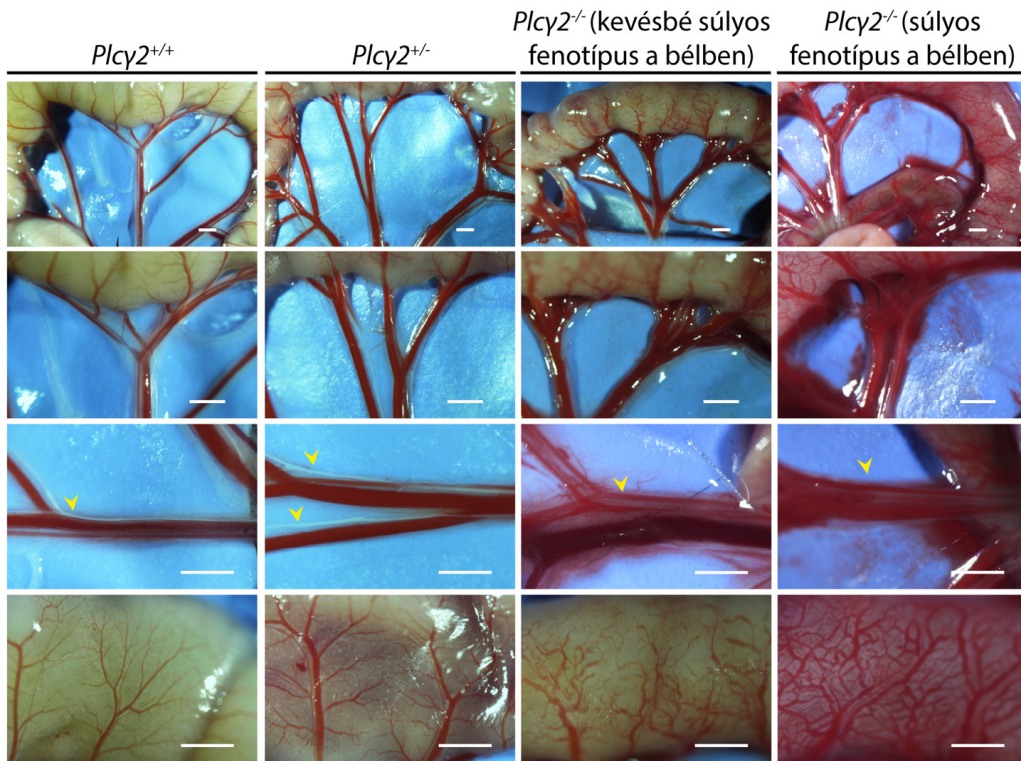


13. ábra: A PLC γ 2 hiányos egerek túlélésének jellemzése.

A *Plcy2* kolóniában született utódok genotípusának összehasonlítása a mendeli öröklésmentre jellemző arányokkal kontingencia táblázat és halmazott oszlopdiagram formájában. A *Plcy2^{+/-}* \times *Plcy2^{+/-}* keresztezésekből származó 67 alomban született 373 utód genotípusait a születést követő harmadik héten állapítottuk meg. Az eredmények mendeli arányokkal való összehasonlítására Pearson-féle Chi-négyzet próbát alkalmaztunk. $n \geq 37$ minden genotípus esetén; * $P < 0,05$.

4.4.1.2. A PLC γ 2 hiányában kialakuló nyirokér-fenotípus jellemzése fiatal felnőtt egerekben

Ezt követően a fiatal felnőtt korban is jellemeztük a PLC γ 2 hiányos egerekben kialakuló fenotípust. Az embrionális korú egerekhez hasonlóan fiatal felnőtt egerekben is megfigyelhető volt a vérér- és nyirokérhálózatok elkülönülésének zavara, valamint a vér megjelenése a vékonybél és a mezentérium nyirokereiben (14. ábra). A vékonybélben megfigyelhető fenotípus vizsgálatokor felfigyeltünk arra, hogy a PLC γ 2 hiányos egerek némelyikében a fenotípus sokkal kevésbé súlyos megjelenést mutat. A kevésbé súlyos fenotípust mutató *Plcy2^{-/-}* egerekben a vékonybél és mezentérium nyirokereit kevésbé voltak vérrel kitöltöttek, mint a súlyos fenotípust mutató PLC γ 2 hiányos egerek nyirokereit (14. ábra).



14. ábra: A PLC γ 2 hiányában kialakuló fenotípus jellemzése fiatal felnőtt egerek vékonybelében

A vékonybél és mezenterium vérér- és nyirokérhálózata fiatal felnőtt korú $Plc\gamma 2^{+/+}$, $Plc\gamma 2^{+/-}$, valamint kevésbé súlyos és súlyos fenotípust mutató $Plc\gamma 2^{-/-}$ egerekben. A sárga nyilak a mezenterialis nyirokereket jelölik. A mutatott képek 9 vagy több független kísérletből származó reprezentatív képek. Méretlépték: 1000 μ m.

Abból kifolyólag, hogy feltételezéseink szerint azokban a PLC γ 2 hiányos egerekben, amelyekben a bél nyirokereit kevésbé súlyos fenotípust mutatnak, kevésbé károsodik a nyirokáramlás is, egy 0-4 pontig terjedő pontozási rendszert hoztunk létre, amely segítségével elkülöníthetővé váltak a kevésbé súlyos és súlyos fenotípust mutató PLC γ 2 hiányos egerek (15. ábra).



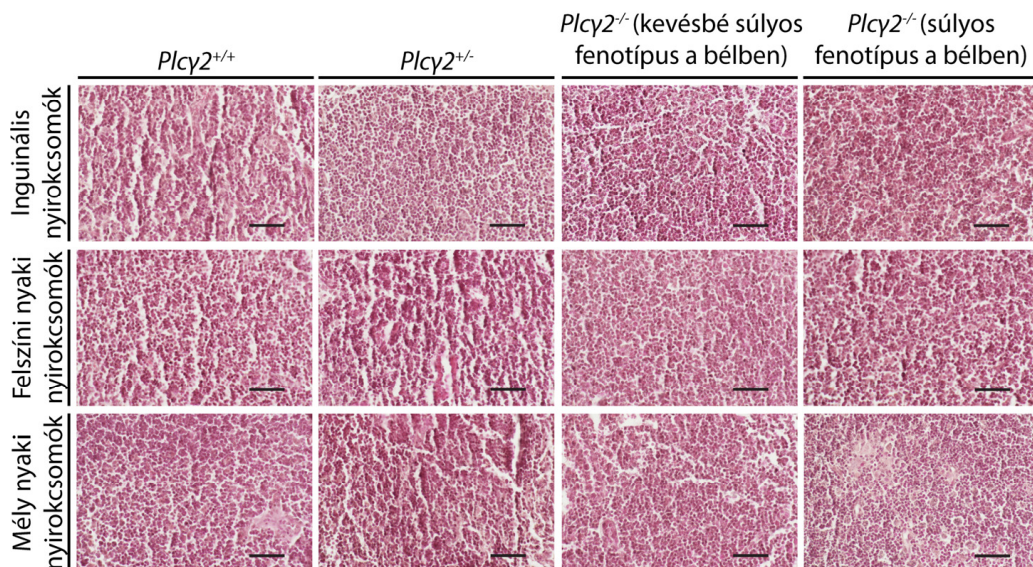
15. ábra: A PLC γ 2 hiányában kialakuló fenotípus súlyosságának jellemzése a vékonybélben és a mezentériumban látható fenotípus alapján

0-4 pontig terjedő pontozási rendszer a vérér- és nyirokérhálózatok vékonybélben és mezentériumban megvalósuló elkülönülésének és a vér nyirokerekben való megjelenésének követésére $Plc\gamma 2^{+/+}$, $Plc\gamma 2^{+/-}$ és $Plc\gamma 2^{-/-}$ egerekben (Átlag \pm SEM; Egyutas varianciaanalízis; Dunnett-féle post-hoc test; $n \geq 9$ minden csoport esetén; **** $P < 0,0001$ a $Plc\gamma 2^{+/+}$ csoporttal összehasonlítva).

4.4.1.3. A nyirokcsomók jellemzése PLC γ 2 hiányos egérmodellben

A korábbi kísérleti eredmények alapján a PDPN – CLEC-2 jelpálya születést követő károsodása esetén a nyirokerek vérrel való kitöltöttségén túlmenően a nyirokcsomók is vérrel kitöltötté válhatnak [104, 113, 119, 221-223]. Ezt követő kontroll kísérleteink során vizsgáltuk a nyirokcsomók szerkezetét, valamint a vér megjelenését $Plc\gamma 2^{+/+}$, $Plc\gamma 2^{+/-}$ és $Plc\gamma 2^{-/-}$ egerek nyirokcsomóiban.

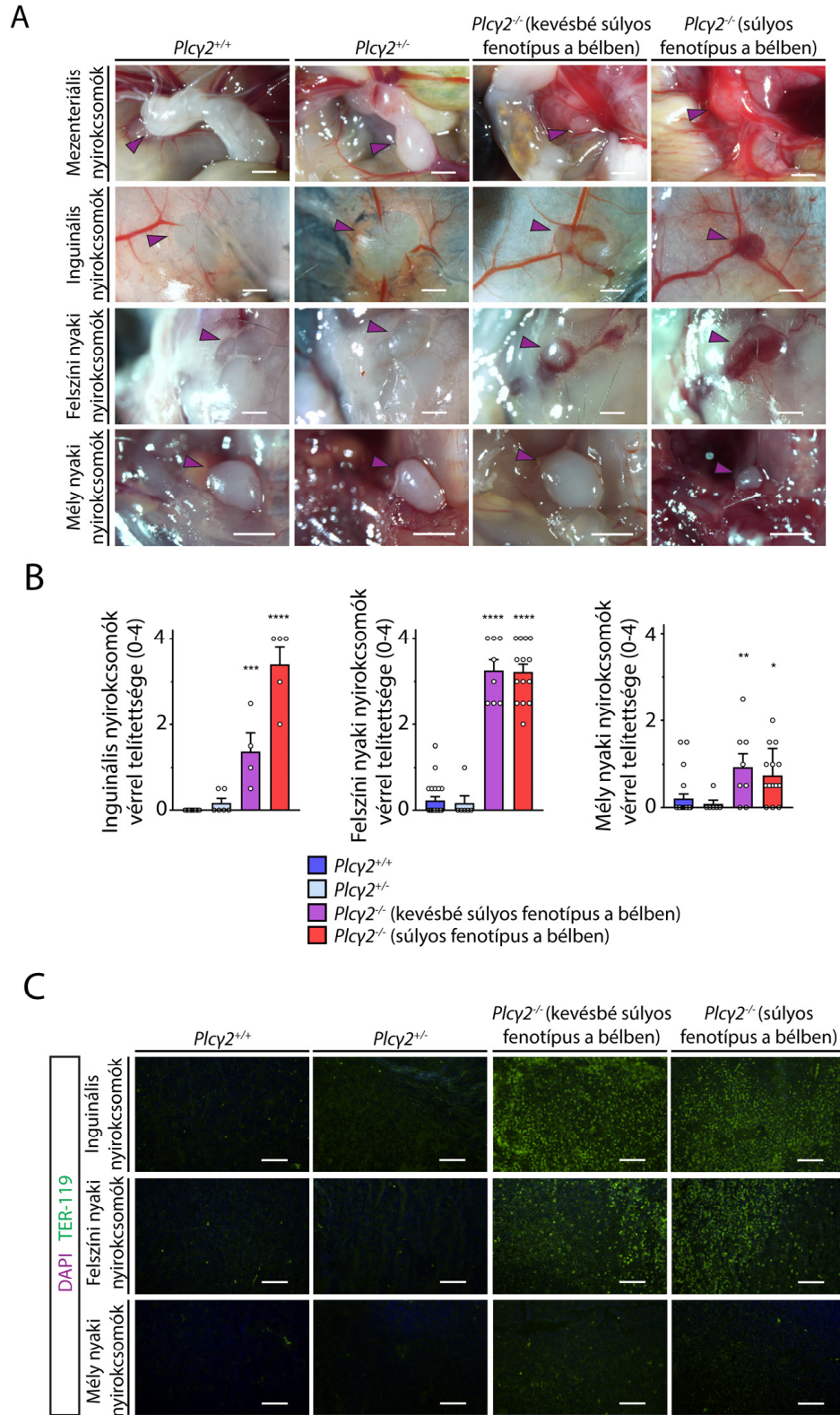
A $Plc\gamma 2^{-/-}$ egerek nyirokcsomói az összes vizsgált régióban (nyaki, mezenterialis, inguinális, popliteális) megfigyelhetőek voltak. Annak vizsgálatára, hogy a PLC γ 2-hiányos egerekben károsodik-e a nyirokcsomók struktúrája, a nyirokcsomók szerkezetét rutin szöveti festés segítségével jellemeztük. A nyirokcsomók szerkezetében nem volt megfigyelhető strukturális elváltozás a PLC γ 2 fehérje hiányában (16. ábra).



16. ábra: A nyirokcsomók szerkezetének vizsgálata fiatal felnőtt kontroll és PLC γ 2 hiányos egerekben

A nyirokcsomók szerkezetének vizsgálata rutin HE szövettani festés segítségével *Plcγ2^{+/+}*, *Plcγ2^{+/-}* és *Plcγ2^{-/-}* egerek inguinális, felszíni nyaki és mély nyaki nyirokcsomóiban. A mutatott képek 1 vagy több független kísérletből származó reprezentatív képek. Méretlépték: 50 μ m.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy PLC γ 2 hiányában az egerek mezenterialis, inguinális és felszíni nyaki nyirokcsomói a PDPN – CLEC-2 jelátviteli útvonal más fehérjéinek hiányában megfigyeltekhez hasonlóan jellemzően vérrel kitöltöttek voltak. A mély nyaki nyirokcsomókban nem voltak megfigyelhetőek vörösvértetek a PLC γ 2 hiányos egerekben (17. ábra).



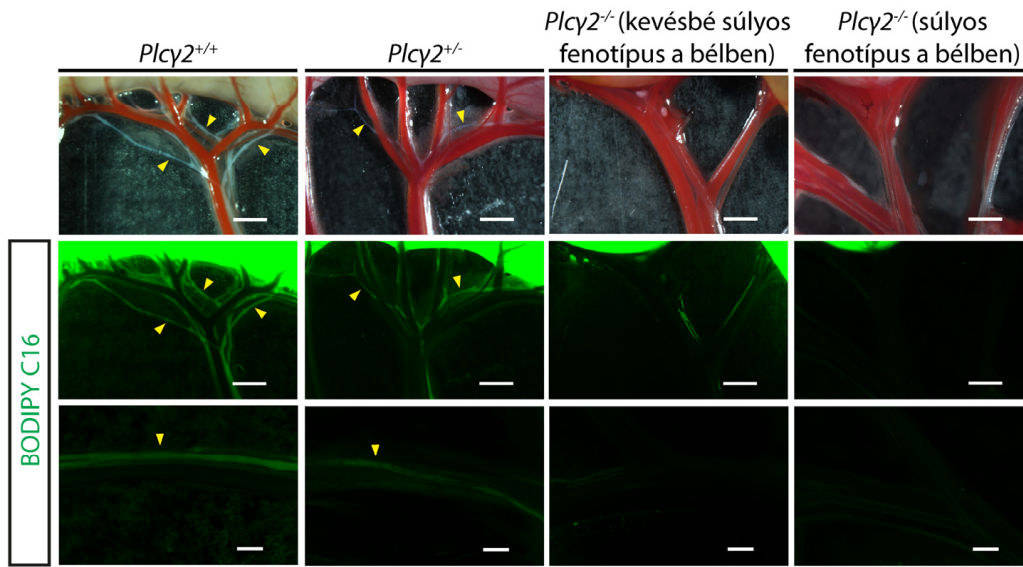
17. ábra: A nyirokcsomók vérrel való kitöltöttségének vizsgálata fiatal felnőtt kontroll és PLCy2 hiányos egerekben

A: Különböző régiókból származó nyirokcsomók makroszkopikus képe. A nyilak a nyirokcsomók elhelyezkedését jelölik. A mutatott képek 3 vagy több független kísérletből származó reprezentatív képek. Méretlépték: 1000 μm . **B:** 0-4 pontig terjedő pontozási rendszer az egyes nyirokcsomók vérrel való kitöltöttségének jellemzésére $Plc\gamma 2^{+/+}$, $Plc\gamma 2^{+/-}$ és $Plc\gamma 2^{-/-}$ egerekben (Átlag \pm SEM; Egyutas varianciaanalízis; Dunnett-féle post-hoc test; $n \geq 3$ minden csoport esetén; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ a $Plc\gamma 2^{+/+}$ csoporttal összehasonlítva). **C:** TER-119 pozitív vörösvértestek előfordulása kontroll és $PLC\gamma 2$ hiányos egerek inguinális, felszíni nyaki és mély nyaki nyirokcsomóiban. A mutatott képek 1 vagy több független kísérletből származó reprezentatív képek. Méretlépték: 50 μm .

4.4.2. A nyirokérfunkció jellemzése $PLC\gamma 2$ hiányos egértörzsben

4.4.2.1. A nyirokérfunkció jellemzése a vékonybélben

A $PLC\gamma 2$ hiányában kialakuló nyirokér-fenotípus vizsgálatát követően a nyirokerek funkcionális jellemzését végeztük el. A lipidek vékonybél lumenből való felvételében központi szerepet játszanak a nyirokerek. A vékonybél nyirokérhálózatának funkcionális vizsgálatához az egereket fluoreszcensen jelölt lipiddel (BODIPY C16) etettük meg, majd vizsgáltuk a jelölt lipid megjelenését a vékonybél nyirokereiben. Míg a $Plc\gamma 2^{+/+}$ és $Plc\gamma 2^{+/-}$ egerek esetében a lipid megjelent a mezenteriális nyirokerekben, azokban a $Plc\gamma 2^{-/-}$ egerekben, amelyekben a vérér- és nyirokérhálózatok elkülönülésének zavara súlyos volt a bélben, egyáltalán nem volt megfigyelhető a jelölt lipid transzportja a mezenteriális nyirokerekben. A kevésbé súlyos bélfenotípust mutató $PLC\gamma 2$ hiányos egerek mezenteriális nyirokereiben a fluoreszcensen jelölt lipid kis mértékű transzportját detektáltuk (18. ábra).

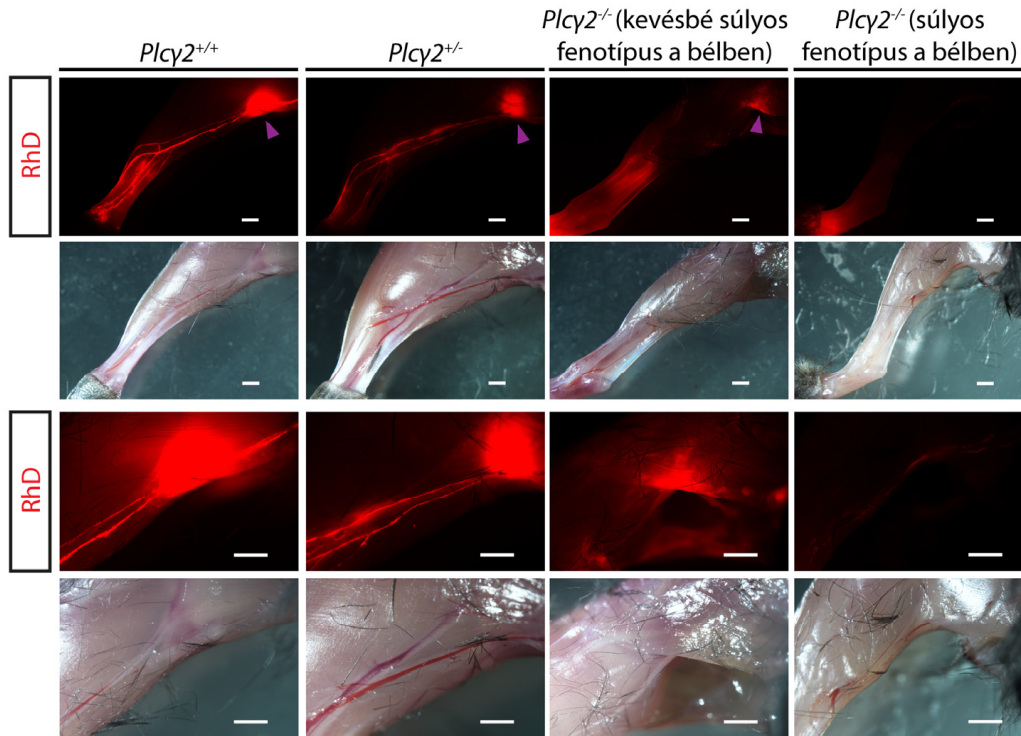


18. ábra: A vékonybél és a mezentérium nyirokereinek funkcionális jellemzése fiatal felnőtt kontroll és PLC γ 2 hiányos egerekben

Az orálisan adott fluoreszcensen jelölt lipid (BODIPY C16) felvétele $Plc\gamma 2^{+/+}$, $Plc\gamma 2^{+/-}$ és $Plc\gamma 2^{-/-}$ egerek mezenterialis nyirokereiben. A nyilak a mezenterialis nyirokereiben megjelenő BODIPY C16-ot jelölik. A mutatott képek 3 független kísérletből származó reprezentatív képek. Méretlépték: 1000 μ m.

