

Retinoidok szerepe az idegi őssejtek differenciációjának szabályozásában

Doktori tézisek

Orsolits Barbara

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Környei Zsuzsanna, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Tóth Sára, egyetemi docens

Dr. Apáti Ágota, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Nagy M. György, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Jancsik Veronika, egyetemi tanár

Dr. Herberth-Minkó Krisztina, egyetemi tanársegéd

Budapest
2013

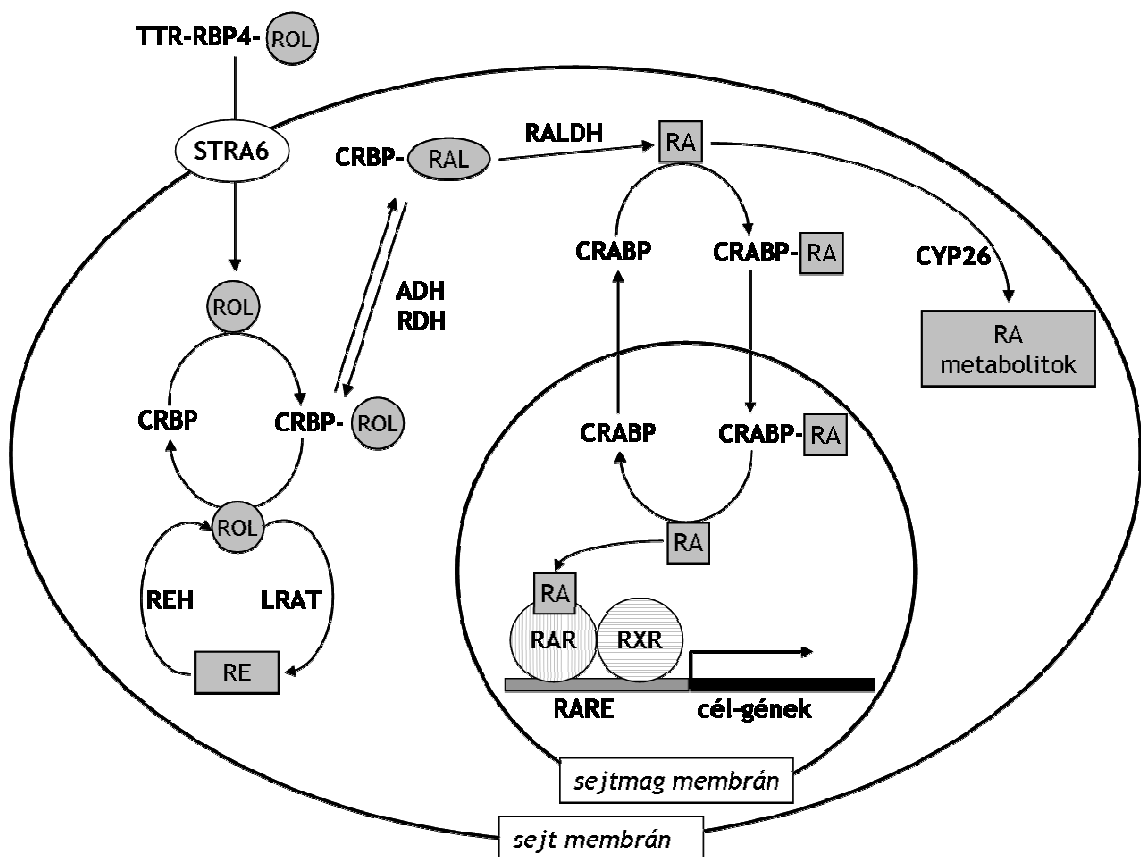
BEVEZETÉS

Az emlősök embrionális fejlődésének végén, a születés körül lezárul az idegsejtképződés fő szakasza. A neurogenesis azonban a posztnatális időszakban is folytatódik. Az idegrendszer létrehozásában részt vevő embrionális őssejtekhez hasonló őssejtek a felnőtt agyban is megtalálhatóak. Az őssejtek olyan széles fejlődési potenciállal rendelkező, osztódóképes sejtek, amelyek egyrészt önmegújításra képesek, tehát önmagukhoz hasonló utódsejteket hoznak létre, másrészt képesek különböző fenotípusú, specializálódott sejtípusok kialakítására is. Felnőttkorban a neurogenesis elsősorban két területen zajlik. Ezek a területek a hippocampus szubgranuláris zónája (SGZ) és a laterális kamra fala mentén található szubventrikuláris zóna (SVZ). Ezekben a neurogén zónákban a felnőttkorban is zajlik neurogenesis.