4.4.2.2. A nyirokérfunkció jellemzése a hátsó végtagban

Ezt követően a nyirokérfunkció további jellemzéséhez 70 kDa molekulatömegű rhodamin dextránt injektáltunk a kísérleti állatok hátsó lábának talpbőrébe, majd az egerek terminálását követően vizsgáltuk az injektált jelölt makromolekula elvezetődését. A $Plc\gamma 2^{+/+}$ és $Plc\gamma 2^{+/-}$ egerek esetében azt tapasztaltuk, hogy a makromolekulák a nyirokérhálózat segítségével a popliteális nyirokcsomókba vezetődtek el. Ezzel ellentétben azokban a $Plc\gamma 2^{-/-}$ egerekben, amelyekben a vérér- és nyirokérhálózatok elkülönülésének zavara súlyos volt a bélben, nem volt megfigyelhető a makromolekula elszállítódása, míg a kevésbé súlyos bélfenotípust mutató PLC γ 2 hiányos egerekben a fluoreszcensen jelölt makromolekula kis mértékű transzportját detektáltuk (19. ábra).



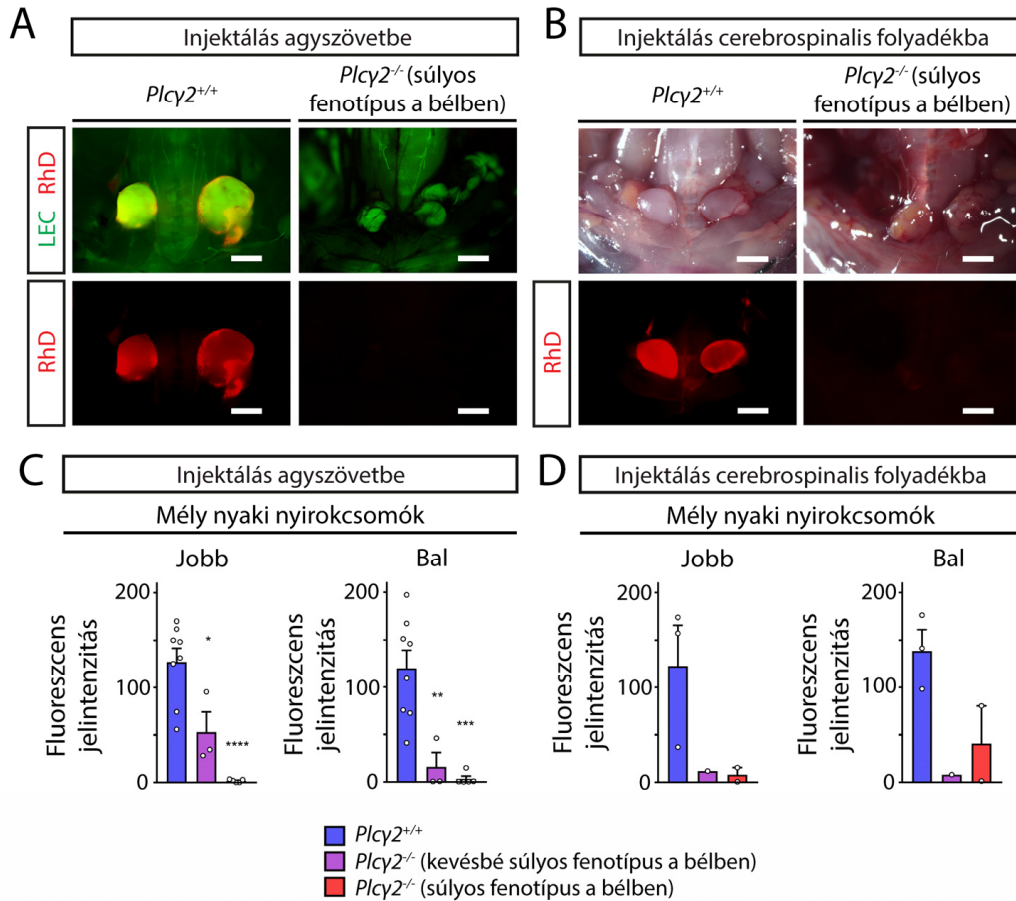
19. ábra: A talpbőrbe injektált makromolekula nyirokerek általi elvezetődése fiatal felnőtt kontroll és PLC γ 2 hiányos egerekben

A talpbőrbe injektált 70 kDa rhodamin dextrán nyirokerek általi elvezetődése a popliteális nyirokcsomók irányába fiatal felnőtt $Plc\gamma 2^{+/+}$, $Plc\gamma 2^{+/-}$ és $Plc\gamma 2^{-/-}$ egerekben. A nyilak a popliteális nyirokcsomóban megjelenő rhodamin dextránt jelölik. A mutatott képek 3 független kísérletből származó reprezentatív képek. Méretlépték: 1000 μ m.

4.4.2.3. A meningeális nyirokérhálózat funkciójának jellemzése

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódása megvalósul-e a PLC γ 2 hiányos egérmódelben. Ehhez 70 kDa rhodamin dextránt injektáltunk a kísérleti állatok agyszövetébe, valamint cerebrospinális folyadékába. Azt tapasztaltuk, hogy míg a $Plc\gamma 2^{+/+}$ egerekben a központi idegrendszerbe injektált makromolekulák mindkét injektálási technika esetében elszállítottak a mély nyaki nyirokcsomókba, a súlyos bélfenotípust mutató $Plc\gamma 2^{-/-}$ egerekben az injektált makromolekulák elvezetődése jelentős mértékben csökkent (20. ábra A,B panel). Ezen megfigyelésünket a nyirokcsomókban mérhető fluoreszcens jelintenzitás számszerűsítése is megerősítette (20. ábra C,D panel). A kevésbé súlyos bélfenotípust mutató $Plc\gamma 2^{-/-}$

egerek esetében a korábbi kísérletekhez hasonlóan azt tapasztaltuk, hogy mind az agyszövetbe, mind a cerebrospinális folyadékba történő injektálás esetén a súlyos bélfenotípust mutató $Plc\gamma 2^{-/-}$ egerekhez képest kisebb mértékben csökkent az elvezetődés a mély nyaki nyirokcsomók irányába (20. ábra C,D panel).



20. ábra: A makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítása a mély nyaki nyirokcsomókba fiatal felnőtt kontroll és PLC γ 2 hiányos egerekben

A,B: 70 kDa rhodamin dextrán megjelenése fiatal felnőtt $Plc\gamma 2^{+/+}$, valamint súlyos bélfenotípust mutató $Plc\gamma 2^{-/-}$ egerek mély nyaki nyirokcsomóiban a jelölt makromolekula agyszövetbe (A), illetve cerebrospinális folyadékba (cisterna magna) (B) való injektálását követően. A mutatott képek 2 vagy több független kísérletből származó reprezentatív képek. Méretlépték: 1000 μ m. **C,D:** A mély nyaki nyirokcsomókban mérhető fluoreszcens jelintenzitás mértéke fiatal felnőtt $Plc\gamma 2^{+/+}$, valamint súlyos és kevésbé súlyos bélfenotípust mutató $Plc\gamma 2^{-/-}$ egerek mély nyaki nyirokcsomóiban a 70 kDa rhodamin dextrán agyszövetbe (C), illetve cerebrospinális folyadékba (cisterna

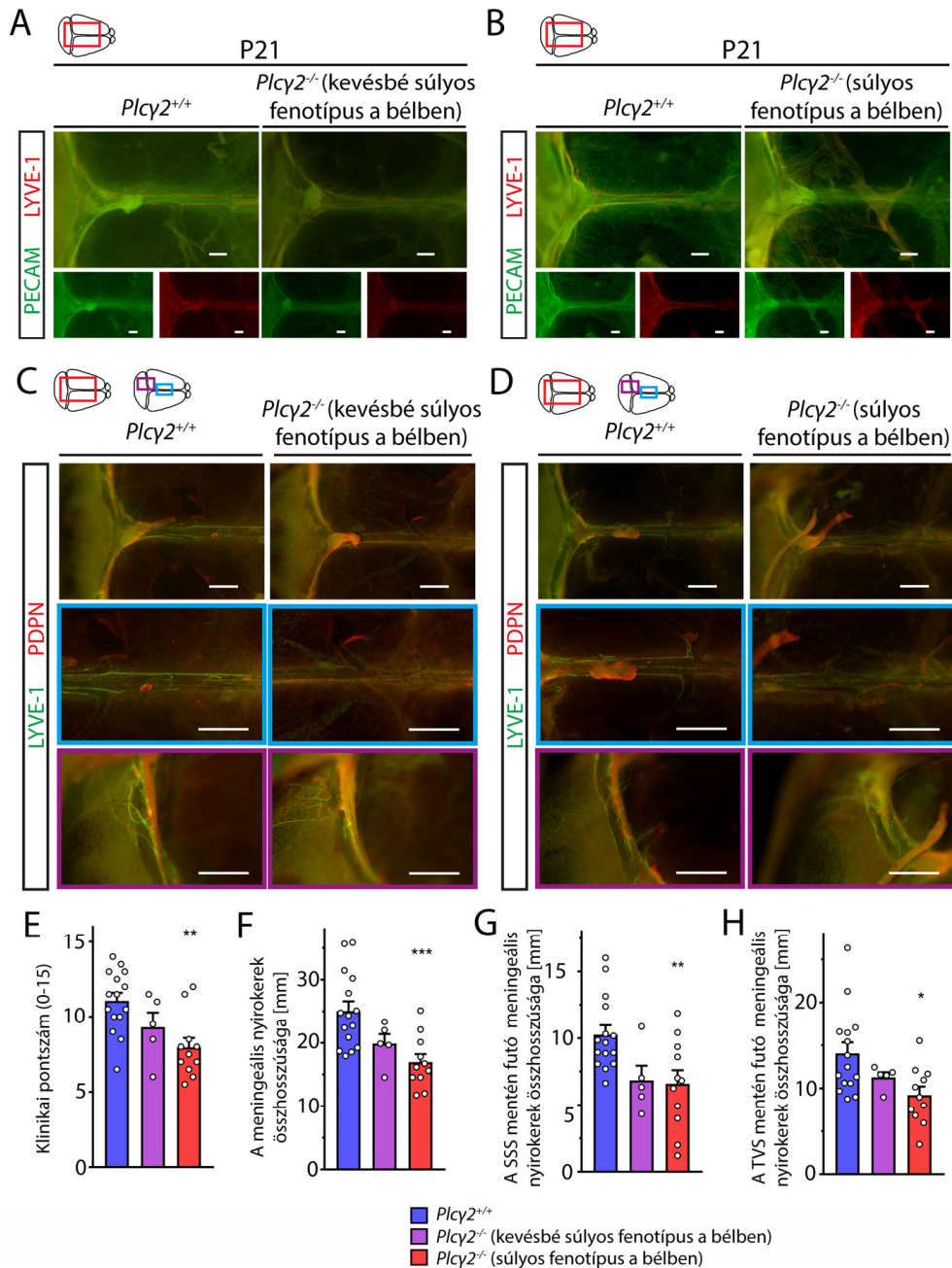
*magnaba) (D) való injektálását követően. Átlag \pm SEM; Egyutas varianciaanalízis; Dunnett-féle post-hoc test; $n \geq 2$ minden csoport esetén; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ a $Plc\gamma 2^{+/+}$ csoporttal összehasonlítva.*

Eredményeink alapján a PLC $\gamma 2$ hiányos egértörzsben károsodik a vérér- és nyirokérhálózatok elkülönülése, ami következtében a vér a nyirokerekbe áramlik és a nyirokerek vérrel kitöltötté válnak. A vérrel kitöltött nyirokérhálózatban károsodik a nyirokáramlás, így nem valósul meg a lipidek bélből való felvétele, valamint a bőrbe, illetve központi idegrendszerbe injektált makromolekulák elszállítódása. Megfigyeléseink szerint a nyirokáramlás károsodásának mértéke arányos a vérér- és nyirokérhálózatok elkülönülésének vékonybélben megfigyelhető károsodásának mértékével.

4.4.3. A károsodott nyirokáramlás hatása a keményagyhártya nyirokérhálózatának fejlődési programjára

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a PLC $\gamma 2$ hiányos egértörzsben megfigyelhető károsodott nyirokáramlás hatással van-e a meningeális nyirokérhálózat fejlődési programjára. Súlyos és kevésbé súlyos bélfenotípust mutató PLC $\gamma 2$ hiányos és testvérkontroll fiatal felnőtt egerek meningeális nyirokérhálózatának PECAM, LYVE-1 és PDPN markerekkel történő jellemzése során azt találtuk, hogy a $Plc\gamma 2^{-/-}$ egerekben a születést követő harmadik hét végén nem figyelhető meg a testvérkontroll egerek keményagyhártyájában jelen levő érett nyirokérhálózat (21. ábra A-D panel). A nyirokáramlás károsodásához hasonlóan, a meningeális nyirokérhálózat fejlődési programja kevésbé sérült a kevésbé súlyos bélfenotípust mutató PLC $\gamma 2$ hiányos egerekben (21. ábra A,C panel), míg a súlyos bélfenotípust mutató PLC $\gamma 2$ hiányos egerekben súlyosabb strukturális károsodást tapasztaltunk (21. ábra B,D panel). Ezen megfigyeléseink számszerű megerősítéséhez egy 0-15 pontig terjedő pontozási rendszer, valamint a keményagyhártyában detektálható nyirokerek összhosszának megmérése révén jellemeztük a meningeális nyirokérhálózatot. Eredményeink számszerűsítése megerősítette, hogy amelyik PLC $\gamma 2$ hiányos egerekben súlyosabb a bélben megfigyelhető fenotípus – és kifejezettebb a nyirokáramlás károsodásának mértéke – azokban az

egerekben a keményagyhártya nyirokérhálózatának fejlődési programja is nagyobb mértékben sérült (21. ábra E-H panel).

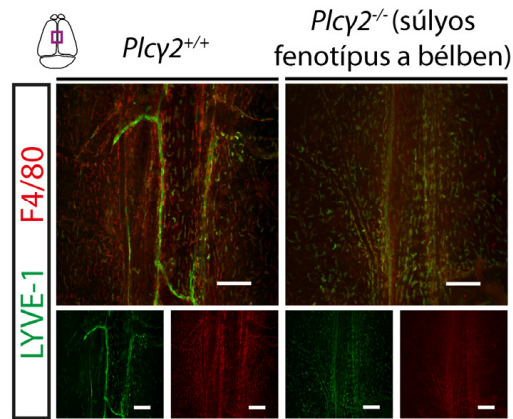


21. ábra: A meningeális nyirokérhálózat összehasonlítása fiatal felnőtt PLC γ 2 hiányos és testvérkontroll egerekben

A,B: PECAM és LYVE-1 fehérjék kifejeződése kevésbé súlyos (A) és súlyos (B) bélfenotípust mutató PLC γ 2 hiányos és testvérkontroll egerek keményagyhártyájában a minták teljes szöveti immunfestését követően. **C,D:** LYVE-1 és PDPN nyirokérmarkerek

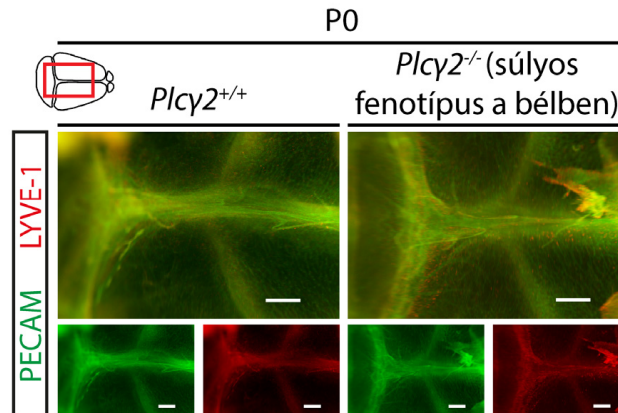
kifejeződése kevésbé súlyos (C) és súlyos (D) bélfenotípust mutató PLC γ 2 hiányos és testvérkontroll egerek keményagyhártyájában, a sinus sagittalis superior és a sinus transversus mentén. A mutatott képek 3 független kísérletből származó reprezentatív képek. Méretlépték: 500 μ m. **E:** A meningeális nyirokérhálózat jellemzése 0-15 pontig terjedő pontozási rendszer segítségével Plc γ 2^{+/+}, valamint kevésbé súlyos és súlyos bélfenotípust mutató Plc γ 2^{-/-} egerekben. Átlag \pm SEM; Egyutas varianciaanalízis; Dunnett-féle post-hoc test; $n \geq 3$ minden csoport esetén; ** $P < 0,01$ a Plc γ 2^{+/+} csoporttal összehasonlítva. **F-H:** A meningeális nyirokérhálózat összhosszúságának összehasonlítása Plc γ 2^{+/+}, valamint kevésbé súlyos és súlyos bélfenotípust mutató Plc γ 2^{-/-} egerekben. A grafikonok a teljes agyhártyában (F), a sinus sagittalis superior mentén (G), valamint a sinus transversus mentén (H) elhelyezkedő nyirokerek összhosszúságát jellemzik. Átlag \pm SEM; Egyutas varianciaanalízis; Dunnett-féle post-hoc test; $n \geq 3$ minden csoport esetén; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; a Plc γ 2^{+/+} csoporttal összehasonlítva.

További kísérleteink során a súlyos bélfenotípust mutató fiatal felnőtt PLC γ 2 hiányos egerekben a vad típusú testvérkontroll egerekhez képest nagyobb számban figyeltünk meg egymástól elkülönülten elhelyezkedő LYVE-1 fehérjét kifejező sejtet (22. ábra).



22. ábra: Egymástól elkülönülten elhelyezkedő LYVE-1 pozitív sejtet fiatal felnőtt PLC γ 2 hiányos és testvérkontroll egerek keményagyhártyájában
LYVE-1 és F4/80 fehérjék kifejeződése súlyos bélfenotípust mutató PLC γ 2 hiányos és testvérkontroll egerek keményagyhártyájában a sinus sagittalis superior környezetében a minták teljes szöveti immunfestését követően. A mutatott képek 3 független kísérletből származó reprezentatív képek. Méretlépték: 200 μ m.

A fiatal felnőtt korú egerek meningeális nyirokérhálózatának jellemzését követően kontroll kísérletként újszülött korú PLC γ 2 hiányos egerekben is vizsgáltuk a meningeális nyirokereket. Az újszülött korú, súlyos bélfenotípust mutató PLC γ 2 hiányos és testvérkontroll egerek keményagyhártyájának általános endothel (PECAM) és nyirokendothel (LYVE-1) markerek elleni teljes szöveti immunfestése során nem tapasztaltunk lényeges eltérést a két csoport között (23. ábra).



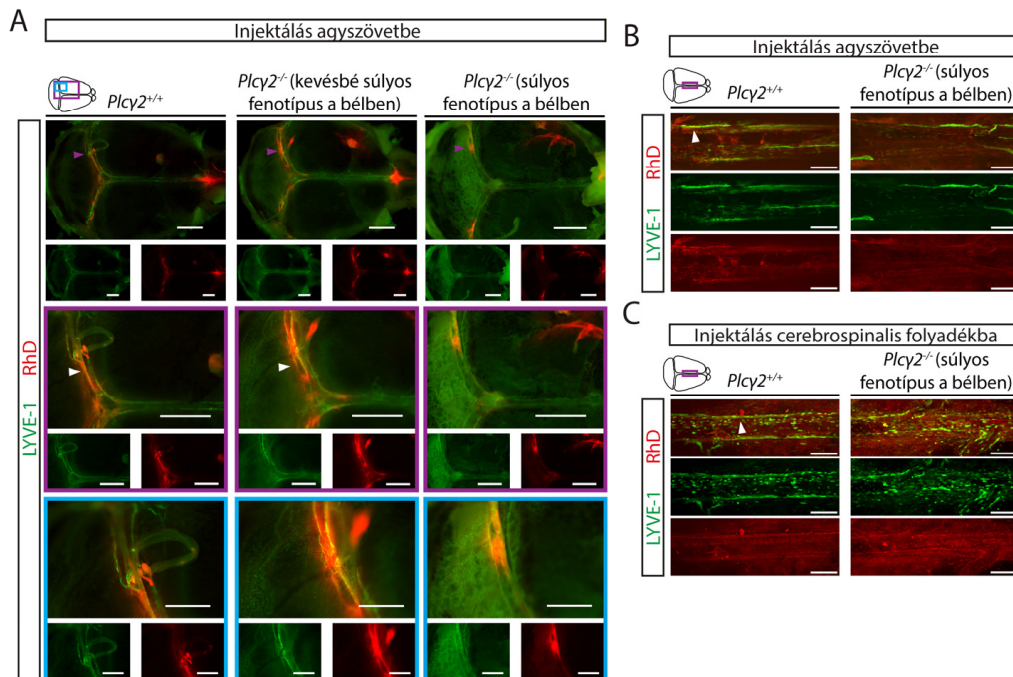
23. ábra: A meningeális nyirokérhálózat összehasonlítása újszülött korú PLC γ 2 hiányos és testvérkontroll egerekben

PECAM és LYVE-1 fehérjék kifejeződése súlyos bélfenotípust mutató PLC γ 2 hiányos és testvérkontroll egerek keményagyhártyájában a minták teljes szöveti immunfestését követően. A mutatott képek 3 független kísérletből származó reprezentatív képek. Méretlépték: 500 μ m.

4.4.4. A makromolekulák központi idegrendszerből való felvételének vizsgálata fiatal felnőtt PLC γ 2 hiányos egerekben

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a károsodott áramlású PLC γ 2 hiányos egerekben megfigyelhető éretlen meningeális nyirokérhálózat esetén sérül-e a makromolekulák agyszövetből való felvétele. 70 kDa rhodamin dextrán fiatal felnőtt *Plc γ 2^{-/-}* és vad típusú testvérkontroll egerek agyszövetbe való injektálását követően azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú egerekben értekezésemben korábban bemutatott módon megvalósul az injektált jelölt makromolekulák központi idegrendszerből való felvétele a meningeális nyirokerekbe (24. ábra A panel). Ezzel szemben a súlyos bélfenotípust mutató PLC γ 2 hiányos egerekben azt tapasztaltuk, hogy a károsodott a makromolekulák meningeális

nyirokerekbe való felvétele. A kevésbé súlyos bélfenotípust mutató PLC γ 2 hiányos egerek esetében kisebb mértékű eltérést detektáltunk (24. ábra A panel). A makromolekulák felvételének vizsgálatakor megfigyeltünk olyan struktúrákat a *sinus transversussal* párhuzamosan lefutó nyirokerekben, amelyek valószínűsíthetően kitüntetett szereppel bírnak a meningeális nyirokerek és a központi idegrendszer közötti kapcsolatban. A súlyos bélfenotípust mutató PLC γ 2 hiányos egerek esetében nem volt megfigyelhető a makromolekulák felvétele a meningeális nyirokerekbe, míg ezen kitüntetett helyeken detektálható volt a jelölt makromolekula (24. ábra A panel). A makromolekulák meningeális nyirokerek általi felvételét konfokális mikroszkóppal is vizsgáltuk. Ezzel a megközelítéssel megerősítettük, hogy a vad típusú egerekben a 70 kDa rhodamin dextrán agyszövetbe és cerebrospinalis folyadékba való injektálása esetén egyaránt megvalósul a makromolekulák felvétele a meningeális nyirokerekbe. Ezzel szemben a súlyos bélfenotípust mutató PLC γ 2 hiányos egerekben mindkét injektálási eljárás esetén azt tapasztaltuk, hogy károsodott a makromolekulák meningeális nyirokerekbe való felvétele (24. ábra B,C panel).



24. ábra: Fluoreszcensen jelölt makromolekulák meningeális nyirokerekbe való felvétele fiatal felnőtt PLC γ 2 hiányos és testvérkontroll egerekben

A: Agyszövetbe injektált 70 kDa molekulatömegű rhodamin dextrán felvétele a meningeális nyirokerek által fiatal felnőtt súlyos és kevésbé súlyos bélfenotípust mutató

PLC γ 2 hiányos, valamint testvérkontroll egerek keményagyhártyájában. Méretlépték: 1000 μ m. **B,C**: 70 kDa molekulatömegű rhodamin dextrán felvétele a meningeális nyirokerek által fiatal felnőtt súlyos bélfenotípust mutató PLC γ 2 hiányos, valamint testvérkontroll egerek keményagyhártyájában a jelölt makromolekula agyszövetbe (**B**), valamint cerebrospinális folyadékba való injektálását (**C**) követően. Méretlépték: 200 μ m. A nyilak a meningeális nyirokerekben megjelenő rhodamin dextránt jelölik. A mutatott képek 3 független kísérletből származó reprezentatív képek. Lila nyilak: a „kitüntetett struktúrák” helye a sinus transversus mentén futó nyirokerekben. Fehér nyilak: rhodamin dextrán megjelenése a meningeális nyirokerekben

Ezen eredményeink alapján a PLC γ 2 hiányos egérmódelben károsodik a nyirokáramlás, ami következtében sérül a keményagyhártya nyirokérhálózatának fejlődési programja és nem valósul meg az agyszövetbe, illetve a cerebrospinális folyadékba injektált makromolekulák meningeális nyirokerekbe történő felvétele.

4.5. A VEGFR-3 nyirokérnövekedési jelpálya szerepének vizsgálata a placenta spirális artériáinak strukturális átalakulásában

További kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy milyen szerepet játszik a nyirokerek fejlődési és érési folyamatait meghatározó VEGFR-3 molekuláris jelpálya a spirális artériák strukturális átalakulása során.

4.5.1. Nyirokér-markerek kifejeződése a spirális artériák endothelsejtjeiben a spirális artériák strukturális átalakulása során

A korábbi megfigyelések szerint egerekben a spirális artériák strukturális átalakulása a GD10.5 – GD14.5 időszakban valósul meg [197]. Kollaborációs partnereink – Kathleen Caron és munkacsoportja – előzetes kísérleteik során szöveti immunhisztokémia segítségével kimutatták, hogy egérembriókban GD11.5 korban a spirális artériák rendelkeznek az artériás rendszerre jellemző simaizom-borítással. Ezen túlmenően GD11.5 korban PROX-1 pozitív endothelsejtek figyelhetők meg a spirális artériák falában. Megfigyeléseik szerint GD13.5 korban ezzel szemben a spirális artériák elveszítik simaizom-borításukat, valamint a PROX-1 mellett az endothelsejteken

megjelenik a VEGFR-3 fehérje is. GD13.5 időpontban a PROX-1 és VEGFR-3 markereket egyaránt kifejező sejtek között elszórtan megfigyelhetők voltak LYVE-1-et is kifejező sejtek is [II]. Ezen eredmények alapján a spirális artériák strukturális átalakulásuk során nyirokerekre és vérerekre jellemző molekuláris markereket egyaránt kifejező hibrid típusú erekké alakulnak át.

4.5.2. A VEGFR-3 jelátviteli útvonal spirális artériák strukturális átalakulásában betöltött szerepének vizsgálata

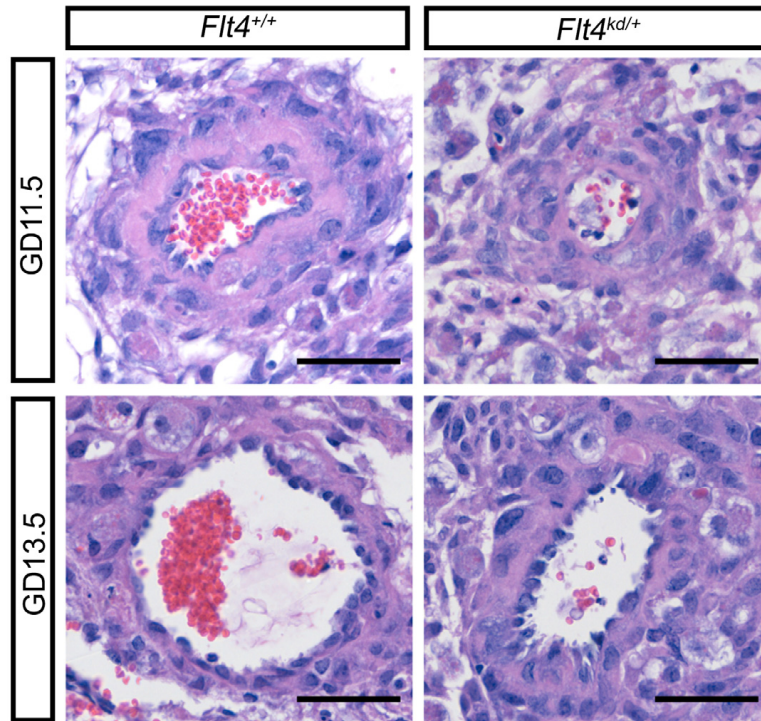
Az, hogy a spirális artériák strukturális átalakulása során az endothelsejtek felszínén kifejeződik az általános nyirokérnövekedési programban központi szerepet betöltő VEGFR-3 fehérje, felveti, hogy a VEGFR-3 jelpálya szerepet játszhat a spirális artériák strukturális átalakulásában. Kísérleteink során az *Flt4^{kd/+}* egértörzs segítségével vizsgáltuk a VEGFR-3 jelpálya szerepét a spirális artériák strukturális átalakulásában, amely egértörzsben a VEGFR-3 fehérjét kódoló *Flt4* gén tirozin kináz domén szakaszán jelen lévő pontmutáció hatására gátlódik a receptor tirozin kináz aktivitása [216].

4.5.2.1. A spirális artériák strukturális átalakulási folyamatának jellemzése VEGFR-3 jelátviteli útvonalának sérülése esetén

Az irodalmi adatok alapján a spirális artériák strukturális átalakulására jellemző az erek átmérőjének megnövekedése, az endothelsejtek sejtosztódásának fokozódása, az erek simaizom-borításának csökkenése, valamint a magzati eredetű trophoblasztsejtek spirális artériák környezetében való megjelenése [193, 194]. A VEGFR-3 jelátviteli útvonal spirális artériák strukturális átalakulásában betöltött szerepének jellemzésére a GD11.5 – GD13.5 időszakban követtük a spirális artériák keresztmetszetének, valamint simaizom-borítottságának megváltozását *Flt4^{+/+}* és *Flt4^{kd/+}* nőtények placentáiban.

Elsőként *Flt4^{+/+}* és *Flt4^{kd/+}* nőtényekből származó placentaminták rutin HE szövettani festésével jellemeztük a spirális artériák szerkezetét abban az időszakban, amelyben azok strukturális átalakulása megvalósul. GD11.5 időszakból származó minták esetében nem tapasztaltunk lényeges eltérést az *Flt4^{+/+}* és *Flt4^{kd/+}* egerekből származó spirális artériák szerkezetében. GD13.5 időszakból származó minták vizsgálata során azonban azt tapasztaltuk, hogy míg az *Flt4^{+/+}* egerekben a spirális artériák jelentős

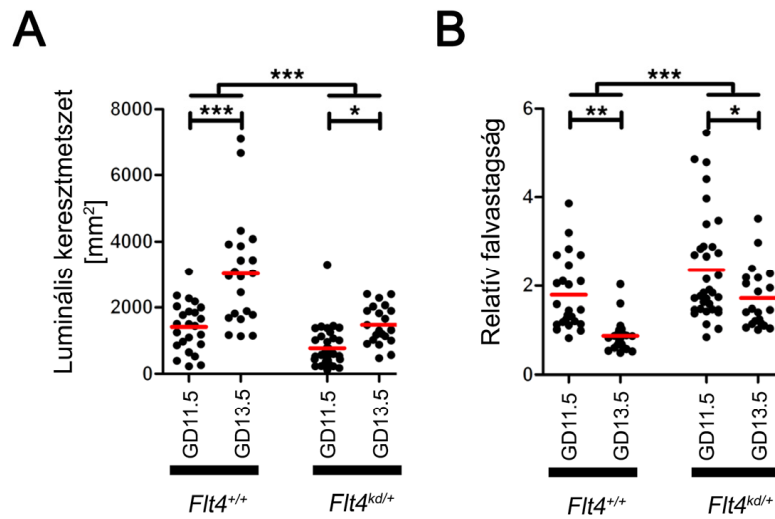
mértékben kitágultak, addig az $Flt4^{kd/+}$ nőstényekből származó mintákban az érlumen sokkal kisebb mértékű növekedése volt megfigyelhető (25. ábra).



25. ábra: A spirális artériák strukturális átalakulásának szövettani jellemzése $Flt4^{+/+}$ és $Flt4^{kd/+}$ egerekből származó placentákban

A placenták spirális artériáinak szerkezete GD11.5 és GD13.5 időpontban rutin HE szövettani festés segítségével. A mutatott képek 3 különböző almon végzett kísérletek eredményeit bemutató reprezentatív képek. Méretlépték: 50 μ m.

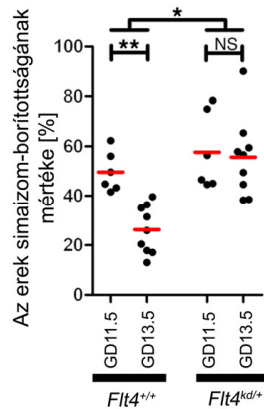
A szövettani mintákon megfigyelt eltérések számszerűsítéséhez megmértük a spirális artériák luminális keresztmetszetét, valamint az erek luminális keresztmetszetre vonatkoztatott relatív falvastagságát az egyes mintákban. Azt tapasztaltuk, hogy míg az $Flt4^{+/+}$ nőstények esetében a spirális artériák luminális keresztmetszete jelentősen megnőtt, addig az $Flt4^{kd/+}$ nőstények esetében a spirális artériák luminális keresztmetszetében sokkal kisebb mértékű növekedés volt detektálható (26. ábra A panel). Ezzel párhuzamosan azt figyeltük meg, hogy az erek luminális keresztmetszetére vonatkoztatott relatív falvastagsága sokkal kisebb mértékben csökkent az $Flt4^{kd/+}$ nőstények esetében a spirális artériák strukturális átalakulásának időszakában, mint az $Flt4^{+/+}$ nőstényekben (26. ábra B panel).



26. ábra: Az egerplacenták spirális artériáinak keresztmetszetében bekövetkező változások számszerű jellemzése azok strukturális átalakulása során

A,B: Az *Flt4*^{+/+} és *Flt4*^{kd/+} nőstényekből származó egerplacenták spirális artériáinak luminális keresztmetszetében (A), valamint az erek luminális keresztmetszetére vonatkoztatott relatív falvastagságában (B) GD11.5 és GD13.5 időpont között bekövetkező változások számszerűsítése. Kétutas varianciaanalízis, Bonferroni post-hoc teszt; n=21-35 darab placenta (3 különböző alomból) csoportonként; *P<0,05 ; **P<0,01; ***P<0,001. Az adott csoport értékeinek átlagát a grafikonon piros vonal jelöli.

Ezt követően a placentamintákból készített szövettani metszetek simaizomsejt-specifikus α -SMA-ellenes immunfestését követően azt tapasztaltuk, hogy míg az *Flt4*^{+/+} egerekből származó placenták spirális artériáinak simaizom-borítottsága jelentős mértékben csökkent a GD11.5 – GD13.5 időszakban, addig az *Flt4*^{kd/+} nőstények esetében az erek simaizom-borítottsága nem változott jelentősen (27. ábra).

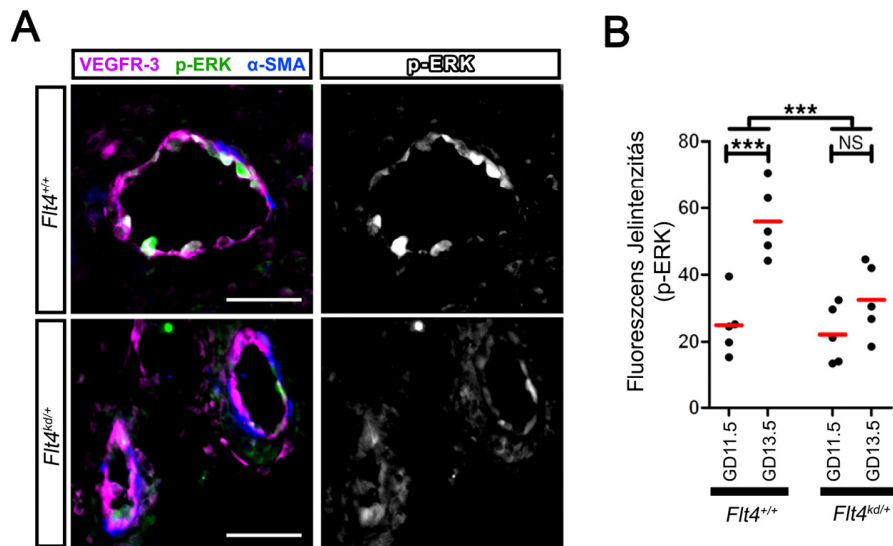


27. ábra: A spirális artériák simaizom-borítottságának összehasonlítása *Flt4*^{+/+} és *Flt4*^{kd/+} egerekben

A spirális artériák területének simaizommal való beborítottságának százalékos aránya GD11.5 és GD13.5 időpontokban készített placenta szövetminták immunfestését követően. Kétutas varianciaanalízis, Bonferroni post-hoc test; n=6-9 darab placenta (3 külön alomból) csoportonként; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Az adott csoport értékeinek átlagát a grafikonon piros vonal jelöli.

4.5.2.2. A VEGFR-3 tirozin kináz aktivitásának jellemzése *Flt4*^{kd/+} egerek spirális artériáiban

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a spirális artériák VEGFR-3 pozitív sejtjeiben hogyan változik a VEGFR-3 intracelluláris foszforilációs jelátviteli kaszkádjában szereplő ERK fehérje foszforilációja a spirális artériák strukturális átalakulása során. Az *Flt4*^{+/+} egerekből származó placenták spirális artériáiban a foszforilált ERK fehérje szintjének növekedését tapasztaltuk a GD11.5 – GD13.5 időszakban, míg az *Flt4*^{kd/+} egértörzsben – annak ellenére, hogy a VEGFR-3 fehérje jelen volt az *Flt4*^{kd/+} egerekből származó placenták spirális artériáinak endotheliumában is – nem volt megfigyelhető a foszforilált ERK fehérje szintjének megemelkedése ugyanebben az időszakban (28. ábra), ami megerősíti, hogy a spirális artériák falában található VEGFR-3 kináz-aktivitása és intracelluláris jelátvitel gátolt az *Flt4*^{kd/+} egértörzsben.



28. ábra: A VEGFR-3 fehérje jelenlétének és tirozin kináz aktivitásának jellemzése GD11.5 és GD13.5 időpontokban $Flt4^{kd/+}$ és $Flt4^{+/+}$ egerek spirális artériájában

A: VEGFR-3, foszforilált ERK (p-ERK), és α -SMA fehérjék kifejeződése a placenta spirális artériájában GD13.5 időpontban készített placenta szövetminták immunfestésével. Méretlépték: 50 μ m. **B:** A foszforilált ERK (p-ERK) ellenes antitesttel mérhető MFI értéke GD11.5 és GD13.5 időpontokban $Flt4^{+/+}$ és $Flt4^{kd/+}$ egerplacentákból készített szövetminták immunfestését követően. Kétutas varianciaanalízis, Bonferroni post-hoc test; $n=5$ darab placenta (3 különböző alomból) csoportonként; $***P<0,001$. Az adott csoport értékeinek átlagát a grafikonon piros vonal jelöli.

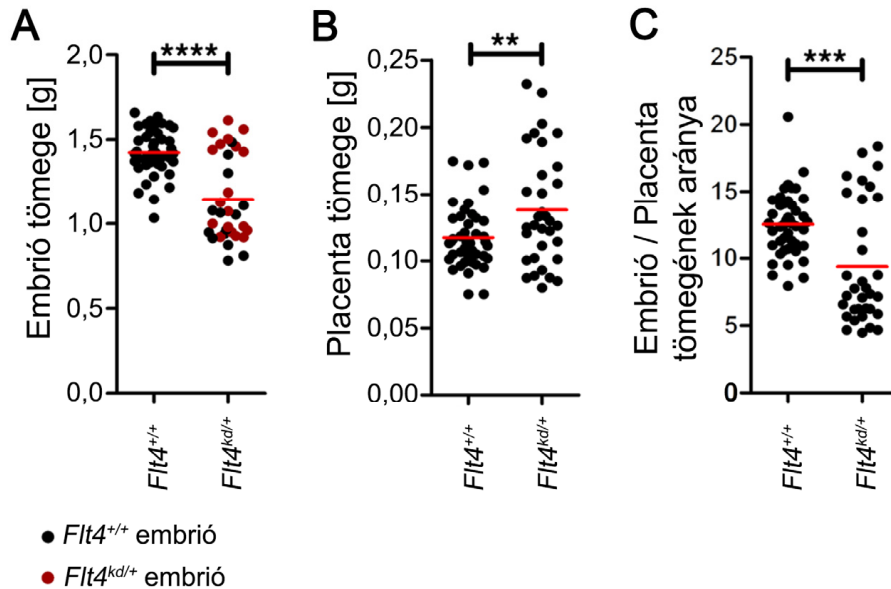
4.5.3. A károsodott VEGFR-3 jelpálya következményeinek vizsgálata a vemhesség során $Flt4^{kd/+}$ egértörzsben

Az emberi terhességek során a spirális artériák strukturális átalakulásának hiányában preeclampsia alakulhat ki [192, 193]. A humán preeclampsia jellemző tünetei lehetnek az anyánál jelentkező magas vérnyomás, proteinuria, illetve veseelégtelenség, valamint a magzat növekedésének károsodása [192, 201-203]. Mivel eredményeink alapján a VEGFR-3 intracelluláris jelpályájának $Flt4^{kd/+}$ egerekben bekövetkező károsodása esetén sérül a spirális artériák strukturális átalakulása, felmerült, hogy a humán preeclampsia

klasszikus tünetei is jelentkezhetnek az $Flt4^{kd/+}$ egerekben. Ezért következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy az $Flt4^{kd/+}$ egerek vemhessége során megfigyelhető-e a humán preeclampsia során bekövetkező folyamatok.