A felnőtt agy neurogén régióiban az idegi őssejtek mikrokörnyezetének legfontosabb komponensei közé tartoznak az asztroglia-sejtek, amelyek részt vesznek az idegi őssejtek fennmaradásának és differenciálódásának szabályozásában. A régóta elfogadott nézet, amely szerint az asztroglia-sejtek feladata csak az idegsejtek fenntartása és táplálása, ma már idejétmúlt. Az asztroglia-sejteknek sokkal komplexebb feladata van, mint például a szinaptogenezis támogatása, a keringési rendszer felől érkező jelek közvetítése, a sérülések után az ép agyállomány védelme, az ún. „stem cell niche” kialakítása. Egyes asztroglia fenotípusú sejtek önmaguk is idegi őssejtként viselkednek, azaz utódsejtjeik képesek idegsejteké differenciálódni. A nem neurogén zónákból származó differenciált asztrociták azonban nem rendelkeznek őssejt sajátosságokkal. Ugyanakkor, ezek a nem neurogén területekről származó gliasejtek is képesek fiatal idegsejtek, neuronális prekurzorok differenciációját, túlélését és érését befolyásolni. A posztnatális emlős agyból izolált asztroglia-sejtek indukálni képesek elkötelezetlen, pluripotens őssejtek tömeges neuronális differenciációját. Kérdés azonban, hogy vajon milyen asztroglia eredetű faktorok idézik elő az idegsejt irányú fejlődést.

Az idegi őssejtek neuronális differenciációja – asztroglia jelenléte nélkül – all-transz retinsavval is beindítható. Az all-transz retinsav az A vitamin biológiailag aktív származéka, amelynek szerepe elengedhetetlen a normális szerv- és szöveti fejlődésben. Az embrionális fejlődés során a retinsav anterior irányba csökkenő gradiens mentén alakítja ki a test poszterior felére jellemző idegi sajátosságokat. A nélkülözhetetlen

embriónális szerep mellett a retinsav a posztnatális idegrendszerben is jelen van, ám funkciója itt jobbra tisztázatlan. A retinsav lipidoldékony, így a sejtmembránokon keresztül könnyen bejut a sejtekbe. Az A vitamin (retinol) szállítását a vérben az RBP4 (retinol binding protein 4) és a transthyretin komplexe végzi, a sejtbe való bejutást a Stra6 receptor segíti. A sejtben belül intracellulárisan hordozó fehérjékhez kapcsolódik (CRBP-k), amelyek a további transzportot irányítják. A retinsav szintézise során, a retinolt az alkohol- és retinol-dehidrogenázok (ADH és RDH enzimek) retinaldehiddé (retinal) alakítják. A retinalt a retinaldehid-dehidrogenázok (RALDH enzimek) retinsavvá oxidálják. A retinsav lebontásában a citokróm P-450 fehérjék (CYP26 enzimek) vesznek részt. A retinoidok leginkább ismert hatásai két nukleáris receptoron (RAR és RXR) keresztül érvényesülnek. Mindkét receptornak három altípusa van (RAR α , β , γ ; RXR α , β , γ), ezeket különböző gének kódolják. A receptorok egymással heterodimereket képeznek és a célgének specifikus retinsav rezponzív szekvenciáihoz (RARE) kötődve szabályozzák számos gén átíródását.



A retinsav szintézisének és hatásmechanizmusának útvonala.

Az embrionális és idegi őssejtek asztroglialis és a retinsavas indukciója morfológiai változásaiban, időbeli lefutásában valamint a neurális/proneurális gének expressziós változásaiban nagyfokú hasonlóságot mutatott. Ezért feltételeztük, hogy az asztroglia sejtek endogén retinsav termelése felelős lehet a különböző őssejtpopulációk neuronális differenciációjának megindításáért. Az asztroglia sejtek retinsav termelő képessége mellett kíváncsiak voltunk, hogy az idegi őssejtek is rendelkeznek-e ezzel a képességgel? Felmerült bennünk a kérdés, hogy vajon a differenciálódás során az idegi őssejtek endogén retinsav termelése hozzájárul-e a neuronális elköteleződés autokrin regulációjához?