4.5.3.1. Az embriók, illetve placenták tömegének változása a VEGFR-3 jelpálya károsodásának hatására

Ezen folyamatok közül elsőként a VEGFR-3 jelpálya károsodásának hatására az embriók és a placenták tömegében bekövetkező változásokat vizsgáltuk az $Flt4^{kd/+}$ egerekben. Az $Flt4^{kd/+}$ nőstényekből izolált embriók tömege jelentősen elmaradt az $Flt4^{+/+}$ nőstényekből izolált embriók tömegétől a GD18.5 időpontban. Az $Flt4^{kd/+}$ és vad típusú egérembriók tömegében nem tapasztaltunk eltérést (29. ábra A panel). Ezzel párhuzamosan az $Flt4^{kd/+}$ nőstényekből izolált placenták tömege meghaladta az $Flt4^{+/+}$ nőstényekből származó placenták tömegét (29. ábra B panel). Az egyes embriók és a hozzájuk tartozó placenták tömegének aránya $Flt4^{kd/+}$ anyák esetén alacsonyabbnak adódott, mint az $Flt4^{+/+}$ anyákból származó embriók esetén (29. ábra C panel).



29. ábra: $Flt4^{+/+}$ és $Flt4^{kd/+}$ egerekből származó embriók és placenták tömegének jellemzése

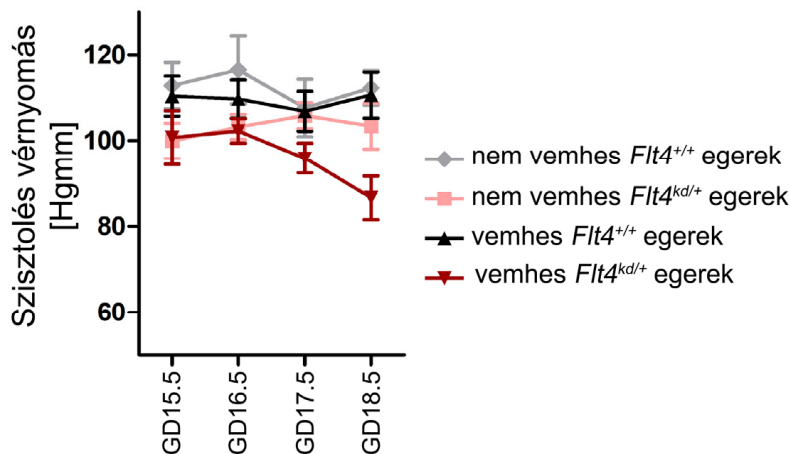
A,B: GD18.5 időpontban izolált embriók (A) és placenták (B) tömege. C: Az izolált embriók és a hozzájuk tartozó placenták tömegének aránya. $n=33-44$ embrió és placenta

(3 különböző alomból) csoportonként. Kétmintás *t*-próba. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Az adott csoport értékeinek átlagát a grafikonon piros vonal jelöli.

Megfigyeléseink szerint tehát a GD18.5 időpontban $Flt4^{kd/+}$ egerekből izolált embriók és placenták tömege, illetve az összetartozó embriók és placenták tömegének aránya statisztikailag szignifikáns mértékben eltér az $Flt4^{+/+}$ egereknél megfigyelhető értékektől.

4.5.3.2. A VEGFR-3 jelpálya károsodásának hatására a vemhes nőstényekben kialakuló fenotípus jellemzése

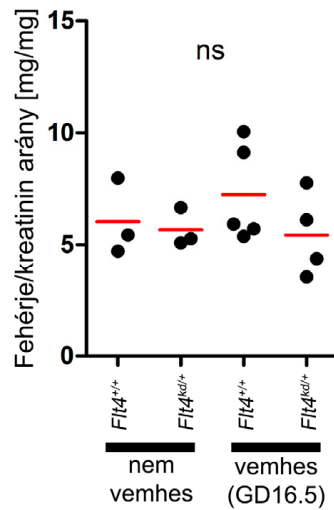
Annak vizsgálatára, hogy a humán preeclampsia során jelentkező magas vérnyomás megfigyelhető-e VEGFR-3 jelpálya károsodása esetén az érintett egerek vemhessége során, nem vemhes és vemhes $Flt4^{+/+}$ és $Flt4^{kd/+}$ egerek farokartérián mért szisztolés vérnyomását hasonlítottuk össze mandzsettás kisállatvérnyomásmérő segítségével. A humán preeclampsianál megfigyeltektől eltérően nem tapasztaltunk emelkedett vérnyomást $Flt4^{kd/+}$ egerekben GD15.5 és GD18.5 időpontok között sem a vemhes $Flt4^{+/+}$ egerekkel, sem a nem vemhes nőstényekkel összehasonlítva (30. ábra).



30. ábra: $Flt4^{+/+}$ és $Flt4^{kd/+}$ nőstények szisztolés vérnyomásának követése nem vemhes és vemhes egerekben a vemhesség GD15.5 -GD18.5 közötti időszakában

A grafikon csoportonként $n=5-13$ nőstény egymást követő 4 napon mért vérnyomásadatait mutatja.

A magas vérnyomás mellett a humán terhességek során a preeclampsia egyik jellemző tünete lehet a fehérjék vizeletben való megjelenése. Annak vizsgálatára, hogy a proteinuria megfigyelhető-e VEGFR-3 jelpálya károsodása esetén az érintett egerek vemhessége során, nem vemhes és vemhes $Flt4^{+/+}$ és $Flt4^{kd/+}$ egerek vizeletmintájának kreatinin-tartalmára vonatkoztatott fehérjetartalmát hasonlítottuk össze. Kísérleteinkben nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a vemhes és nem vemhes $Flt4^{+/+}$ és $Flt4^{kd/+}$ egerek vizeletének fehérjetartalmában (31. ábra).

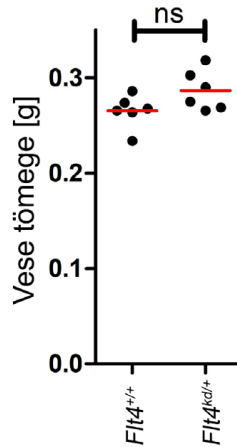


31. ábra: Nem vemhes és GD16.5 időszakban lévő vemhes $Flt4^{+/+}$ és $Flt4^{kd/+}$ egerek vizeletmintájának kreatinin-tartalmára vonatkoztatott fehérjetartalmának összehasonlítása

Az összehasonlítás során csoportonként $n=3-5$ egér vizeletmintájának kreatinin-tartalmára vonatkoztatott fehérjetartalmát vizsgáltuk. Kétutas varianciaanalízis. Szignifikanciaszint: ns: nem szignifikáns. Az adott csoport értékeinek átlagát a grafikonon piros vonal jelöli.

A humán preeclampsia során anyai veseelégtelenség alakulhat ki. Annak vizsgálatára, hogy az anyai veseszövet károsodása megfigyelhető-e VEGFR-3 jelpálya sérülése esetén az egerek vemhessége során, $Flt4^{+/+}$ és $Flt4^{kd/+}$ egerek GD18 időszakban történő terminációját követően kimetszettük a nőstény egerek veséit, és lemértük a vesék tömegét, majd a vesékből szövettani metszeteket készítettünk. Kísérleteinkben az $Flt4^{kd/+}$ nőstényekből izolált veseminták tömegében enyhe emelkedést tapasztaltunk az $Flt4^{+/+}$ egerekből származó veseminták tömegéhez képest, azonban az eltérés nem adódott

szignifikánsnak (32. ábra). A veseminták rutin szövettani vizsgálata során ezzel összhangban nem tapasztaltunk különbséget a vesék szerkezetében [II].



32. ábra: *Flt4*^{+/+} és *Flt4*^{kd/+} egerekből GD18.5 időpontban izolált vesék tömegének vizsgálata

Az összehasonlítás során csoportonként n=6 egér vesemintájának tömegét vizsgáltuk. Kétmintás t-próba. Szignifikanciaszint: ns: nem szignifikáns. Az adott csoport értékeinek átlagát a grafikonon piros vonal jelöli.

Megfigyeléseink alapján a placenta spirális artériáinak strukturális átalakulása során a spirális artériák endothelsejtjei nyirokendothel-specifikus markereket (PROX-1, VEGFR-3, LYVE-1) és vérér-specifikus markereket egyaránt kifejező hibrid tulajdonságú erekké alakulnak. Eredményeink alapján a VEGFR-3 jelpálya károsodása esetén nem valósul meg a spirális artériák strukturális átalakulása, és sérül az embriók növekedése. Kísérleteinkben nem tapasztaltunk eltérést a vad típusú és *Flt4*^{kd/+} nőstények szisztolés vérnyomásában, az anyák vizeletében megjelenő fehérje mennyiségében és az anyák veséinek tömegében a vemhesség késői szakaszában.

5. Megbeszélés

Az értekezésemben bemutatott kísérleteink során egérmodellek segítségével vizsgáltuk a nyirokerek fejlődését irányító mechanizmusok szervspecifikus szerepét a keményagyhártyában és a placentában.

A meningeális nyirokerek jelenlétének megerősítéséig általánosan elfogadott nézet volt, hogy a központi idegrendszerre nem jellemző a nyirokerek jelenléte [1-3], amely elgondolást két 2015-ben közölt publikáció változtatta meg [137, 138]. Habár a felfedezésük óta eltelt néhány évben számos közlemény foglalkozott a meningeális nyirokerekkel, jelenleg kevés ismerettel rendelkezünk élettani és kórélettani folyamatokban betöltött szerepükről, valamint fejlődésükről.

Kísérleteink során elsőként egér agyhártyaminták teljes szöveti immunfestése révén jellemeztük a keményagyhártyában megfigyelhető nyirokérstruktúrákat. Eredményeink szerint a meningeális nyirokerek egyaránt kifejezik a LYVE-1, PROX-1, VEGFR-3, PDPN nyirokérmarkereket és a PECAM általános endothelmarkert (7. ábra), amely eredmény összhangban van a korábbi megfigyelésekkel [137, 138, 140, 141, 161].

Ezt követően a makromolekulák központi idegrendszerből való elvezetődését vizsgáltuk. Ehhez 70 kDa és 40 kDa molekulatömegű fluoreszcensen jelölt makromolekulákat injektáltunk kísérleti egerek agyszövetébe, valamint cerebroszpinális folyadékába. Kísérleti eredményeink szerint az agyszövetbe, illetve a cerebroszpinális folyadékba injektált makromolekulák az egerek mély nyaki nyirokcsomóiba vezetődnek el (8. ábra), amely megfigyelés egybecseng a korábbi tanulmányokban leírt eredményekkel [137, 138, 140, 149, 161]. A nyirokcsomókban mérhető fluoreszcens jelintenzitáshoz a nyirokerek által felvett és elszállított molekulák mellett a jelölt makromolekulákat felvevő, majd a nyirokcsomókba elszállító immunsejtek által okozott jel is hozzájárul. A különböző molekulatömegű makromolekulák immunsejtek általi felvétele eltérő mértékben valósulhat meg, aminek következtében nyirokcsomókban mérhető jelintenzitás mértéke eltérő lehet az egyes makromolekulák esetén. Az agyszövetbe injektált fluoreszcensen jelölt makromolekulák mély nyaki nyirokcsomókba való elvezetődésében enyhe ipszilaterális dominanciát figyeltünk meg, ami összhangban van a korábbi megfigyelésekkel [137, 224-228].

A klasszikus elgondolás szerint a központi idegrendszerbe injektált makromolekulák a nyaki nyirokcsomókba perineurális [151-153], illetve paravaszkuláris [160]

útvonalakon, valamint az arachnoid réteg villusai közvetítésével, a meningeális szinuszokon keresztül [154, 155] kerülnek elvezetődésre. A főleg a keményagyhártya vénás szinuszaival párhuzamosan lefutó meningeális nyirokerek felfedezésével felmerült azok szerepe a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódásában [169]. A kutatási eredmények egy része azt mutatja, hogy a keményagyhártya nyirokérhálózata részt vesz a makromolekulák és leukociták központi idegrendszerből való felvételében és elszállítódásában [137, 138, 141, 147, 161]. Ezzel szemben más kutatók kísérleteik során nem tudták detektálni a központi idegrendszerbe injektált makromolekulák meningeális nyirokerekben keresztüli elszállítódását [160, 163, 164]. A jelenleg rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján tehát nem dönthető el egyértelműen, hogy a meningeális nyirokerek részt vesznek-e a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódásában. Ezért kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a kísérleti állatok központi idegrendszerébe injektált fluoreszcensen jelölt makromolekulákat felveszik-e a keményagyhártya nyirokerei. Eredményeink alapján a keményagyhártya nyirokerei felveszik a központi idegrendszerbe injektált makromolekulákat (9. ábra). Kísérleteink során megfigyeltünk kitüntetett helyeket a *sinus transversus* mentén, amelyknél fokozott mértékű rhodamin dextrán-jelet tapasztaltunk (9. és 24. ábra). Hasonló, kitüntetett struktúrákat más kutatócsoportok is megfigyeltek kísérleteik során [141, 147]. Ezen struktúrák feltételezhetően szerepet játszanak a makromolekulák központi idegrendszerből a meningeális nyirokerekbe való felvételében. Ezen eredményeink alapján a keményagyhártya nyirokerei részt vesznek a központi idegrendszerbe injektált makromolekulák felvételében és mély nyaki nyirokcsomók irányába történő elszállítódásában. Egy eredményeink közlését követően publikált tanulmány szerint a meningeális nyirokerek részt vesznek a vörösvértetek központi idegrendszerből való elszállításában [229], ami szintén támogatja az az elképzelést, miszerint a keményagyhártya nyirokérhálózata hozzájárul a makromolekulák és sejtek központi idegrendszerből való felvételéhez és elszállításához. A keményagyhártya nyirokerei és a központi idegrendszer folyadékháztartása közötti kapcsolat megértéséhez további *in vivo* vizsgálatok szükségesek.

Annak, hogy a meningeális nyirokerek makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódásában betöltött szerepét vizsgáló különböző kísérleti megfigyelések között eltérések tapasztalhatóak, számos technikai oka lehet. A makromolekulák központi

idegrendszerből való elszállítódását megcélzó kísérletek során a makromolekulákat jellemzően altatott kísérleti állatok cerebrospinális folyadékába, vagy agyszövetébe injektálják, majd a makromolekulák elszállítódását az állatok terminálását követően vizsgálják. Egy kutatócsoport nemrégiben közlésre került kísérleti eredményei alapján a kísérleti állatok altatása hatással lehet a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódására [162, 163]. Ezen túlmenően azt is megfigyelték, hogy az állatok terminálását követően a cerebrospinális folyadékba injektált makromolekulák retrográd áramlása valósul meg a perivaszkuláris térbe, amely folyamat élő állatokban nem figyelhető meg [163]. Ez arra utal, hogy a kísérleti állatok altatása, valamint a termináció során a vérnyomásban bekövetkező változások hatással lehetnek a kísérletekben kapott eredményekre. Fontos megjegyezni, hogy az idézett tanulmányban bemutatott kísérletek során nem figyelték meg a jelölt makromolekulák meningeális nyirokerekbe való retrográd áramlását a kísérleti állatok terminálását követően.

A jelenleg alkalmazott kísérletes megközelítések során a vizsgált jelölt makromolekulát injektálással juttatják be a kísérleti állatok központi idegrendszerébe. A mérési eredmények szerint az injektálás, valamint a tú eltávolítása is hatással lehet a koponyaűri nyomásra [161]. Ennek kiküszöbölése érdekében kísérleteinkben – más kutatócsoportokhoz hasonlóan [137, 140, 141, 147, 160-163] – az oldatok injektálását lassan végeztük, és a tút az injektálást követően 5 perccel, lassan távolítottuk el. Mindazonáltal fontos előrelépést jelentene a terület számára egy olyan kísérleti modell kidolgozása, amelyben a jelölt makromolekulák központi idegrendszerben való megjelenése injektálás nélkül is megvalósul (például a jelölt molekula egy transzgenikus egértörzsben endogén módon a kísérleti állat központi idegrendszerében termelődik), azonban jelenleg nem áll rendelkezésre ilyen kísérleti megközelítés.

Nemrégiben közölt kísérleti eredmények alapján a meningeális nyirokerek az általános nyirokérfelődési programtól eltérően a születést követő időszakban alakulnak ki, és fejlődésükben fontos szerepet játszik a VEGFR-3 VEGF-C általi aktiválódása [140, 171]. Jelenleg azonban nem áll rendelkezésre információ arról, hogy más, a nyirokerek fejlődési és érési folyamatait általánosságban meghatározó faktorok szerepet játszanak-e a meningeális nyirokerek szervspecifikus növekedési programjában.

A meningeális nyirokerek születést követően megvalósuló fejlődésének vizsgálata során a fiatal felnőtt korú (21-32 napos) egerekben a korábbi kísérleteinkben is

megfigyelhető érett nyirokérstruktúrákat detektáltunk. Ezzel szemben az újszülött korú egerek keményagyhártyájában éretlen nyirokérstruktúrákat figyeltünk meg (10. ábra A-F panel), amelyet a korábban közölt tanulmányok nem említenek [140, 171]. Megfigyeléseink szerint a születéskor a keményagyhártyában jelen levő éretlen nyirokérhálózat a születést követő hetekben érési folyamaton megy keresztül, amely eredményeképpen születést követő harmadik hétre alakul ki a felnőtt egerekben megfigyelhető, érett nyirokérhálózat (10. ábra A-F panel). A fejlődő meningeális nyirokérhálózat közelében egymástól elkülönülten elhelyezkedő LYVE-1 – F4/80 kettős pozitív sejteket detektáltunk (10. ábra F-H panel). Több közleményben – köztük a meningeális nyirokerek fejlődésére irányuló tanulmányokban is – leírták, hogy makrofág- és nyirokendothel-szerű tulajdonságokat egyaránt hordozó perivaszkuláris sejtek megfigyelhetőek rágcshalók és zebrahalak keményagyhártyájában [140, 143, 171, 230-235]. Egyelőre azonban nem egyértelmű, hogy a különböző kísérletes modellekben megfigyelt sejtek megfeleltethetőek-e egymásnak. Emellett nem ismert ezen sejtpopulációk pontos élettani és kórélettani szerepe. A megfigyelések szerint a sejtek egy része képes makromolekulák felvételére a cerebrospinális folyadékából, illetve vérerekből [143, 231, 232, 234, 235]. Ezen túlmenően a zebrahalak keményagyhártyájában megfigyelhető sejtpopulációról leírták, hogy vaszkuláris növekedési faktorok termelése révén hozzájárulhat az agyi érhalózat fejlődéséhez [143]. Azon megfigyelések alapján, amelyek szerint nyirokendothelsejtek a vénás vérendothelsejtek mellett mezenhimalis eredetű sejtekből is kialakulhatnak [58-63], felmerül, hogy a megfigyelt sejtpopuláció szerepet játszhat a meningeális nyirokérhálózat fejlődési és érési programjában. Ennek vizsgálatára további kísérletek szükségesek.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy hogyan valósul meg a központi idegrendszerbe injektált makromolekulák elszállítódása a születést követő időszakban. Megfigyeléseink alapján az agyszövetbe injektált jelölt makromolekulák mély nyaki nyirokcsomók irányában történő elszállítódása a keményagyhártya nyirokérhálózatának fejlődési programjával egy időben kezdődik meg (11. ábra).

In vitro és *in vivo* kísérleti eredmények alapján felvetődött, hogy az áramlás keltette mechanikai erők és nyíróerő szerepet játszhatnak a nyirokerek szervspecifikus fejlődési és érési folyamatai során [98, 118, 123, 128-130, 172-175]. A megfigyelések szerint azon kísérleti egérmodellekben, amelyekben sérült a PDPN – CLEC-2 – SYK – SLP-76 –

PLC γ 2 jelátviteli útvonal, károsodik a vérér- és nyirokérrendszerek elkülönülése, ami következtében a vér a nyirokerekbe jut és a nyirokerek vérrel kitöltötté válnak [101, 104, 105, 107, 110-113, 118, 236]. A kísérleti eredmények szerint a CLEC-2 hiányos egértörzsben ezen folyamatok hatására károsodik a nyirokáramlás, és a károsodott nyirokáramlás következtében sérül a nyirokerek embrionális korban megvalósuló szervspecifikus érése a vékonybélben és a tüdőben [123, 130]. Az irodalmi adatok alapján felmerül, hogy a *Plc γ 2^{-/-}* egérmódellem alkalmas lehet az áramlás meningeális nyirokerek születést követő fejlődési programjában betöltött szerepének vizsgálatára [107].

A meningeális nyirokérhálózat fejlődési programjának jellemzését követően a *Plc γ 2^{-/-}* egértörzs segítségével vizsgáltuk az áramlás szerepét a meningeális nyirokérhálózat posztnatális fejlődési és érési folyamataiban. Elsőként megfigyeltük, hogy az általunk használt genetikai módellemben károsodik a vékonybél nyirokérhálózatának embrionális korban lezajló érési programja (12. ábra), ami egybeesik a CLEC-2 hiányos egérmódellem végzett kísérletek során kapott eredményekkel [123].

További eredményeink alapján a *Plc γ 2^{-/-}* egerek egy része a születést követő harmadik hét vége előtt elpusztul (13. ábra), amelyhez hasonló arányok figyelhetők meg a CLEC-2 hiányos és SLP-76 hiányos egértörzseknel is [113, 237, 238]. Ennek háttérében valószínűsíthetően az áll, hogy a vérerek és nyirokerek elkülönülését biztosító jelpálya károsodása esetén sérül a nyirokérfunkció [123, 130]. A korábbi megfigyelések szerint a SYK hiányos egerek a perinatális időszakban elpusztulnak [102, 103], azonban jelenleg nem ismert, hogy a SYK hiányos egerek túlélése miért rosszabb, mint a többi egértörzs túlélése.