Munkám célja az volt, hogy az asztroglia sejtek és az idegi őssejtek retinsav termelését vizsgáljam, és bizonyítsam annak szerepét az neuronális differenciáció kiváltásában. Az *in vitro* retinsav termelés mellett tanulmányoztuk az asztroglia sejtek *in vivo* retinsav termelő képességeit is. Mindezek mellett megvizsgáltuk a retinsav jelenlétét az agyban és arra kerestük a választ, hogy vajon mely sejt típus(ok) képes(ek) *in vivo* is retinsav produkcióra.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataim során a következő kérdésekre kerestem a választ:

- az asztroglia sejtek rendelkeznek-e a retinsav termelés képességével *in vitro*, ha igen, akkor a retinsav termelésük tehető-e felelőssé az asztroglia által indukált neuronális differenciáció megindításáért,
- van-e különbség a különböző agyterületekről származó asztroglia tenyészetek retinsav termelése és indukációs képessége között
- gátolható-e a gliális indukció a retinsav receptorának antagonistájával
- termelnek-e az asztroglia sejtek *in vivo* is retinsavat
- képesek-e az idegi őssejtek a retinsav termelésére
- ha igen, ezzel képesek-e a saját differenciációjukat autokrin módon szabályozni
- azonosíthatunk-e a felnőtt idegrendszerben retinsav reszponzív és potenciális retinsav termelő populációkat

MÓDSZEREK

Sejttenyészetek készítése és fenntartása

A sejtek *in vitro* fenntartásához poli-L-lizines (PLL) aljzat biztosítja a megfelelő letapadási felszínt. A sejteket 5% CO₂ tartalmú gázkörnyezetben, 37°C-on tenyésztettük.

Primer asztroglia tenyészetek: Újszülött egerekből steril körülmények között kiemeltük az agyakat, megtisztítottuk az agyhártyáktól és tripszinnel előemésztettük. Az előemésztett agyszövetet Pasteur pipettával trituráltuk, az egyedi sejtekből álló sejtszuspenziót tenyésztőedénybe tettük. Az *in vitro* fenntartás 7. - 10. napjára 95%-ban GFAP-pozitív sejtekből álló, összefüggő monolayer alakult ki.

NE-4C sejtek: Neurális őssejtként – azaz több eltérő sejtípus kialakítására képes, önmegújító sejtként – p53 deficiens egérembriók elülső agyhólyagjából származó neuroektodermális sejtek klónját, az ún. NE-4C sejt vonalat használtuk.

Embriionális őssejtek (ES): Az egérből származó embriionális őssejtek [R1 illetve CD1-GFP ES vonalak] Dr. Góczy Elen-től származnak (Gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Állatbiológiai Intézet). Vizsgálatainkhoz az ES sejteket

függőcseppekben elődifferenciáltattuk, és az így kialakuló embriócsomókkal (embryoid body) dolgoztunk.

Radiális glia-szerű sejtek: A sejtek 14,5 napos egér (CD1) embrióból illetve felnőtt egerek (CD1) különböző agyterületeiről (SVZ, HC) izoláltuk. A sejtek szuszpenzióit AK-ciklo[RGDFC]-vel borított petricsészékben növesztettük. Klónozással hoztunk létre egy sejt eredetű vonalakat, amelyek különböző kezelések hatására idegsejt, asztrogliia és oligodendrocita irányú elköteleződésre képesek.

Kontakt és nem-kontakt ko-kultúrák

Vizsgálatainkhoz asztrogliaanyagok és idegi őssejtek kontakt illetve nem-kontakt ko-kultúráit hoztuk létre. A kontakt ko-kultúrákban a kétféle sejtípus között közvetlen sejt-sejt kapcsolat alakul ki, ezzel szemben a nem-kontakt ko-kultúrákban a sejtek csak a tápfolyadékot keresztül „érintkeztek” egymással, közvetlen sejt-sejt kapcsolat nem alakult ki közöttük.

Neurális indukció retinoidokkal és szérumban megvonással

Az NE-4C sejtekhez a letapadást követően adtuk a retinolt, retinil-észtert és retinsavat 100 nM koncentrációban. A retinolt és a retinil-észtert a kísérlet végéig folyamatosan alkalmaztuk, a retinsavat csak az első 48 órában. Az NE-4C sejtek szérumban megvonás – és ezzel növekedési faktor megvonás – hatására is idegsejteké differenciálódnak.

Életképesség mérése

Az életképesség-mérést a sejtek tetrazólium sókat redukáló képességének meghatározásával, MTT-teszttel végeztük. A keletkezett formazán kristályokat feloldva az oldatok optikai denzitását 570 nm-en, 630 nm-es referencia hullámhossz mellett ELISA-fotométerben mértük.

Polimeráz lánreakciók - PCR

RT-PCR

A PCR amplifikációkhoz az RNS mintákat Trizolban (Sigma) lizáltuk. A DNS szennyezés DNase-I (Fermentas) kezeléssel eltávolítottam. A reverz transzkripciót 1,5 µg RNS-ből First strand cDNA synthesis Kit (Fermentas) használatával végeztük. A PCR Taq polimerázt (Fermentas) használtunk. Negatív kontrollként DNS templát nélküli reakcióelegyet alkalmaztunk. A minták cDNS tartalmát a HPRT „háztartási” génről átíródó cDNS mennyiségek alapján hasonlítottam össze. A PCR termékeket

etidium-bromid tartalmú 1,25% agaróz gélen futtattuk, majd UV transz-illuminációval tettük láthatóvá.

Real-Time PCR

A mérésekhez a teljes RNS kinyeréséhez a mintákat RNazol RT oldatban lizáltuk. A DNS tartalom eltüntetéséhez rDNase kit-et (Macherey-Nagel) használtunk, majd NucleoSpin RNA Clean-up XS kit-et alkalmaztunk. A reverz transzkripciót SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies) segítségével végeztük. Relatív kvantitatív Real-Time PCR: intron-spanning primert és Power Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) felhasználásával. Az amplifikációt StepOnePlus (Applied Biosystems) berendezésen végeztük. Az adatok a HPRT expressziójára lettek normalizálva, a kiértékelés a StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems) segítségével történt a $\Delta\Delta C_T$ módszert használva. A relatív quantity (RQ) értékek One-Way ANOVA-val voltak analizálva. A Real-Time PCR reakciókat, a kiértékelést és a primerek tervezését Dr. Borsy Adrienn végezte az MTA - Kémiai Kutató Központban.

Retinsav meghatározása bioassay segítségével: Retinsav jelenlétében az F9-RARE-LacZ embrionális karcinóma riporter sejtek β -galaktozidáz (β -gal) enzimet termelnek. Az enzim jelenléte kimutatható színes csapadékot adó szubsztrátok segítségével.

Retinsav meghatározása HPLC segítségével

A sejteket sejtkaparó segítségével távolítottuk el a petricsészék felületéről, a fényérzékeny retinoidok megóvása érdekében a mintavételt tompított fényben végeztük, a mintákat pedig barna színű eppendorf csövekben szállítottuk. A HPLC-MS-MS analízist Dr. Ralph Rühl a Debreceni Orvostudományi Egyetem Biokémia és Molekuláris Biológia Intézetében végezte.

Transzkardiális perfúzió és metszetkészítés

Az egereket és patkányokat altatáshoz Ketamin (10 mg/ml) és Xylazin (2 mg/ml) 2:1-es arányú keverékét használtuk. A mellüreg feltárása után a szív bal kamrájába perfundáló folyadékkal feltöltött kanült vezetünk. A jobb pitvaron ejtett metszés után először PBS-t, majd 4% PFA oldatot áramoltattunk át a teljes fixálódásig. Az agyat a kiemelés után 4%-os PFA oldatba, majd 25% glükózt tartalmazó oldatba helyeztük. A fixált agykból szánka-mikrotóm segítségével 30 μ m vastag metszeteket készítettünk.

Immuncitokémiai és immunhisztokémiai festés

A fixált preparátumokat Triton-X-100 oldattal feltártuk, a tenyészeteket 3-5% szérumot (FCS) tartalmazó oldatba helyezve a nem specifikus kötőhelyeket blokkoltuk. Az elsődleges ellenanyaggal egy éjszakán vagy hétvégén át inkubáltuk +4°C-on. Második réteggént biotin konjugátumot használtunk, harmadik réteggént peroxidáz enzimmel vagy fluoreszcens festékekkel jelölt avidint alkalmaztunk. Az elemzéshez fluoreszcens mikroszkópot (Zeiss Axiovert 200 M) és konfokális mikroszkópot (NIKON A1R konfokális mikroszkóp – KOKI - NIKON mikroszkóp Központ) használtam.

Fluoreszcencia Aktivált Sejtszortírozó berendezés (FACS)

Becton-Dickinson FACS Vantage áramlási citométer berendezést használva különítettem el egymástól a zöld fluoreszcenciával rendelkező sejteket a nem jelöltektől. Így az általunk használt transzgén állatokból közvetlenül jutottunk tiszta sejt populációkhoz.