A fiatal felnőtt korú *Plc γ 2^{-/-}* egerekben az embrionális korú PLC γ 2 hiányos egerekhez hasonlóan megfigyelhető a vérér- és nyirokérhálózatok károsodott elkülönülése, ami következtében a mezenterialis nyirokerek és a vékonybél falában található nyirokerek vérrel kitöltötté válnak (14. ábra). Eredményeink szerint az egyes *Plc γ 2^{-/-}* egerekben a vékonybélben megfigyelhető fenotípus eltérő súlyosságot mutat (14. és 15. ábra), amelyhez hasonló jelenséget figyeltek meg korábban a CLEC-2, SYK és SLP-76 fehérjék károsodása esetén is [113, 239]. Jelenleg nem ismert, hogy a fenotípus súlyosságában megfigyelhető eltérések háttérében milyen folyamat áll. A nyirokcsomók szerkezetének vizsgálata során nem tapasztaltunk eltérést a *Plc γ 2^{+/+}*, *Plc γ 2^{+/-}* és *Plc γ 2^{-/-}*

egerek nyirokcsomóinak struktúrájában (16. ábra), habár a mezenteriális, inguinális és felszíni nyaki nyirokcsomókban vörösvértesteket figyeltünk meg (17. ábra). Ez a jelenség megfigyelhető a vérerek és nyirokerek elkülönülésében szerepet játszó PDPN – CLEC-2 jelpálya perinatális korban bekövetkező károsodása esetén is [104, 113, 119, 221-223].

Ezt követően a nyirokáramlást jellemeztük a *Plcγ2^{-/-}* egerekben. Kísérleteink során azt találtuk, hogy a PLCγ2 hiányos egértörzsben károsodik a lipidek bélből való felszívódása (18. ábra), a bőrbe injektált makromolekulák regionális nyirokcsomókba történő elszállítódása (19. ábra), valamint az agyszövetbe és cerebroszpinális folyadékba injektált makromolekulák meningeális nyirokerek általi felvétele (24. ábra) és mély nyaki nyirokcsomókba történő elszállítódása (20. ábra). Ezen eredmények alapján a PLCγ2 hiányában egyaránt károsodik a nyirokérfunkció a vékonybélben, a hátsó végtagban, és a központi idegrendszerhez kapcsolódó meningeális nyirokerekben, és ezen károsodások súlyossága összefüggést mutat azzal, hogy milyen mértékben sérült az adott egyedben a vérér- és nyirokérhálózatok elkülönülése a vékonybélben. Ezek a megfigyelések egybecsengenek más genetikai modelleken végzett kísérletek eredményeivel, amelyeknél szintén leírták, hogy amely egyedekben kevésbé súlyos a vérér- és nyirokérhálózatok elkülönülésének zavara, a nyirokáramlás is kevésbé károsodik [104, 113]. Eredményeink alapján a *Plcγ2^{-/-}* egértörzs egy kiváló modell annak vizsgálatára, hogy az áramlás milyen szerepet tölt be a meningeális nyirokerek születést követően lezajló fejlődési és érési folyamataiban.

További kísérleti eredményeink alapján a *Plcγ2^{-/-}* egerekben a károsodott nyirokáramlás hatására a vékonybélben megfigyelhető fenotípus mértékével arányosan sérül a meningeális nyirokerek születést követően megvalósuló fejlődési programja (21. ábra). Az, hogy azokban a *Plcγ2^{-/-}* egerekben, amelyekben kisebb mértékben károsodott a nyirokáramlás, a meningeális nyirokerek fejlődési programja is kevésbé sérült, megerősíti azt az elképzelést, hogy az áramlás fontos szerepet tölt be a meningeális nyirokerek fejlődési programjának szabályozásában.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az PLCγ2 hiányos egértörzsben sérül a vérerek és nyirokerek elkülönülése és a nyirokerek vérrel kitöltötté válnak, ami következtében károsodik az egerekben a nyirokáramlás. Ezáltal a *Plcγ2^{-/-}* egértörzs kiválóan alkalmas az áramlás szervspecifikus folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatára. Kísérleti eredményeink szerint a károsodott nyirokáramlású *Plcγ2^{-/-}*

egerekben sérülnek a meningeális nyirokerek fejlődési és érési folyamatai, valamint nem valósul meg a központi idegrendszerbe injektált makromolekulák felvétele és elszállítódása. Ezen megfigyeléseink arra utalnak, hogy az áramlás fontos szerepet tölt be a keményagyhártya nyirokereinek fejlődési programja során.

A meningeális nyirokerek jelenlétének közelmúltbeli bizonyításával egy olyan régióban írtak le nyirokereket, amelyre a korábban általánosan elfogadott nézet szerint nem jellemző azok jelenléte [1-3, 8, 9, 150]. Ehhez hasonlóan az elmúlt időszakban számos olyan régióban figyeltek meg nyirokendothelsejtekre jellemző molekuláris markereket és vérérmarkereket egyaránt kifejező ereket, amelyekről nemrégiben még úgy gondoltuk – vagy esetleg még jelenleg is úgy gondoljuk, hogy nem jellemző rájuk nyirokerek jelenléte [186, 187, 205, 206, 240]. Ilyen hibrid molekuláris mintázatot figyeltek meg a Schlemm-csatorna [179-182], valamint a *vasa recta* endothelsejtjeiben [191]. Felmerült továbbá, hogy a nyirokerek növekedését irányító PROX-1 transzkripciós faktor, valamint a VEGF-C – VEGFR-3 jelátviteli útvonal szerepet játszhatnak ezen hibrid tulajdonságú erek fejlődésében is [180, 181]. Egy nemrégiben közölt tanulmány szerint a nyirokerek növekedésében fontos szerepet játszó VEGFR-3 kifejeződése megfigyelhető a humán placenták spirális artériáinak endothelsejtjeinek, valamint az endotheliumba befűződő trophoblasztsejtek felszínén is [207]. Ezen túlmenően a spirális artériák környezetében a VEGFR-3 receptor ligandjaként ismert VEGF-C fehérjét szekretáló sejteket is megfigyeltek [210-212]. Ezen eredmények alapján felmerül, hogy a VEGFR-3 jelpálya szerepet játszhat a spirális artériák strukturális átalakulása során.

Kollaborációs partnereink előzetes kísérletei során szöveti immunhisztokémia segítségével kimutatták, hogy egerek esetében (ahol a spirális artériák strukturális átalakulása a GD10.5 – GD14.5 közötti időszakban valósul meg [197]) GD13.5 korra a spirális artériák endothelsejtjei egyaránt kifejezik a PROX-1 és VEGFR-3 fehérjéket, és ezen sejtek között elszórta megfigyelhetőek LYVE-1-et is kifejező sejtek is [II]. Ezen eredmények alapján a spirális artériák strukturális átalakulásuk során nyirokerekre és vérerekre jellemző molekuláris markereket egyaránt kifejező hibrid típusú erekké alakulnak át.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a spirális artériák endothelsejtjeiben kifejeződő VEGFR-3 szerepet játszik-e a spirális artériák strukturális átalakulásában. Az *Flt4^{kd/+}* nőstényekben a VEGFR-3 növekedési faktor receptor tirozin kináz doménjén

bekövetkező pontmutáció hatására elmarad a receptorról kiinduló foszforilációs kaszkád aktiválódása [216]. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az $Flt4^{kd/+}$ nőstényekből izolált placentákban megfigyelhető VEGFR-3 pozitív sejtekben elmarad az ERK fehérje foszforilációja (28. ábra). További eredményeink alapján az érintett egerekben nem figyelhető meg a spirális artériák keresztmetszetének növekedése (25. és 26. ábra), illetve elmarad a perivaszkuláris simaizomszövet degradációja (27. ábra és 28. ábra A panel). Az $Flt4^{kd/+}$ nőstények placentájában megfigyelt fenotípus egybecseng a kondicionális VEGF-C hiányos egértörzsben megfigyelttel [II]. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a VEGFR-3 jelpálya nemcsak a nyirokerek fejlődése során tölt be fontos szerepet, hanem a spirális artériák strukturális átalakulásában is.

A spirális artériák strukturális átalakulásának zavara esetén az emberi terhesség során preeclampsia alakulhat ki, ezért ezt követően azt vizsgáltuk, hogy az $Flt4^{kd/+}$ nőstények esetén megfigyelhetőek-e a humán preeclampsia tünetei. Kísérleteinkben jelentős eltéréseket tapasztaltunk az $Flt4^{kd/+}$ és $Flt4^{+/+}$ nőstényekből izolált embriók és a placenták tömegének vizsgálata során (29. ábra), ami összecseng a korábban uNK sejt hiányos egértörzsben megfigyelt eredményekkel [241, 242]. Az embriók tömegének csökkenése, illetve az egyes embriók és a hozzájuk tartozó placenták tömegarányának csökkenése megfigyelhető főtális distressz esetén, ami súlyos humán preeclampsia során is jelentkezhet [203, 243-245]. Kísérleteinkben nem tapasztaltunk eltérést a vad típusú és $Flt4^{kd/+}$ nőstények szisztolés vérnyomásában, az anyák vizeletében megjelenő fehérje mennyiségében és az anyák veséinek tömegében a vemhesség késői szakaszában (30-32. ábra).

A szakirodalomban fellelhetőek olyan egérmodellek, amelyek alkalmasak a humán preeclampsia tüneteinek vizsgálatára, azonban az ezen egérmodellekben megfigyelhető fenotípus nem feleltethető meg teljes egészében a humán preeclampsianak [246-248]. Ennek egyik oka lehet az, hogy a placentáció folyamata eltéréseket mutat emberben, patkányban és egérben. Az egerekkel ellentétben az emberi deciduarétegben nyirokérhálózat figyelhető meg [206]. Az emberi placenták spirális artériáinak strukturális átalakulásának egyik fontos momentuma az erek endotheliumába befűződő endovaszkuláris trophoblasztsejtek megjelenése [196], ami kollaborációs partnereink eredményei alapján patkányban is megfigyelhető, azonban egérben nem jellemző [II]. Az emberi trophoblasztsejtek és az endothelsejtek egyaránt kifejezik a VEGFR-3 fehérjét

[207], azonban a patkányokban megfigyelhető trophoblasztsejtek nem mutatnak VEGFR-3 pozitivitást [II]. A humán trophoblasztsejtek a VEGFR-3-on túlmenően kifejezik a VEGF-C fehérjét is az első trimeszter során, és a megfigyelések szerint a VEGF-C VEGFR-3-hoz való kötődésének gátlása esetén csökken a trophoblasztsejtek endotheliumba való beágyazódásának mértéke [208]. Ezen eredmények azt sugallják, hogy míg az egerekben a spirális artériák strukturális átalakulásához szükséges VEGF-C főleg az uNK sejtektől származik [210-212], emberi placenták esetében a trophoblasztsejtek is fontos forrásai lehetnek a VEGF-C-nek. Humán preeclampsias placentaminták vizsgálatakor mind az endothelrétegben, mind a trophoblasztsejtekben enyhén csökkent VEGFR-3 kifejeződést figyeltek meg a normotenzív mintákhoz képest [207], ami megerősíti a feltételezést, hogy a VEGFR-3 jelpálya károsodása szerepet játszhat a preeclampsia kialakulása során.

Eredményeink alapján a spirális artériák GD10.5 – GD14.5 időszakban megvalósuló strukturális átalakulásában fontos szerepet tölt be a VEGFR-3 jelátviteli út vonal. A VEGFR-3 tirozin kináz aktivitásának károsodása esetén nem figyelhetőek meg a strukturális átalakulás során végbemenő folyamatok, mint a perivaszkuláris simaizomszövet degradációja, valamint az erek keresztmetszetének növekedése, ami egybeesik a kondicionális VEGF-C hiányos egértörzsben megfigyeltekkel [II]. Megfigyeléseink szerint a spirális artériák strukturális átalakulásának sérülése következtében a vemhes nőstény egerekben preeclampsia-szerű kórkép alakul ki. Eredményeink alapján felmerül, hogy a VEGFR-3 potenciális biomarkere, illetve terápiás célpontja lehet a preeclampsianak.

6. Következtetések

Az értekezésemben bemutatott kísérleteink során egérmodellek segítségével vizsgáltuk a nyirokerek fejlődését irányító mechanizmusok szervspecifikus szerepét a keményagyhártyában és a placentában.

A meningeális nyirokérhálózat felépítésének tanulmányozását követően jellemeztük a keményagyhártya nyirokérhálózatának szerepét a makromolekulák központi idegrendszerből történő elszállításában, valamint a *Plcγ2^{-/-}* egértörzs segítségével vizsgáltuk az áramlás szerepét a meningeális nyirokerek posztnatális fejlődési és érési folyamataiban.

Megfigyeléseink szerint a keményagyhártyában jelen levő nyirokérstruktúrák felveszik a központi idegrendszerbe injektált jelölt makromolekulákat, és részt vesznek azok mély nyaki nyirokcsomók irányába történő elszállítódásában.

Eredményeink alapján a meningeális nyirokerek fejlődési programja a születést követő három hét során valósul meg, ami egybeesik a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódásának megindulásával.

Ezt követően a PLCγ2 hiányos egértörzs segítségével jellemeztük az áramlás keltette mechanikai erők szerepét a meningeális nyirokerek fejlődési programjában. Ehhez részletesen jellemeztük a PLCγ2 hiányos egértörzset. Kísérleteink során azt találtuk, hogy a PLCγ2 hiányos egértörzsben károsodik a nyirokérfunkció. Eredményeink alapján a PLCγ2 hiányos egérmodell kiválóan alkalmazható az áramlás meningeális nyirokerek fejlődési programjában betöltött szerepének vizsgálatára. Megfigyeléseink alapján a *Plcγ2^{-/-}* egerekben a károsodott nyirokáramlás hatására sérülnek a meningeális nyirokerek fejlődési és érési folyamatai. Ezen eredményeink összességüként elmondható, hogy az áramlás okozta mechanikai erők fontos szerepet töltenek be a keményagyhártya nyirokereinek posztnatális fejlődési programjában.

További kísérleteinkben az *Flt4^{kd/+}* kísérleti egértörzs segítségével jellemeztük a VEGFR-3 jelpálya szerepét a placenták spirális artériáinak strukturális átalakulása során. Kísérleti eredményeink alapján a nyirokerek fejlődési folyamataiban központi szerepet betöltő VEGFR-3 jelátviteli útvonal fontos szereplője a spirális artériák strukturális átalakulásának is. Megfigyeléseink szerint a VEGFR-3 tirozin kináz aktivitásának károsodása esetén nem valósul meg a spirális artériák strukturális átalakulása és a vemhes nőstény egerekben preeclampsia-szerű kórkép alakul ki. Eredményeink alapján felmerül,

hogy a VEGFR-3 potenciális biomarkere, illetve terápiás célpontja lehet a preeclampsianak.

Az értekezésemben bemutatott eredményeink közül a következőket tartjuk a legfontosabbnak:

- A keményagyhártya nyirokerei részt vesznek a központi idegrendszerbe injektált jelölt makromolekulák felvételében, és azok mély nyaki nyirokcsomók irányába történő elszállítódásában.
- A meningeális nyirokerek fejlődési programja a születést követő három hét során valósul meg, amely folyamat egybeesik a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállítódásának megindulásával.
- Az áramlás fontos szerepet tölt be a keményagyhártya nyirokereinek posztnatális fejlődési programjában, hiányában sérülnek a meningeális nyirokerek fejlődési és érési folyamatai.
- A VEGFR-3 jelátviteli útvonal fontos szereplője a spirális artériák strukturális átalakulásának. A jelpálya károsodása esetén nem figyelhetőek meg a strukturális átalakulás során végbemenő folyamatok és a vemhes nőstény egerekben preeclampsia-szerű kórkép alakul ki.

Eredményeink a meningeális nyirokerek fejlődési programjának részletesebb megismerésén túlmenően – tekintettel arra, hogy az irodalmi adatok alapján a meningeális nyirokerek feltételezhetően szerepet játszhatnak az Alzheimer-kór és a szklerózis multiplex kórfolyamataiban [3, 169, 170, 249] – hozzájárulhatnak a meningeális nyirokérhálózat élettani és kórélettani szerepének megértéséhez is.

További eredményeink alapján felmerül, hogy a VEGFR-3 nyirokérnövekedési jelpálya károsodása hozzájárulhat a preeclampsia kialakulásához. A nyirokérhálózat és nyirokerek fejlődését meghatározó mechanizmusok szervspecifikus élettani és kórélettani szerepének megismerésével közelebb kerülhetünk számos, jelenleg nem gyógyítható megbetegedés kialakulásának és kórfolyamatának megértéséhez, valamint lehetségessé válhat újabb biomarkerek és molekuláris terápiás célpontok azonosítása is.

7. Összefoglalás

Habár a közelmúltig általánosan elfogadott nézet szerint a központi idegrendszerre nem jellemző a nyirokerek jelenléte, az utóbbi időben több közleményben is nyirokereket írtak le a keményagyhártyában. Egyelőre nem tisztázott azonban ezen meningeális nyirokerek fejlődési programja, valamint élettani és kórélettani folyamatokban betöltött szerepe. Ezen túlmenően nemrégiben nyirokerek növekedésében szerepet játszó fehérjéket figyeltek meg a spirális artériák strukturális átalakulása során, amely folyamat zavara preeclampsia kialakulásához vezethet. Jelenleg nem ismert a megfigyelt nyirokernövekedési faktorok szervspecifikus szerepe a placentában.

Kísérleteink során célul tűztük ki, hogy jellemezzük a nyirokerek fejlődését irányító mechanizmusok szerepét a keményagyhártyában, valamint a placenta spirális artériáinak strukturális átalakulása során.

Kísérleti eredményeink alapján a keményagyhártya nyirokerei részt vesznek a központi idegrendszerbe injektált makromolekulák felvételében és elszállítódásában. Megfigyeltük, hogy a meningeális nyirokérhálózat érési folyamaton megy keresztül a születést követő időszakban, ami egybeesik a makromolekulák központi idegrendszerből való elszállításának megindulásával. Azt találtuk továbbá, hogy a PLC γ 2 hiányos egerekben károsodik a nyirokáramlás és sérül a makromolekulák központi idegrendszerből való felvétele és elszállítódása. Megfigyeléseink szerint a károsodott nyirokáramlású egérmódelben sérül a meningeális nyirokerek fejlődési programja.

További eredményeink alapján a VEGFR-3 jelpálya fontos szerepet játszik a spirális artériák strukturális átalakulásában, és károsodása esetén preeclampsia-szerű kórkép alakul ki.

Megfigyeléseink alapján az áramlás fontos szerepet tölt be a keményagyhártya nyirokereinek posztnatális fejlődési és érési folyamataiban. Az áramlás meningeális nyirokerek fejlődési programjában betöltött szerepének megértésével közelebb kerülhetünk számos, a központi idegrendszert érintő megbetegedés, mint például az Alzheimer-kór vagy a szklerózis multiplex kialakulásának és kórfolyamatának megértéséhez és potenciális terápiás célpontok azonosításához. További megfigyeléseink szerint a VEGFR-3 jelátviteli útvonal fontos szereplője a spirális artériák strukturális átalakulásának, ami alapján felmerül, hogy a VEGFR-3 potenciális biomarkere, illetve terápiás célpontja lehet a preeclampsianak.

8. Summary

Recently, the presence of lymphatics has been demonstrated and characterized in the dura mater, which is in contrast to the well-accepted view indicating the lack of a classical lymphatic drainage system of the central nervous system. However, possible regulators of the developmental program and function of the meningeal lymphatics remain unclear. Moreover, molecular factors that play a critical role in the lymphatic development have been recently observed during the remodeling of the spiral arteries, which process may be impaired in preeclampsia. Organ-specific roles of these pro-lymphangiogenic factors in the placenta and in the pathophysiology of preeclampsia are however yet to be identified.

In our experiments we aimed at characterizing the organ-specific roles of the lymphangiogenic mechanisms in the developmental program of the meningeal lymphatics and in the remodeling of the spiral arteries.

Our results indicated that the meningeal lymphatic structures are involved in the uptake and transport of macromolecules from the central nervous system. We have observed that the meningeal lymphatics develop during the postnatal period which process involves the maturation of the vessels. The formation of mature meningeal lymphatics coincides with the increase of drainage of macromolecules from the central nervous system. Furthermore, we found that the lymph flow and the transport of the macromolecules injected into the central nervous system are impaired in PLC γ 2-deficient mice. Importantly, the structural remodeling and maturation of meningeal lymphatics are also affected in PLC γ 2-deficient mice with reduced lymph flow.

Our further results indicated that the VEGFR-3 lymphangiogenic pathway plays a critical role in the remodeling of the spiral arteries, and the loss of VEGFR-3 signaling results in a phenotype that is comparable to the human preeclampsia.

Our findings indicate that lymph flow-induced mechanical forces are required for the postnatal formation of mature and functional meningeal lymphatic vessels. Defining lymph flow-dependence of the development and function of meningeal lymphatics may lead to a better understanding of the pathogenesis of neurological diseases including Alzheimer's disease and multiple sclerosis. We also revealed that the VEGFR-3 is a key player of the spiral artery remodeling process, which finding proposes that VEGFR-3 may be a potential biomarker and therapeutic target of preeclampsia.