Statisztika

Az eredmények értékelésekor kiszámoltuk az adott mérési csoport adatainak számtani középértékét (átlagát), valamint a korrigált tapasztalati szórást („standard deviation”, SD). Az egyes kezelési csoportok értékeit Student-féle kettős t-próbával hasonlítottuk össze. A csoportok közötti értéket akkor tekintettük szignifikánsnak ha $p < 0.05$ értéket kaptunk.

EREDMÉNYEK

Az asztroglia sejtek retinsav termelésének vizsgálata

Az általunk vizsgált elkötelezetlen embrionális- és NE-4C idegi őssejtvonalak sejtjei az asztroglia sejtekkel közös ko-kultúrákban idegi irányú differenciációt mutattak. Ez a folyamat morfológiailag, molekuláris biológiai szempontból és időbeli lefutásában nagyon hasonló volt a már régóta, más munkacsoportok által is alkalmazott retinsavas differenciáltatáshoz. Ebből a megfigyelésünkből származott az a feltételezés, amely szerint az asztroglia sejtek által termelt retinsav az egyik kulcsfontosságú jelátviteli molekula, amely felelős az asztroglia által indukált neurogenesisért a különböző eredetű őssejt populációkban. Ezért munkám során először az asztroglia sejtek és az őssejtek kölcsönhatásait vizsgáltam, különös tekintettel a retinsavra.

A tenyésztett asztroglia sejtek retinsav termelését többféle módszerrel vizsgáltuk. Első lépésként a retinsav előállításához szükséges enzimek expresszióját ellenőriztük RT-PCR segítségével. Eredményeink azt mutatták, hogy az asztroglia sejtek *in vitro* rendelkeznek a retinsav előállításának utolsó lépéséhez szükséges Raldh kulcsenzimek mRNS-ével. Ez azonban még nem feltétlenül jelenti azt, hogy ezek az enzimek fehérje szinten is megjelennek, működnek és retinsavat állítanak elő az asztroglia sejtekben. Ezért a retinsav termelés kimutatásához retinoid-szenzitív bioassay-t alkalmaztunk. A RARE-LacZ transzgénnel rendelkező F9 sejtek az asztroglia környezetébe helyezve bizonyították a jelentős mértékű retinsav termelést. A nem-kontakt ko-kultúrával és kondicionált médiummal történt vizsgálatok igazolták, hogy a retinsav kikerül az asztroglia sejtekből és a tápközegen keresztül fejti ki hatását, a RAR szignalizációs útvonalat és ezen keresztül a LacZ transzgént aktiválva a riporter sejtekben. A különböző retinsav izoformák elkülönítéséhez HPLC-t alkalmaztunk, amellyel azonosítottuk az asztroglia sejtek által termelt retinoidokat. A mérés azt mutatta, hogy a tenyésztett asztroglia sejtek mintájában jelentős mennyiségben jelen van a neurogenesiset kiváltani képes all-transz retinsav, emellett kisebb mértékben a 9-cisz és a 13-cisz forma is megjelenik.

Vizsgáltuk, hogy van-e regionális különbség az asztroglia sejtek retinsav termelő képessége között. Eredményeink szerint a Raldh enzimek mRNS-e jelen van a közéagyból, hipotalamuszból, agykéregből, utóagyból és kisagyból származó

mintákban is. Az eltérő agyi régiókból származó asztroglia sejtekben csak kismértékű különbségeket fedeztünk fel az expressziós szintek között. A riporter sejt vonal segítségével kimutattuk a retinoidok jelenlétét minden agyterületből tenyésztett sejt kultúrában, jelentős különbségeket azonban itt sem figyelhettünk meg. A HPLC mérés igazolta az all-transz retinsav jelenlétét mindegyik régióból származó tenyészetben.

Mindezekből arra következtethetünk, hogy a tenyésztett asztroglia sejtek származási helyüktől függetlenül képesek az all-transz retinsav termelésére.

A retinsav szignalizáció gátlásának hatása

Az asztroglia sejtek tehát retinsavat termelnek, de ez még nem bizonyítja azt, hogy ez a képességük tehető felelőssé a neurogenesis kiváltásáért az őssejtekkel kialakított ko-kultúrákban. Ezért a közös tenyészeteket a retinsav szignalizáció hatását akadályozó retinsav receptor antagonistával kezeltük.