9. Irodalomjegyzék

1. Tammela T, Alitalo K. (2010) Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell*, 140(4): 460-476.
2. Maby-El Hajjami H, Petrova TV. (2008) Developmental and pathological lymphangiogenesis: from models to human disease. *Histochem Cell Biol*, 130(6): 1063-1078.
3. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. (2005) Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*, 438(7070): 946-953.
4. Ma W, Oliver G. (2017) Lymphatic Endothelial Cell Plasticity in Development and Disease. *Physiology (Bethesda)*, 32(6): 444-452.
5. Choi I, Lee S, Hong YK. (2012) The new era of the lymphatic system: no longer secondary to the blood vascular system. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(4): a006445.
6. Adamczyk LA, Gordon K, Kholova I, Meijer-Jorna LB, Telinius N, Gallagher PJ, van der Wal AC, Baandrup U. (2016) Lymph vessels: the forgotten second circulation in health and disease. *Virchows Arch*, 469(1): 3-17.
7. Petrova TV, Koh GY. (2018) Organ-specific lymphatic vasculature: From development to pathophysiology. *J Exp Med*, 215(1): 35-49.
8. Escobedo N, Oliver G. (2016) Lymphangiogenesis: Origin, Specification, and Cell Fate Determination. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 32: 677-691.
9. Schulte-Merker S, Sabine A, Petrova TV. (2011) Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *J Cell Biol*, 193(4): 607-618.
10. Karkkainen MJ, Makinen T, Alitalo K. (2002) Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol*, 4(1): E2-5.
11. Leak LV, Burke JF. (1966) Fine structure of the lymphatic capillary and the adjoining connective tissue area. *Am J Anat*, 118(3): 785-809.
12. Leak LV, Burke JF. (1968) Ultrastructural studies on the lymphatic anchoring filaments. *J Cell Biol*, 36(1): 129-149.
13. Baluk P, Fuxe J, Hashizume H, Romano T, Lashnits E, Butz S, Vestweber D, Corada M, Molendini C, Dejana E, McDonald DM. (2007) Functionally

- specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J Exp Med*, 204(10): 2349-2362.
14. Trzewik J, Mallipattu SK, Artmann GM, Delano FA, Schmid-Schonbein GW. (2001) Evidence for a second valve system in lymphatics: endothelial microvalves. *FASEB J*, 15(10): 1711-1717.
 15. Schmid-Schonbein GW. (2003) The second valve system in lymphatics. *Lymphat Res Biol*, 1(1): 25-29; discussion 29-31.
 16. Sacchi G, Weber E, Agliano M, Raffaelli N, Comparini L. (1997) The structure of superficial lymphatics in the human thigh: precollectors. *Anat Rec*, 247(1): 53-62.
 17. Dougherty PJ, Davis MJ, Zawieja DC, Muthuchamy M. (2008) Calcium sensitivity and cooperativity of permeabilized rat mesenteric lymphatics. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294(5): R1524-1532.
 18. Muthuchamy M, Zawieja D. (2008) Molecular regulation of lymphatic contractility. *Ann N Y Acad Sci*, 1131: 89-99.
 19. Casley-Smith JR. (1980) The fine structure and functioning of tissue channels and lymphatics. *Lymphology*, 13(4): 177-183.
 20. Breslin JW, Yang Y, Scallan JP, Sweat RS, Adderley SP, Murfee WL. (2018) Lymphatic Vessel Network Structure and Physiology. *Compr Physiol*, 9(1): 207-299.
 21. Vigl B, Aebischer D, Nitschke M, Iolyeva M, Rothlin T, Antsiferova O, Halin C. (2011) Tissue inflammation modulates gene expression of lymphatic endothelial cells and dendritic cell migration in a stimulus-dependent manner. *Blood*, 118(1): 205-215.
 22. Irjala H, Johansson EL, Grenman R, Alanen K, Salmi M, Jalkanen S. (2001) Mannose receptor is a novel ligand for L-selectin and mediates lymphocyte binding to lymphatic endothelium. *J Exp Med*, 194(8): 1033-1042.
 23. Salmi M, Koskinen K, Henttinen T, Elima K, Jalkanen S. (2004) CLEVER-1 mediates lymphocyte transmigration through vascular and lymphatic endothelium. *Blood*, 104(13): 3849-3857.

24. Brinkman CC, Iwami D, Hritzo MK, Xiong Y, Ahmad S, Simon T, Hippen KL, Blazar BR, Bromberg JS. (2016) Treg engage lymphotoxin beta receptor for afferent lymphatic transendothelial migration. *Nat Commun*, 7: 12021.
25. Teijeira A, Hunter MC, Russo E, Proulx ST, Frei T, Debes GF, Coles M, Melero I, Detmar M, Rouzaut A, Halin C. (2017) T Cell Migration from Inflamed Skin to Draining Lymph Nodes Requires Intralymphatic Crawling Supported by ICAM-1/LFA-1 Interactions. *Cell Rep*, 18(4): 857-865.
26. Tal O, Lim HY, Gurevich I, Milo I, Shipony Z, Ng LG, Angeli V, Shakhar G. (2011) DC mobilization from the skin requires docking to immobilized CCL21 on lymphatic endothelium and intralymphatic crawling. *J Exp Med*, 208(10): 2141-2153.
27. Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST. (1999) Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol*, 162(5): 2472-2475.
28. Pflücke H, Sixt M. (2009) Preformed portals facilitate dendritic cell entry into afferent lymphatic vessels. *Journal of Experimental Medicine*, 206(13): 2925-2935.
29. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, Blankenstein T, Henning G, Forster R. (2004) CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*, 21(2): 279-288.
30. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M. (1999) CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 99(1): 23-33.
31. Russo E, Teijeira A, Vaahtomeri K, Willrodt AH, Bloch JS, Nitschke M, Santambrogio L, Kerjaschki D, Sixt M, Halin C. (2016) Intralymphatic CCL21 Promotes Tissue Egress of Dendritic Cells through Afferent Lymphatic Vessels. *Cell Rep*, 14(7): 1723-1734.
32. Tewalt EF, Cohen JN, Rouhani SJ, Guidi CJ, Qiao H, Fahl SP, Conaway MR, Bender TP, Tung KS, Vella AT, Adler AJ, Chen L, Engelhard VH. (2012) Lymphatic endothelial cells induce tolerance via PD-L1 and lack of costimulation

- leading to high-level PD-1 expression on CD8 T cells. *Blood*, 120(24): 4772-4782.
33. Cohen JN, Guidi CJ, Tewalt EF, Qiao H, Rouhani SJ, Ruddell A, Farr AG, Tung KS, Engelhard VH. (2010) Lymph node-resident lymphatic endothelial cells mediate peripheral tolerance via Aire-independent direct antigen presentation. *J Exp Med*, 207(4): 681-688.
 34. Hirosue S, Vokali E, Raghavan VR, Rincon-Restrepo M, Lund AW, Cortesy-Henrioud P, Capotosti F, Halin Winter C, Hugues S, Swartz MA. (2014) Steady-state antigen scavenging, cross-presentation, and CD8⁺ T cell priming: a new role for lymphatic endothelial cells. *J Immunol*, 192(11): 5002-5011.
 35. Vokali E, Yu SS, Hirosue S, Rincon-Restrepo M, F VD, Scherer S, Cortesy-Henrioud P, Kilarski WW, Mondino A, Zehn D, Hugues S, Swartz MA. (2020) Lymphatic endothelial cells prime naive CD8(+) T cells into memory cells under steady-state conditions. *Nat Commun*, 11(1): 538.
 36. Lim HY, Rutkowski JM, Helft J, Reddy ST, Swartz MA, Randolph GJ, Angeli V. (2009) Hypercholesterolemic mice exhibit lymphatic vessel dysfunction and degeneration. *Am J Pathol*, 175(3): 1328-1337.
 37. Lim HY, Thiam CH, Yeo KP, Bisioendial R, Hii CS, McGrath KC, Tan KW, Heather A, Alexander JS, Angeli V. (2013) Lymphatic vessels are essential for the removal of cholesterol from peripheral tissues by SR-BI-mediated transport of HDL. *Cell Metab*, 17(5): 671-684.
 38. Martel C, Li W, Fulp B, Platt AM, Gautier EL, Westerterp M, Bittman R, Tall AR, Chen SH, Thomas MJ, Kreisel D, Swartz MA, Sorci-Thomas MG, Randolph GJ. (2013) Lymphatic vasculature mediates macrophage reverse cholesterol transport in mice. *J Clin Invest*, 123(4): 1571-1579.
 39. Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, Dahlmann A, Tammela T, Machura K, Park JK, Beck FX, Muller DN, Derer W, Goss J, Ziomber A, Dietsch P, Wagner H, van Rooijen N, Kurtz A, Hilgers KF, Alitalo K, Eckardt KU, Luft FC, Kerjaschki D, Titze J. (2009) Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat Med*, 15(5): 545-552.

40. Machnik A, Dahlmann A, Kopp C, Goss J, Wagner H, van Rooijen N, Eckardt KU, Muller DN, Park JK, Luft FC, Kerjaschki D, Titze J. (2010) Mononuclear phagocyte system depletion blocks interstitial tonicity-responsive enhancer binding protein/vascular endothelial growth factor C expression and induces salt-sensitive hypertension in rats. *Hypertension*, 55(3): 755-761.
41. Wiig H, Schroder A, Neuhofer W, Jantsch J, Kopp C, Karlsen TV, Boschmann M, Goss J, Bry M, Rakova N, Dahlmann A, Brenner S, Tenstad O, Nurmi H, Mervaala E, Wagner H, Beck FX, Muller DN, Kerjaschki D, Luft FC, Harrison DG, Alitalo K, Titze J. (2013) Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure. *J Clin Invest*, 123(7): 2803-2815.
42. Milner AD, Saunders RA. (1977) Pressure and volume changes during the first breath of human neonates. *Arch Dis Child*, 52(12): 918-924.
43. Jakus Z, Gleghorn JP, Enis DR, Sen A, Chia S, Liu X, Rawnsley DR, Yang Y, Hess PR, Zou Z, Yang J, Guttentag SH, Nelson CM, Kahn ML. (2014) Lymphatic function is required prenatally for lung inflation at birth. *J Exp Med*, 211(5): 815-826.
44. Sabin FR. (1902) On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *American Journal of Anatomy*, 1(3): 367-389.
45. Sabin FR. (1909) The lymphatic system in human embryos, with a consideration of the morphology of the system as a whole. *American Journal of Anatomy*, 9(1): 43-91.
46. Lewis FT. (1905) The development of the lymphatic system in rabbits. *American Journal of Anatomy*, 5(1): 95-111.
47. Oliver G. (2004) Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunol*, 4(1): 35-45.
48. van der Putte SC. (1975) The early development of the lymphatic system in mouse embryos. *Acta Morphol Neerl Scand*, 13(4): 245-286.
49. van der Putte SC, van Limborgh J. (1980) The embryonic development of the main lymphatics in man. *Acta Morphol Neerl Scand*, 18(4): 323-335.
50. Wigle JT, Oliver G. (1999) Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell*, 98(6): 769-778.

51. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, Jackson DG, Oliver G. (2002) An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J*, 21(7): 1505-1513.
52. Yaniv K, Isogai S, Castranova D, Dye L, Hitomi J, Weinstein BM. (2006) Live imaging of lymphatic development in the zebrafish. *Nat Med*, 12(6): 711-716.
53. Hirakawa S, Hong YK, Harvey N, Schacht V, Matsuda K, Libermann T, Detmar M. (2003) Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol*, 162(2): 575-586.
54. Srinivasan RS, Dillard ME, Lagutin OV, Lin FJ, Tsai S, Tsai MJ, Samokhvalov IM, Oliver G. (2007) Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature. *Genes Dev*, 21(19): 2422-2432.
55. Yang Y, Garcia-Verdugo JM, Soriano-Navarro M, Srinivasan RS, Scallan JP, Singh MK, Epstein JA, Oliver G. (2012) Lymphatic endothelial progenitors bud from the cardinal vein and intersomitic vessels in mammalian embryos. *Blood*, 120(11): 2340-2348.
56. Hagerling R, Pollmann C, Andreas M, Schmidt C, Nurmi H, Adams RH, Alitalo K, Andresen V, Schulte-Merker S, Kiefer F. (2013) A novel multistep mechanism for initial lymphangiogenesis in mouse embryos based on ultramicroscopy. *EMBO J*, 32(5): 629-644.
57. Huntington GS, McClure CFW. (1910) The anatomy and development of the jugular lymph sacs in the domestic cat (*Felis domestica*). *American Journal of Anatomy*, 10(1): 177-312.
58. Wilting J, Papoutsi M, Othman-Hassan K, Rodriguez-Niedenfuhr M, Prols F, Tomarev SI, Eichmann A. (2001) Development of the avian lymphatic system. *Microsc Res Tech*, 55(2): 81-91.
59. Wilting J, Tomarev SI, Christ B, Schweigerer L. (2003) Lymphangioblasts in embryonic lymphangiogenesis. *Lymphat Res Biol*, 1(1): 33-40.
60. Wilting J, Aref Y, Huang R, Tomarev SI, Schweigerer L, Christ B, Valasek P, Papoutsi M. (2006) Dual origin of avian lymphatics. *Dev Biol*, 292(1): 165-173.
61. Ny A, Koch M, Schneider M, Neven E, Tong RT, Maity S, Fischer C, Plaisance S, Lambrechts D, Heligon C, Terclavers S, Ciesiolka M, Kalin R, Man WY, Senn

- I, Wyns S, Lupu F, Brandli A, Vleminckx K, Collen D, Dewerchin M, Conway EM, Moons L, Jain RK, Carmeliet P. (2005) A genetic *Xenopus laevis* tadpole model to study lymphangiogenesis. *Nat Med*, 11(9): 998-1004.
62. Buttler K, Kreysing A, von Kaisenberg CS, Schweigerer L, Gale N, Papoutsi M, Wilting J. (2006) Mesenchymal cells with leukocyte and lymphendothelial characteristics in murine embryos. *Dev Dyn*, 235(6): 1554-1562.
63. Buttler K, Ezaki T, Wilting J. (2008) Proliferating mesodermal cells in murine embryos exhibiting macrophage and lymphendothelial characteristics. *BMC Dev Biol*, 8: 43.
64. Stanczuk L, Martinez-Corral I, Ulvmar MH, Zhang Y, Lavina B, Fruttiger M, Adams RH, Saur D, Betsholtz C, Ortega S, Alitalo K, Graupera M, Makinen T. (2015) cKit Lineage Hemogenic Endothelium-Derived Cells Contribute to Mesenteric Lymphatic Vessels. *Cell Rep*, 10(10): 1708-1721.
65. Klotz L, Norman S, Vieira JM, Masters M, Rohling M, Dube KN, Bollini S, Matsuzaki F, Carr CA, Riley PR. (2015) Cardiac lymphatics are heterogeneous in origin and respond to injury. *Nature*, 522(7554): 62-67.
66. Martinez-Corral I, Ulvmar MH, Stanczuk L, Tatin F, Kizhatil K, John SW, Alitalo K, Ortega S, Makinen T. (2015) Nonvenous origin of dermal lymphatic vasculature. *Circ Res*, 116(10): 1649-1654.
67. Francois M, Short K, Secker GA, Combes A, Schwarz Q, Davidson TL, Smyth I, Hong YK, Harvey NL, Koopman P. (2012) Segmental territories along the cardinal veins generate lymph sacs via a ballooning mechanism during embryonic lymphangiogenesis in mice. *Dev Biol*, 364(2): 89-98.
68. Hong YK, Harvey N, Noh YH, Schacht V, Hirakawa S, Detmar M, Oliver G. (2002) *Prox1* is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn*, 225(3): 351-357.
69. Petrova TV, Makinen T, Makela TP, Saarela J, Virtanen I, Ferrell RE, Finegold DN, Kerjaschki D, Yla-Herttuala S, Alitalo K. (2002) Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the *Prox-1* homeobox transcription factor. *EMBO J*, 21(17): 4593-4599.

70. Johnson NC, Dillard ME, Baluk P, McDonald DM, Harvey NL, Frase SL, Oliver G. (2008) Lymphatic endothelial cell identity is reversible and its maintenance requires Prox1 activity. *Genes Dev*, 22(23): 3282-3291.
71. Francois M, Caprini A, Hosking B, Orsenigo F, Wilhelm D, Browne C, Paavonen K, Karnezis T, Shayan R, Downes M, Davidson T, Tutt D, Cheah KS, Stacker SA, Muscat GE, Achen MG, Dejana E, Koopman P. (2008) Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. *Nature*, 456(7222): 643-647.
72. Srinivasan RS, Escobedo N, Yang Y, Interiano A, Dillard ME, Finkelstein D, Mukatira S, Gil HJ, Nurmi H, Alitalo K, Oliver G. (2014) The Prox1-Vegfr3 feedback loop maintains the identity and the number of lymphatic endothelial cell progenitors. *Genes Dev*, 28(19): 2175-2187.
73. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. (1996) A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*, 15(7): 1751.
74. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. (1997) Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*, 276(5317): 1423-1425.
75. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA. (1998) Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(2): 548-553.
76. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. (2004) Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*, 5(1): 74-80.
77. Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, Kubo H, Stacker SA, Achen MG. (2005) Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol*, 25(6): 2441-2449.
78. Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, Wise L, Mercer A, Kowalski H, Kerjaschki D, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K. (2001)

- Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J*, 20(17): 4762-4773.
79. Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, Kubo H, Thurston G, McDonald DM, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K. (2001) Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J*, 20(6): 1223-1231.
 80. Tvorogov D, Anisimov A, Zheng W, Leppanen VM, Tammela T, Laurinavicius S, Holnthoner W, Helotera H, Holopainen T, Jeltsch M, Kalkkinen N, Lankinen H, Ojala PM, Alitalo K. (2010) Effective suppression of vascular network formation by combination of antibodies blocking VEGFR ligand binding and receptor dimerization. *Cancer Cell*, 18(6): 630-640.
 81. Coso S, Zeng Y, Opekin K, Williams ED. (2012) Vascular endothelial growth factor receptor-3 directly interacts with phosphatidylinositol 3-kinase to regulate lymphangiogenesis. *PLoS One*, 7(6): e39558.
 82. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. (1998) Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*, 282(5390): 946-949.
 83. Zhang L, Zhou F, Han W, Shen B, Luo J, Shibuya M, He Y. (2010) VEGFR-3 ligand-binding and kinase activity are required for lymphangiogenesis but not for angiogenesis. *Cell Res*, 20(12): 1319-1331.
 84. Haiko P, Makinen T, Keskitalo S, Taipale J, Karkkainen MJ, Baldwin ME, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K. (2008) Deletion of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF-D is not equivalent to VEGF receptor 3 deletion in mouse embryos. *Mol Cell Biol*, 28(15): 4843-4850.
 85. Hamada K, Oike Y, Takakura N, Ito Y, Jussila L, Dumont DJ, Alitalo K, Suda T. (2000) VEGF-C signaling pathways through VEGFR-2 and VEGFR-3 in vasculoangiogenesis and hematopoiesis. *Blood*, 96(12): 3793-3800.
 86. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. (1995) Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(8): 3566-3570.

87. Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, Williams M, Dvorak AM, Dvorak HF, Oliver G, Detmar M. (2003) T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J*, 22(14): 3546-3556.
88. Kim KE, Sung HK, Koh GY. (2007) Lymphatic development in mouse small intestine. *Dev Dyn*, 236(7): 2020-2025.
89. Bernier-Latmani J, Cisarovsky C, Demir CS, Bruand M, Jaquet M, Davanture S, Ragusa S, Siegert S, Dormond O, Benedito R, Radtke F, Luther SA, Petrova TV. (2015) DLL4 promotes continuous adult intestinal lacteal regeneration and dietary fat transport. *J Clin Invest*, 125(12): 4572-4586.
90. Bernier-Latmani J, Petrova TV. (2016) High-resolution 3D analysis of mouse small-intestinal stroma. *Nat Protoc*, 11(9): 1617-1629.
91. Ochsenbein AM, Karaman S, Proulx ST, Goldmann R, Chittazhathu J, Dasargyri A, Chong C, Leroux JC, Stanley ER, Detmar M. (2016) Regulation of lymphangiogenesis in the diaphragm by macrophages and VEGFR-3 signaling. *Angiogenesis*, 19(4): 513-524.
92. Koltowska K, Betterman KL, Harvey NL, Hogan BM. (2013) Getting out and about: the emergence and morphogenesis of the vertebrate lymphatic vasculature. *Development*, 140(9): 1857-1870.
93. Makinen T, Adams RH, Bailey J, Lu Q, Ziemiecki A, Alitalo K, Klein R, Wilkinson GA. (2005) PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature. *Genes Dev*, 19(3): 397-410.
94. Dagenais SL, Hartsough RL, Erickson RP, Witte MH, Butler MG, Glover TW. (2004) Foxc2 is expressed in developing lymphatic vessels and other tissues associated with lymphedema-distichiasis syndrome. *Gene Expr Patterns*, 4(6): 611-619.
95. Petrova TV, Karpanen T, Norrmen C, Mellor R, Tamakoshi T, Finegold D, Ferrell R, Kerjaschki D, Mortimer P, Yla-Herttuala S, Miura N, Alitalo K. (2004) Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nat Med*, 10(9): 974-981.

96. Bazigou E, Xie S, Chen C, Weston A, Miura N, Sorokin L, Adams R, Muro AF, Sheppard D, Makinen T. (2009) Integrin- α 9 is required for fibronectin matrix assembly during lymphatic valve morphogenesis. *Dev Cell*, 17(2): 175-186.
97. Norrmen C, Ivanov KI, Cheng J, Zangger N, Delorenzi M, Jaquet M, Miura N, Puolakkainen P, Horsley V, Hu J, Augustin HG, Yla-Herttuala S, Alitalo K, Petrova TV. (2009) FOXC2 controls formation and maturation of lymphatic collecting vessels through cooperation with NFATc1. *J Cell Biol*, 185(3): 439-457.
98. Sabine A, Agalarov Y, Maby-El Hajjami H, Jaquet M, Hagerling R, Pollmann C, Bebber D, Pfenniger A, Miura N, Dormond O, Calmes JM, Adams RH, Makinen T, Kiefer F, Kwak BR, Petrova TV. (2012) Mechanotransduction, PROX1, and FOXC2 cooperate to control connexin37 and calcineurin during lymphatic-valve formation. *Dev Cell*, 22(2): 430-445.
99. Kazenwadel J, Secker GA, Liu YJ, Rosenfeld JA, Wildin RS, Cuellar-Rodriguez J, Hsu AP, Dyack S, Fernandez CV, Chong CE, Babic M, Bardy PG, Shimamura A, Zhang MY, Walsh T, Holland SM, Hickstein DD, Horwitz MS, Hahn CN, Scott HS, Harvey NL. (2012) Loss-of-function germline GATA2 mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for GATA2 in the lymphatic vasculature. *Blood*, 119(5): 1283-1291.
100. Sabine A, Bovay E, Demir CS, Kimura W, Jaquet M, Agalarov Y, Zangger N, Scallan JP, Graber W, Gulpinar E, Kwak BR, Makinen T, Martinez-Corral I, Ortega S, Delorenzi M, Kiefer F, Davis MJ, Djonov V, Miura N, Petrova TV. (2015) FOXC2 and fluid shear stress stabilize postnatal lymphatic vasculature. *J Clin Invest*, 125(10): 3861-3877.
101. Uhrin P, Zaujec J, Breuss JM, Olcaydu D, Chrenek P, Stockinger H, Fuertbauer E, Moser M, Haiko P, Fassler R, Alitalo K, Binder BR, Kerjaschki D. (2010) Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation. *Blood*, 115(19): 3997-4005.
102. Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, Furlong MT, Geahlen RL, Tybulewicz VL. (1995) Perinatal lethality and blocked B-cell

- development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature*, 378(6554): 298-302.
103. Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T. (1995) Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature*, 378(6554): 303-306.
 104. Abtahian F, Guerriero A, Sebzda E, Lu MM, Zhou R, Mocsai A, Myers EE, Huang B, Jackson DG, Ferrari VA, Tybulewicz V, Lowell CA, Lepore JJ, Koretzky GA, Kahn ML. (2003) Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science*, 299(5604): 247-251.
 105. Sebzda E, Hibbard C, Sweeney S, Abtahian F, Bezman N, Clemens G, Maltzman JS, Cheng L, Liu F, Turner M, Tybulewicz V, Koretzky GA, Kahn ML. (2006) Syk and Slp-76 mutant mice reveal a cell-autonomous hematopoietic cell contribution to vascular development. *Dev Cell*, 11(3): 349-361.
 106. Wang D, Feng J, Wen R, Marine JC, Sangster MY, Parganas E, Hoffmeyer A, Jackson CW, Cleveland JL, Murray PJ, Ihle JN. (2000) Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity*, 13(1): 25-35.
 107. Ichise H, Ichise T, Ohtani O, Yoshida N. (2009) Phospholipase Cgamma2 is necessary for separation of blood and lymphatic vasculature in mice. *Development*, 136(2): 191-195.
 108. Debrincat MA, Josefsson EC, James C, Henley KJ, Ellis S, Lebois M, Betterman KL, Lane RM, Rogers KL, White MJ, Roberts AW, Harvey NL, Metcalf D, Kile BT. (2012) Mcl-1 and Bcl-x(L) coordinately regulate megakaryocyte survival. *Blood*, 119(24): 5850-5858.
 109. Carramolino L, Fuentes J, Garcia-Andres C, Azcoitia V, Riethmacher D, Torres M. (2010) Platelets play an essential role in separating the blood and lymphatic vasculatures during embryonic angiogenesis. *Circ Res*, 106(7): 1197-1201.
 110. Bertozzi CC, Schmaier AA, Mericko P, Hess PR, Zou Z, Chen M, Chen CY, Xu B, Lu MM, Zhou D, Sebzda E, Santore MT, Merianos DJ, Stadtfeld M, Flake AW, Graf T, Skoda R, Maltzman JS, Koretzky GA, Kahn ML. (2010) Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. *Blood*, 116(4): 661-670.

111. Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ding G, Nishimura S, Hokamura K, Eto K, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Yatomi Y, Umemura K, Shin Y, Hirashima M, Ozaki Y. (2010) Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. *J Biol Chem*, 285(32): 24494-24507.
112. Osada M, Inoue O, Ding G, Shirai T, Ichise H, Hirayama K, Takano K, Yatomi Y, Hirashima M, Fujii H, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y. (2012) Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells. *J Biol Chem*, 287(26): 22241-22252.
113. Hess PR, Rawnsley DR, Jakus Z, Yang Y, Sweet DT, Fu J, Herzog B, Lu M, Nieswandt B, Oliver G, Makinen T, Xia L, Kahn ML. (2014) Platelets mediate lymphovenous hemostasis to maintain blood-lymphatic separation throughout life. *J Clin Invest*, 124(1): 273-284.
114. May F, Hagedorn I, Pleines I, Bender M, Vogtle T, Eble J, Elvers M, Nieswandt B. (2009) CLEC-2 is an essential platelet-activating receptor in hemostasis and thrombosis. *Blood*, 114(16): 3464-3472.
115. Suzuki-Inoue K, Fuller GL, Garcia A, Eble JA, Pohlmann S, Inoue O, Gartner TK, Hughan SC, Pearce AC, Laing GD, Theakston RD, Schweighoffer E, Zitzmann N, Morita T, Tybulewicz VL, Ozaki Y, Watson SP. (2006) A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood*, 107(2): 542-549.
116. Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, Kaneko MK, Mishima K, Yatomi Y, Yamazaki Y, Narimatsu H, Ozaki Y. (2007) Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem*, 282(36): 25993-26001.
117. Srinivasan RS, Oliver G. (2011) Prox1 dosage controls the number of lymphatic endothelial cell progenitors and the formation of the lymphovenous valves. *Genes Dev*, 25(20): 2187-2197.

118. Welsh JD, Kahn ML, Sweet DT. (2016) Lymphovenous hemostasis and the role of platelets in regulating lymphatic flow and lymphatic vessel maturation. *Blood*, 128(9): 1169-1173.
119. Bianchi R, Russo E, Bachmann SB, Proulx ST, Sesartic M, Smaadahl N, Watson SP, Buckley CD, Halin C, Detmar M. (2017) Postnatal Deletion of Podoplanin in Lymphatic Endothelium Results in Blood Filling of the Lymphatic System and Impairs Dendritic Cell Migration to Lymph Nodes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 37(1): 108-117.
120. Choi D, Park E, Jung E, Seong YJ, Yoo J, Lee E, Hong M, Lee S, Ishida H, Burford J, Peti-Peterdi J, Adams RH, Srikanth S, Gwack Y, Chen CS, Vogel HJ, Koh CJ, Wong AK, Hong YK. (2017) Laminar flow downregulates Notch activity to promote lymphatic sprouting. *J Clin Invest*, 127(4): 1225-1240.
121. Choi D, Park E, Jung E, Seong YJ, Hong M, Lee S, Burford J, Gyarmati G, Peti-Peterdi J, Srikanth S, Gwack Y, Koh CJ, Boriushkin E, Hamik A, Wong AK, Hong YK. (2017) ORAI1 Activates Proliferation of Lymphatic Endothelial Cells in Response to Laminar Flow Through Kruppel-Like Factors 2 and 4. *Circ Res*, 120(9): 1426-1439.
122. Kim S, Chung M, Jeon NL. (2016) Three-dimensional biomimetic model to reconstitute sprouting lymphangiogenesis in vitro. *Biomaterials*, 78: 115-128.
123. Sweet DT, Jimenez JM, Chang J, Hess PR, Mericko-Ishizuka P, Fu J, Xia L, Davies PF, Kahn ML. (2015) Lymph flow regulates collecting lymphatic vessel maturation in vivo. *J Clin Invest*, 125(8): 2995-3007.
124. Kazenwadel J, Betterman KL, Chong CE, Stokes PH, Lee YK, Secker GA, Agalarov Y, Demir CS, Lawrence DM, Sutton DL, Tabruyn SP, Miura N, Salminen M, Petrova TV, Matthews JM, Hahn CN, Scott HS, Harvey NL. (2015) GATA2 is required for lymphatic vessel valve development and maintenance. *J Clin Invest*, 125(8): 2979-2994.
125. Hahn C, Schwartz MA. (2009) Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(1): 53-62.
126. Lukacs V, Mathur J, Mao R, Bayrak-Toydemir P, Procter M, Cahalan SM, Kim HJ, Bandell M, Longo N, Day RW, Stevenson DA, Patapoutian A, Krock BL.

- (2015) Impaired PIEZO1 function in patients with a novel autosomal recessive congenital lymphatic dysplasia. *Nat Commun*, 6: 8329.
127. Fotiou E, Martin-Almedina S, Simpson MA, Lin S, Gordon K, Brice G, Atton G, Jeffery I, Rees DC, Mignot C, Vogt J, Homfray T, Snyder MP, Rockson SG, Jeffery S, Mortimer PS, Mansour S, Ostergaard P. (2015) Novel mutations in PIEZO1 cause an autosomal recessive generalized lymphatic dysplasia with non-immune hydrops fetalis. *Nat Commun*, 6: 8085.
128. Nonomura K, Lukacs V, Sweet DT, Goddard LM, Kanie A, Whitwam T, Ranade SS, Fujimori T, Kahn ML, Patapoutian A. (2018) Mechanically activated ion channel PIEZO1 is required for lymphatic valve formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(50): 12817-12822.
129. Choi D, Park E, Jung E, Cha B, Lee S, Yu J, Kim PM, Lee S, Hong YJ, Koh CJ, Cho CW, Wu Y, Li Jeon N, Wong AK, Shin L, Kumar SR, Bermejo-Moreno I, Srinivasan RS, Cho IT, Hong YK. (2019) Piezo1 incorporates mechanical force signals into the genetic program that governs lymphatic valve development and maintenance. *JCI Insight*, 4(5).
130. Reed HO, Wang L, Sonett J, Chen M, Yang J, Li L, Aradi P, Jakus Z, D'Armiento J, Hancock WW, Kahn ML. (2019) Lymphatic impairment leads to pulmonary tertiary lymphoid organ formation and alveolar damage. *J Clin Invest*, 129(6): 2514-2526.
131. Sandrone S, Moreno-Zambrano D, Kipnis J, van Gijn J. (2019) A (delayed) history of the brain lymphatic system. *Nat Med*, 25(4): 538-540.
132. Lukic IK, Gluncic V, Ivkic G, Hubenstorf M, Marusic A. (2003) Virtual dissection: a lesson from the 18th century. *Lancet*, 362(9401): 2110-2113.
133. Lecco V. (1953) Di una probabile modificazione delle fessure linfatiche della della parte dei seni venosi della dura madre. *Arch Ital Otol Rinol Laringol*, 64: 287-296.
134. Foldi M, Gellert A, Kozma M, Poberai M, Zoltan OT, Csanda E. (1966) New contributions to the anatomical connections of the brain and the lymphatic system. *Acta Anat (Basel)*, 64(4): 498-505.

135. Andres KH, von Düring M, Muszynski K, Schmidt RF. (1987) Nerve fibres and their terminals of the dura mater encephali of the rat. *Anat Embryol (Berl)*, 175(3): 289-301.
136. Li J, Zhou J, Shi Y. (1996) Scanning electron microscopy of human cerebral meningeal stomata. *Ann Anat*, 178(3): 259-261.
137. Aspelund A, Antila S, Proulx ST, Karlsten TV, Karaman S, Detmar M, Wiig H, Alitalo K. (2015) A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J Exp Med*, 212(7): 991-999.
138. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J. (2015) Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, 523(7560): 337-341.
139. Glinskii OV, Huxley VH, Xie L, Bunyak F, Palaniappan K, Glinsky VV. (2019) Complex Non-sinus-associated Pachymeningeal Lymphatic Structures: Interrelationship With Blood Microvasculature. *Front Physiol*, 10: 1364.
140. Antila S, Karaman S, Nurmi H, Airavaara M, Voutilainen MH, Mathivet T, Chilov D, Li Z, Koppinen T, Park JH, Fang S, Aspelund A, Saarma M, Eichmann A, Thomas JL, Alitalo K. (2017) Development and plasticity of meningeal lymphatic vessels. *J Exp Med*, 214(12): 3645-3667.
141. Louveau A, Herz J, Alme MN, Salvador AF, Dong MQ, Viar KE, Herod SG, Knopp J, Setliff JC, Lupi AL, Da Mesquita S, Frost EL, Gaultier A, Harris TH, Cao R, Hu S, Lukens JR, Smirnov I, Overall CC, Oliver G, Kipnis J. (2018) CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature. *Nat Neurosci*, 21(10): 1380-1391.
142. Jacob L, Boisserand LSB, Geraldo LHM, de Brito Neto J, Mathivet T, Antila S, Barka B, Xu Y, Thomas JM, Pestel J, Aigrot MS, Song E, Nurmi H, Lee S, Alitalo K, Renier N, Eichmann A, Thomas JL. (2019) Anatomy and function of the vertebral column lymphatic network in mice. *Nat Commun*, 10(1): 4594.
143. Bower NI, Koltowska K, Pichol-Thievent C, Virshup I, Paterson S, Lagendijk AK, Wang W, Lindsey BW, Bent SJ, Baek S, Rondon-Galeano M, Hurley DG, Mochizuki N, Simons C, Francois M, Wells CA, Kaslin J, Hogan BM. (2017)

- Mural lymphatic endothelial cells regulate meningeal angiogenesis in the zebrafish. *Nat Neurosci*, 20(6): 774-783.
144. Jung E, Gardner D, Choi D, Park E, Jin Seong Y, Yang S, Castorena-Gonzalez J, Louveau A, Zhou Z, Lee GK, Perrault DP, Lee S, Johnson M, Daghlian G, Lee M, Jin Hong Y, Kato Y, Kipnis J, Davis MJ, Wong AK, Hong YK. (2017) Development and Characterization of A Novel Prox1-EGFP Lymphatic and Schlemm's Canal Reporter Rat. *Sci Rep*, 7(1): 5577.
 145. Absinta M, Ha SK, Nair G, Sati P, Luciano NJ, Palisoc M, Louveau A, Zaghoul KA, Pittaluga S, Kipnis J, Reich DS. (2017) Human and nonhuman primate meninges harbor lymphatic vessels that can be visualized noninvasively by MRI. *Elife*, 6: e29738.
 146. Goodman JR, Adham ZO, Woltjer RL, Lund AW, Iliff JJ. (2018) Characterization of dural sinus-associated lymphatic vasculature in human Alzheimer's dementia subjects. *Brain Behav Immun*, 73: 34-40.
 147. Ahn JH, Cho H, Kim JH, Kim SH, Ham JS, Park I, Suh SH, Hong SP, Song JH, Hong YK, Jeong Y, Park SH, Koh GY. (2019) Meningeal lymphatic vessels at the skull base drain cerebrospinal fluid. *Nature*, 572(7767): 62-66.
 148. Schwalbe G. (1869) Der Arachnoidalraum, ein Lymphraum und sein Zusammenhang mit dem Perichoroidalraum. *Zentralbl. Med. Wiss.*, 7: 465-467.
 149. Koh L, Zakharov A, Johnston M. (2005) Integration of the subarachnoid space and lymphatics: is it time to embrace a new concept of cerebrospinal fluid absorption? *Cerebrospinal Fluid Res*, 2: 6.
 150. Pollay M. (2010) The function and structure of the cerebrospinal fluid outflow system. *Cerebrospinal Fluid Res*, 7: 9.
 151. Bradbury MW, Westrop RJ. (1983) Factors influencing exit of substances from cerebrospinal fluid into deep cervical lymph of the rabbit. *J Physiol*, 339: 519-534.
 152. Johnston M, Zakharov A, Papaiconomou C, Salmasi G, Armstrong D. (2004) Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species. *Cerebrospinal Fluid Res*, 1(1): 2.

153. Kida S, Pantazis A, Weller RO. (1993) CSF drains directly from the subarachnoid space into nasal lymphatics in the rat. Anatomy, histology and immunological significance. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 19(6): 480-488.
154. Pollay M, Welch K. (1962) The function and structure of canine arachnoid villi. *J Surg Res*, 2: 307-311.
155. Welch K, Pollay M. (1961) Perfusion of particles through arachnoid villi of the monkey. *Am J Physiol*, 201: 651-654.
156. Bradbury MW, Cole DF. (1980) The role of the lymphatic system in drainage of cerebrospinal fluid and aqueous humour. *J Physiol*, 299: 353-365.
157. Boulton M, Young A, Hay J, Armstrong D, Flessner M, Schwartz M, Johnston M. (1996) Drainage of CSF through lymphatic pathways and arachnoid villi in sheep: measurement of ¹²⁵I-albumin clearance. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 22(4): 325-333.
158. Boulton M, Flessner M, Armstrong D, Hay J, Johnston M. (1998) Determination of volumetric cerebrospinal fluid absorption into extracranial lymphatics in sheep. *Am J Physiol*, 274(1): R88-96.
159. Boulton M, Flessner M, Armstrong D, Mohamed R, Hay J, Johnston M. (1999) Contribution of extracranial lymphatics and arachnoid villi to the clearance of a CSF tracer in the rat. *Am J Physiol*, 276(3): R818-823.
160. Ma Q, Ineichen BV, Detmar M, Proulx ST. (2017) Outflow of cerebrospinal fluid is predominantly through lymphatic vessels and is reduced in aged mice. *Nat Commun*, 8(1): 1434.
161. Da Mesquita S, Louveau A, Vaccari A, Smirnov I, Cornelison RC, Kingsmore KM, Contarino C, Onengut-Gumuscu S, Farber E, Raper D, Viar KE, Powell RD, Baker W, Dabhi N, Bai R, Cao R, Hu S, Rich SS, Munson JM, Lopes MB, Overall CC, Acton ST, Kipnis J. (2018) Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*, 560(7717): 185-191.
162. Ma Q, Decker Y, Muller A, Ineichen BV, Proulx ST. (2019) Clearance of cerebrospinal fluid from the sacral spine through lymphatic vessels. *J Exp Med*, 216(11): 2492-2502.

163. Ma Q, Ries M, Decker Y, Muller A, Riner C, Bucker A, Fassbender K, Detmar M, Proulx ST. (2019) Rapid lymphatic efflux limits cerebrospinal fluid flow to the brain. *Acta Neuropathol*, 137(1): 151-165.
164. Ma Q, Schlegel F, Bachmann SB, Schneider H, Decker Y, Rudin M, Weller M, Proulx ST, Detmar M. (2019) Lymphatic outflow of cerebrospinal fluid is reduced in glioma. *Sci Rep*, 9(1): 14815.
165. Erkkinen MG, Kim MO, Geschwind MD. (2018) *Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 10(4): a033118.
166. Wen YR, Yang JH, Wang X, Yao ZB. (2018) Induced dural lymphangiogenesis facilitates soluble amyloid-beta clearance from brain in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*, 13(4): 709-716.
167. Patel TK, Habimana-Griffin L, Gao X, Xu B, Achilefu S, Alitalo K, McKee CA, Sheehan PW, Musiek ES, Xiong C, Coble D, Holtzman DM. (2019) Dural lymphatics regulate clearance of extracellular tau from the CNS. *Mol Neurodegener*, 14(1): 11.
168. Song E, Mao T, Dong H, Boisserand LSB, Antila S, Bosenberg M, Alitalo K, Thomas JL, Iwasaki A. (2020) VEGF-C-driven lymphatic drainage enables immunosurveillance of brain tumours. *Nature*, 577(7792): 689-694.
169. Louveau A, Plog BA, Antila S, Alitalo K, Nedergaard M, Kipnis J. (2017) Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. *J Clin Invest*, 127(9): 3210-3219.
170. Da Mesquita S, Fu Z, Kipnis J. (2018) The Meningeal Lymphatic System: A New Player in Neurophysiology. *Neuron*, 100(2): 375-388.
171. Izen RM, Yamazaki T, Nishinaka-Arai Y, Hong YK, Mukoyama YS. (2018) Postnatal development of lymphatic vasculature in the brain meninges. *Dev Dyn*, 247(5): 741-753.
172. Rutkowski JM, Boardman KC, Swartz MA. (2006) Characterization of lymphangiogenesis in a model of adult skin regeneration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(3): H1402-1410.
173. Goldman J, Conley KA, Raehl A, Bondy DM, Pytowski B, Swartz MA, Rutkowski JM, Jaroch DB, Ongstad EL. (2007) Regulation of lymphatic capillary

- regeneration by interstitial flow in skin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(5): H2176-2183.
174. Planas-Paz L, Strilic B, Goedecke A, Breier G, Fassler R, Lammert E. (2012) Mechanoinduction of lymph vessel expansion. *EMBO J*, 31(4): 788-804.
 175. Aspelund A, Robciuc MR, Karaman S, Makinen T, Alitalo K. (2016) Lymphatic System in Cardiovascular Medicine. *Circ Res*, 118(3): 515-530.
 176. Potente M, Makinen T. (2017) Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18(8): 477-494.
 177. Tamm ER. (2009) The trabecular meshwork outflow pathways: structural and functional aspects. *Exp Eye Res*, 88(4): 648-655.
 178. Ramos RF, Hoying JB, Witte MH, Daniel Stamer W. (2007) Schlemm's canal endothelia, lymphatic, or blood vasculature? *J Glaucoma*, 16(4): 391-405.
 179. Kizhatil K, Ryan M, Marchant JK, Henrich S, John SW. (2014) Schlemm's canal is a unique vessel with a combination of blood vascular and lymphatic phenotypes that forms by a novel developmental process. *PLoS Biol*, 12(7): e1001912.
 180. Aspelund A, Tammela T, Antila S, Nurmi H, Leppanen VM, Zarkada G, Stanczuk L, Francois M, Makinen T, Saharinen P, Immonen I, Alitalo K. (2014) The Schlemm's canal is a VEGF-C/VEGFR-3-responsive lymphatic-like vessel. *J Clin Invest*, 124(9): 3975-3986.
 181. Park DY, Lee J, Park I, Choi D, Lee S, Song S, Hwang Y, Hong KY, Nakaoka Y, Makinen T, Kim P, Alitalo K, Hong YK, Koh GY. (2014) Lymphatic regulator PROX1 determines Schlemm's canal integrity and identity. *J Clin Invest*, 124(9): 3960-3974.
 182. Truong TN, Li H, Hong YK, Chen L. (2014) Novel characterization and live imaging of Schlemm's canal expressing Prox-1. *PLoS One*, 9(5): e98245.
 183. Kim J, Park DY, Bae H, Park DY, Kim D, Lee CK, Song S, Chung TY, Lim DH, Kubota Y, Hong YK, He Y, Augustin HG, Oliver G, Koh GY. (2017) Impaired angiopoietin/Tie2 signaling compromises Schlemm's canal integrity and induces glaucoma. *J Clin Invest*, 127(10): 3877-3896.
 184. Thomson BR, Heinen S, Jeansson M, Ghosh AK, Fatima A, Sung HK, Onay T, Chen H, Yamaguchi S, Economides AN, Flenniken A, Gale NW, Hong YK,

- Fawzi A, Liu X, Kume T, Quaggin SE. (2014) A lymphatic defect causes ocular hypertension and glaucoma in mice. *J Clin Invest*, 124(10): 4320-4324.
185. Pallone TL, Robertson CR, Jamison RL. (1990) Renal medullary microcirculation. *Physiol Rev*, 70(3): 885-920.
186. Ishikawa Y, Akasaka Y, Kiguchi H, Akishima-Fukasawa Y, Hasegawa T, Ito K, Kimura-Matsumoto M, Ishiguro S, Morita H, Sato S, Soh S, Ishii T. (2006) The human renal lymphatics under normal and pathological conditions. *Histopathology*, 49(3): 265-273.
187. Lee HW, Qin YX, Kim YM, Park EY, Hwang JS, Huo GH, Yang CW, Kim WY, Kim J. (2011) Expression of lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 in the developing mouse kidney. *Cell Tissue Res*, 343(2): 429-444.
188. Schwartz MM, Karnovsky MJ, Vehkatalam MA. (1976) Ultrastructural differences between rat inner medullary descending and ascending vasa recta. *Lab Invest*, 35(2): 161-170.
189. Takahashi-Iwanaga H. (1991) The three-dimensional cytoarchitecture of the interstitial tissue in the rat kidney. *Cell Tissue Res*, 264(2): 269-281.
190. Holliger C, Lemley KV, Schmitt SL, Thomas FC, Robertson CR, Jamison RL. (1983) Direct determination of vasa recta blood flow in the rat renal papilla. *Circ Res*, 53(3): 401-413.
191. Kenig-Kozlovsky Y, Scott RP, Onay T, Carota IA, Thomson BR, Gil HJ, Ramirez V, Yamaguchi S, Tanna CE, Heinen S, Wu C, Stan RV, Klein JD, Sands JM, Oliver G, Quaggin SE. (2018) Ascending Vasa Recta Are Angiopoietin/Tie2-Dependent Lymphatic-Like Vessels. *J Am Soc Nephrol*, 29(4): 1097-1107.
192. Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M. (2006) The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta*, 27(9-10): 939-958.
193. Whitley GS, Cartwright JE. (2010) Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. *Placenta*, 31(6): 465-474.
194. Soares MJ, Chakraborty D, Kubota K, Renaud SJ, Rumi MA. (2014) Adaptive mechanisms controlling uterine spiral artery remodeling during the establishment of pregnancy. *Int J Dev Biol*, 58(2-4): 247-259.

195. Sweeney M, Jones CJ, Greenwood SL, Baker PN, Taggart MJ. (2006) Ultrastructural features of smooth muscle and endothelial cells of isolated isobaric human placental and maternal arteries. *Placenta*, 27(6-7): 635-647.
196. Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Dixon G, Brosens I. (1981) The pattern of interstitial trophoblastic invasion of the myometrium in early human pregnancy. *Placenta*, 2(4): 303-316.
197. Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC. (2002) Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol*, 250(2): 358-373.
198. Brosens I, Renaer M. (1972) On the pathogenesis of placental infarcts in pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*, 79(9): 794-799.
199. Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. (1983) Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta*, 4(4): 397-413.
200. Robson A, Harris LK, Innes BA, Lash GE, Aljunaidy MM, Aplin JD, Baker PN, Robson SC, Bulmer JN. (2012) Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *FASEB J*, 26(12): 4876-4885.
201. Mol BWJ, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, de Groot CJM, Hofmeyr GJ. (2016) Pre-eclampsia. *Lancet*, 387(10022): 999-1011.
202. Gastrich MD, Faro R, Rosen T. (2010) Markers of preeclampsia and the relationship to cardiovascular disease: review of the twenty-first century literature. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 23(8): 751-769.
203. Brown MA, Magee LA, Kenny LC, Karumanchi SA, McCarthy FP, Saito S, Hall DR, Warren CE, Adayi G, Ishaku S, International Society for the Study of Hypertension in P. (2018) The hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis & management recommendations for international practice. *Pregnancy Hypertens*, 13: 291-310.
204. Red-Horse K. (2008) Lymphatic vessel dynamics in the uterine wall. *Placenta*, 29 Suppl A: S55-59.
205. Castro E, Tony Parks W, Galambos C. (2011) Neither normal nor diseased placentas contain lymphatic vessels. *Placenta*, 32(4): 310-316.

206. Red-Horse K, Rivera J, Schanz A, Zhou Y, Winn V, Kapidzic M, Maltepe E, Okazaki K, Kochman R, Vo KC, Giudice L, Erlebacher A, McCune JM, Stoddart CA, Fisher SJ. (2006) Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an in vivo model of human placentation. *J Clin Invest*, 116(10): 2643-2652.
207. Zozzaro-Smith PE, Bushway ME, Gerber SA, Hebert D, Pressman EK, Lord EM, Miller RK, Murphy SP. (2015) Whole mount immunofluorescence analysis of placentas from normotensive versus preeclamptic pregnancies. *Placenta*, 36(11): 1310-1317.
208. Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ. (2002) Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol*, 160(4): 1405-1423.
209. Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. (1991) Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod*, 6(6): 791-798.
210. Li XF, Charnock-Jones DS, Zhang E, Hiby S, Malik S, Day K, Licence D, Bowen JM, Gardner L, King A, Loke YW, Smith SK. (2001) Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(4): 1823-1834.
211. Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, Innes BA, Cooper A, Searle RF, Robson SC, Bulmer JN. (2006) Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(3): 572-580.
212. Zhang J, Dong H, Wang B, Zhu S, Croy BA. (2008) Dynamic changes occur in patterns of endometrial EFNB2/EPHB4 expression during the period of spiral arterial modification in mice. *Biol Reprod*, 79(3): 450-458.
213. Zhou Y, Bellingard V, Feng KT, McMaster M, Fisher SJ. (2003) Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang2, PlGF, and VEGF-C. *Dev Biol*, 263(1): 114-125.
214. Choi I, Chung HK, Ramu S, Lee HN, Kim KE, Lee S, Yoo J, Choi D, Lee YS, Aguilar B, Hong YK. (2011) Visualization of lymphatic vessels by Prox1-

- promoter directed GFP reporter in a bacterial artificial chromosome-based transgenic mouse. *Blood*, 117(1): 362-365.
215. Calvo CF, Fontaine RH, Soueid J, Tammela T, Makinen T, Alfaro-Cervello C, Bonnaud F, Miguez A, Benhaim L, Xu Y, Barallobre MJ, Moutkine I, Lyytikka J, Tatlisumak T, Pytowski B, Zalc B, Richardson W, Kessar N, Garcia-Verdugo JM, Alitalo K, Eichmann A, Thomas JL. (2011) Vascular endothelial growth factor receptor 3 directly regulates murine neurogenesis. *Genes Dev*, 25(8): 831-844.
 216. Karkkainen MJ, Saaristo A, Jussila L, Karila KA, Lawrence EC, Pajusola K, Bueler H, Eichmann A, Kauppinen R, Kettunen MI, Yla-Herttuala S, Finegold DN, Ferrell RE, Alitalo K. (2001) A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(22): 12677-12682.
 217. Louveau A, Kipnis J. (2015) Dissection and immunostaining of mouse whole-mount meninges. *Protocol Exchange*. DOI: doi:10.1038/protex.2015.047.
 218. Kapuscinski J. (1995) DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem*, 70(5): 220-233.
 219. Feldman AT, Wolfe D. (2014) Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol*, 1180: 31-43.
 220. Proulx ST, Ma Q, Andina D, Leroux JC, Detmar M. (2017) Quantitative measurement of lymphatic function in mice by noninvasive near-infrared imaging of a peripheral vein. *JCI Insight*, 2(1): e90861.
 221. Herzog BH, Fu J, Wilson SJ, Hess PR, Sen A, McDaniel JM, Pan Y, Sheng M, Yago T, Silasi-Mansat R, McGee S, May F, Nieswandt B, Morris AJ, Lupu F, Coughlin SR, McEver RP, Chen H, Kahn ML, Xia L. (2013) Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2. *Nature*, 502(7469): 105-109.
 222. Benezech C, Nayar S, Finney BA, Withers DR, Lowe K, Desanti GE, Marriott CL, Watson SP, Caamano JH, Buckley CD, Barone F. (2014) CLEC-2 is required for development and maintenance of lymph nodes. *Blood*, 123(20): 3200-3207.
 223. Haining EJ, Lowe KL, Wichaiyo S, Kataru RP, Nagy Z, Kavanagh DP, Lax S, Di Y, Nieswandt B, Ho-Tin-Noe B, Mehrara BJ, Senis YA, Rayes J, Watson SP.

- (2020) Lymphatic blood filling in CLEC-2-deficient mouse models. *Platelets*: 1-16.
224. Bradbury MW, Cserr HF, Westrop RJ. (1981) Drainage of cerebral interstitial fluid into deep cervical lymph of the rabbit. *Am J Physiol*, 240(4): F329-336.
225. Szentistvanyi I, Patlak CS, Ellis RA, Cserr HF. (1984) Drainage of interstitial fluid from different regions of rat brain. *Am J Physiol*, 246(6 Pt 2): F835-844.
226. Yamada S, DePasquale M, Patlak CS, Cserr HF. (1991) Albumin outflow into deep cervical lymph from different regions of rabbit brain. *Am J Physiol*, 261(4 Pt 2): H1197-1204.
227. Hunter JV, Batchelder KF, Lo EH, Wolf GL. (1995) Imaging techniques for in vivo quantitation of extracranial lymphatic drainage of the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 21(3): 185-188.
228. Plog BA, Dashnaw ML, Hitomi E, Peng W, Liao Y, Lou N, Deane R, Nedergaard M. (2015) Biomarkers of traumatic injury are transported from brain to blood via the glymphatic system. *J Neurosci*, 35(2): 518-526.
229. Chen J, Wang L, Xu H, Xing L, Zhuang Z, Zheng Y, Li X, Wang C, Chen S, Guo Z, Liang Q, Wang Y. (2020) Meningeal lymphatics clear erythrocytes that arise from subarachnoid hemorrhage. *Nat Commun*, 11(1): 3159.
230. Mato M, Ookawara S, Aikawa E, Kawasaki K. (1981) Studies on fluorescent granular perithelium (F.G.P.) of rat cerebral cortex - especially referring to morphological changes in aging. *Anat Anz*, 149(5): 486-501.
231. Mato M, Ookawara S, Sakamoto A, Aikawa E, Ogawa T, Mitsuhashi U, Masuzawa T, Suzuki H, Honda M, Yazaki Y, Watanabe E, Luoma J, Yla-Herttuala S, Fraser I, Gordon S, Kodama T. (1996) Involvement of specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(8): 3269-3274.
232. Shibata-Germanos S, Goodman JR, Grieg A, Trivedi CA, Benson BC, Foti SC, Faro A, Castellan RFP, Correra RM, Barber M, Ruhrberg C, Weller RO, Lashley T, Iliff JJ, Hawkins TA, Rihel J. (2020) Structural and functional conservation of non-lumenized lymphatic endothelial cells in the mammalian leptomeninges. *Acta Neuropathol*, 139(2): 383-401.

233. Brezovakova V, Jadhav S. (2020) Identification of Lyve-1 positive macrophages as resident cells in meninges of rats. *J Comp Neurol*, 528(12): 2021-2032.
234. van Lessen M, Shibata-Germanos S, van Impel A, Hawkins TA, Rihel J, Schulte-Merker S. (2017) Intracellular uptake of macromolecules by brain lymphatic endothelial cells during zebrafish embryonic development. *Elife*, 6: e25932.
235. Venero Galanternik M, Castranova D, Gore AV, Blewett NH, Jung HM, Stratman AN, Kirby MR, Iben J, Miller MF, Kawakami K, Maraia RJ, Weinstein BM. (2017) A novel perivascular cell population in the zebrafish brain. *Elife*, 6: e24369.
236. Fu J, Gerhardt H, McDaniel JM, Xia B, Liu X, Ivanciu L, Ny A, Hermans K, Silasi-Mansat R, McGee S, Nye E, Ju T, Ramirez MI, Carmeliet P, Cummings RD, Lupu F, Xia L. (2008) Endothelial cell O-glycan deficiency causes blood/lymphatic misconnections and consequent fatty liver disease in mice. *J Clin Invest*, 118(11): 3725-3737.
237. Finney BA, Schweighoffer E, Navarro-Nunez L, Benezech C, Barone F, Hughes CE, Langan SA, Lowe KL, Pollitt AY, Mourao-Sa D, Sheardown S, Nash GB, Smithers N, Reis e Sousa C, Tybulewicz VL, Watson SP. (2012) CLEC-2 and Syk in the megakaryocytic/platelet lineage are essential for development. *Blood*, 119(7): 1747-1756.
238. Pivniouk V, Tsitsikov E, Swinton P, Rathbun G, Alt FW, Geha RS. (1998) Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76. *Cell*, 94(2): 229-238.
239. Abtahian F, Bezman N, Clemens R, Sebzda E, Cheng L, Shattil SJ, Kahn ML, Koretzky GA. (2006) Evidence for the requirement of ITAM domains but not SLP-76/Gads interaction for integrin signaling in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol*, 26(18): 6936-6949.
240. Dickinson AJ, Gausas RE. (2006) Orbital lymphatics: do they exist? *Eye (Lond)*, 20(10): 1145-1148.
241. Guimond MJ, Luross JA, Wang B, Terhorst C, Danial S, Croy BA. (1997) Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biol Reprod*, 56(1): 169-179.

242. Boulenouar S, Doisne JM, Sferruzzi-Perri A, Gaynor LM, Kieckbusch J, Balmas E, Yung HW, Javadzadeh S, Volmer L, Hawkes DA, Phillips K, Brady HJ, Fowden AL, Burton GJ, Moffett A, Colucci F. (2016) The Residual Innate Lymphoid Cells in NFIL3-Deficient Mice Support Suboptimal Maternal Adaptations to Pregnancy. *Front Immunol*, 7: 43.
243. Riss P, Bartl W. (1982) Placental function, fetal distress, and the fetal/placental weight ratio in normal and gestotic pregnancies. *Int J Biol Res Pregnancy*, 3(1): 10-13.
244. Yang JM, Wang KG. (1995) Relationship between acute fetal distress and maternal-placental-fetal circulations in severe preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 74(6): 419-424.
245. Frusca T, Morassi L, Pecorelli S, Grigolato P, Gastaldi A. (1989) Histological features of uteroplacental vessels in normal and hypertensive patients in relation to birthweight. *Br J Obstet Gynaecol*, 96(7): 835-839.
246. Davisson RL, Hoffmann DS, Butz GM, Aldape G, Schlager G, Merrill DC, Sethi S, Weiss RM, Bates JN. (2002) Discovery of a spontaneous genetic mouse model of preeclampsia. *Hypertension*, 39(2 Pt 2): 337-342.
247. Ho L, van Dijk M, Chye STJ, Messerschmidt DM, Chng SC, Ong S, Yi LK, Boussata S, Goh GH, Afink GB, Lim CY, Dunn NR, Solter D, Knowles BB, Reversade B. (2017) ELABELA deficiency promotes preeclampsia and cardiovascular malformations in mice. *Science*, 357(6352): 707-713.
248. Winship AL, Koga K, Menkhorst E, Van Sinderen M, Rainczuk K, Nagai M, Cuman C, Yap J, Zhang JG, Simmons D, Young MJ, Dimitriadis E. (2015) Interleukin-11 alters placentation and causes preeclampsia features in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(52): 15928-15933.
249. Liu PP, Xie Y, Meng XY, Kang JS. (2019) History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther*, 4: 29.

10. Saját közlemények jegyzéke

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények:

- I. **Bálint L**, Ocskay Z, Deák BA, Aradi P, Jakus Z. (2019) Lymph Flow Induces the Postnatal Formation of Mature and Functional Meningeal Lymphatic Vessels. Front Immunol, 10: 3043.
IF: 5,085

- II. Pawlak JB, **Bálint L**, Lim L, Ma W, Davis RB, Benyó Z, Soares MJ, Oliver G, Kahn ML, Jakus Z, Caron KM. (2019) Lymphatic mimicry in maternal endothelial cells promotes placental spiral artery remodeling. J Clin Invest, 129(11): 4912-4921.
IF: 11,864

11. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Jakus Zoltán Péternek, aki elindított és vezetett eddigi tudományos pályámon. Köszönöm az elért közös sikereinket, kiváló ötleteit, valamint tanácsait és barátságát. Hálával tartozom neki, amiért mindig számíthattam segítségére és támogatására.

Szeretnék köszönetet mondani az MTA-SE „Lendület” Nyirokélettani Kutatócsoport valamennyi tagjának támogatásukért, és hogy észrevételeikkel segítettek tudományos munkám, valamint az értekezés elkészítése során. Külön köszönöm tudományos diákköri hallgatóinknak, kiemelten Dr. Ocskay Zsombornak, Dr. Deák Bálint Andrásnak, Kovács Gábornak és Horváth Zalának a közös munkát és barátságukat. Köszönöm Aradi Petrának a szövettani minták elkészítése és kiértékelése során nyújtott segítségét. Köszönöm Kemecei Évának, Marinkás-Pusztá Eszternek és Németh Valériának a kiemelkedő színvonalú laboratóriumi háttérmunkájukat.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Hunyady Lászlónak, hogy intézetvezetőként lehetővé tette és támogatta tudományos tevékenységemet. Külön köszönöm Prof. Dr. Ligeti Erzsébetnek, hogy PhD. program-, és iskolavezetőként figyelemmel kísérte tudományos tevékenységemet. Köszönöm az Élettani Intézet munkatársainak, hogy mindig bizalommal fordulhattam hozzájuk segítségért. Külön köszönöm Prof. Dr. Mócsai Attilának, hogy segítette a *Plcy2^{-/-}* egereken végzett kísérleteinket, illetve Dr. Enyedi Balázsnak és Dr. Roux Benoitnak a konfokális képalkotás során nyújtott segítségét.

Köszönöm Prof. Dr. Benyó Zoltánnak, hogy Doktori Tanács elnökeként figyelemmel kísérte munkámat, valamint köszönöm segítségét az egerek szisztolés vérnyomásának mérése során. Köszönöm továbbá Dr. Chinopoulos Christosnak, hogy a vizeletminták gyűjtéséhez metabolikus ketreceket bocsájtott a rendelkezésünkre. Külön köszönöm külföldi kollaborátorainknak, Dr. Kathleen Caronnak és John B. Pawlagnak a spirális artériák strukturális átalakulására irányuló méréseink során nyújtott hozzájárulását. Szeretném megköszönni Dr. Jean-Léon Thomasnak, Dr. James Ihlenak és Dr. Young-Kwon Hongnak, hogy rendelkezésünkre bocsájtották a transzgenikus egértörzseket.

Szeretnék köszönetet mondani továbbá Dávid Zitának a sematikus ábrák elkészítésében nyújtott segítségéért.

Köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy támogattak és kitartottak mellettem a tudományos munkám és értekezésem elkészítése során.