Az asztroglia/őssejt ko-kultúrákban a retinsav szignalizáció blokkolása gátolja az idegsejtek képződését az elkötelezetlen embrionális őssejt aggregátumokban és az NE-4C sejtek tenyészetében. Emellett az embrionális őssejt indukált és retinsav receptor antagonistával kezelt aggregátumaiban pulzáló sejtek csoportjait figyeltük meg. Ezeket a sejteket szívizom sejtekként azonosítottuk. Az irodalomból is ismert, hogy a retinsav szignalizáció gátlásának hatására szívizom irányú differenciáció következik be az embrionális őssejtekben. Az antagonistával való kezelés a neurogenesis csak abban az esetben csökkentette, ha a ko-kultúra kialakításának kezdetétől jelen volt, egy napos késéssel hozzáadva már hatástalannak bizonyult. Megjegyzendő, hogy a retinsav szignalizáció gátlása nem szünteti meg teljesen az idegsejtek képződését. Ebből arra következtethetünk, hogy a folyamat során más szignalizációs útvonalak is beindulhatnak.

Mindezeket együttevén az adataink azt jelzik, hogy a tenyésztett asztroglia sejtek olyan mennyiségben termelnek retinsavat, amely hatékonyan váltja ki a neuronális elköteleződést az őssejtekben a retinsav receptoron keresztül történő szignalizációs útvonalat aktiválva. Eddigi eredményeim arra engednek következtetni, hogy az asztroglia potenciális forrása lehet a retinsavnak a központi idegrendszerben.

Az asztroglia sejtek retinsav termelése *in vivo*

Az asztroglia sejtek vizsgálatához FACS segítségével izoláltunk asztroglia sejteket hGFAP-GFP transzgen egerekből és vizsgáltuk bennük a retinsav metabolizmus elemeinek mRNS szintjét. A retinsav előállításához szükséges enzimek mindegyike megtalálható a frissen izolált asztroglia sejtekben. További, F9 retinsav riporter bioassay méréseink azonban azt mutatták, hogy a tenyésztett asztrogliaival ellentétben a frissen izolált asztroglia nem rendelkezik kimutatható retinsav produkcióval. Ennek magyarázata lehet, hogy a tenyésztés során előnybe kerülnek a retinsav termeléssel rendelkező sejtek, vagy az agyszövetben az asztroglia sejtek korlátozott hozzáféréssel rendelkeznek az előállító enzimek szubsztrátjaihoz, esetleg az izolált és *in vitro* fenntartott sejtek felszabadulnak egyfajta gátlás alól, ami akadályozza a retinsav előállítását *in vivo*. Ezek az elképzelések önmagukban vagy kombinálva jelenthetik a megoldást arra, hogy miért látunk szignifikáns retinsav termelést a tenyésztett asztroglia sejtekben a származási helyüktől függetlenül és miért nem tapasztalunk termelést az agyból frissen izolált sejtekben.

Az idegi őssejtek retinsav termelése

Munkánk során vizsgáltuk a retinsav metabolizmus elemeinek jelenlétét elkötelezetlen és differenciáltatott NE-4C idegi őssejtekből és radiális gliasejtekből származó mintákban. Eredményeink alapján bizonyos őssejt populációk képesek a retinolt és a retinil-észtert átalakítani és felhasználni, de ez a képességük nagymértékben függ az idegi irányú elköteleződésük állapotától. A korai neuroektodermális eredetű (E9,5) NE-4C sejtekből az F9 bioassay segítségével azonban nem tudtuk direkt retinsav termelés kimutatni. Elképzelhető, hogy a termelt retinsav mennyisége annyira kicsi, hogy a riporter assay érzékenységét nem haladja meg. Ez azonban nem zárja ki a retinsav hatást, azt ugyanis méréseink során tapasztaltuk, hogy nagyon kis koncentrációban (10^{-12} M alatt) is képes a neurogenezist kiváltani. Ezért az elkötelezetlen sejteket különböző retinoidokkal kezeltük, amely feltűnő különbségeket idézett elő a differenciáció lefutásában. A retinoid és szérum mentes, a retinollal kezelt, a retinil-észterrel kezelt és a retinsavval indukált tenyészetekben időbeli és neuronszámbeli különbségeket tapasztaltunk. A retinsavas indukció során keletkeznek

leghamarabb és legnagyobb számban idegsejtek, ehhez képest késéssel és kevesebb idegsejt megjelenésével következik a retinolos kezelés, majd a retinil-észteres indukció. A sort a szérummegvonással kiváltott indukció zárja, ahol a neurogenézis a legkisebb mértékű és a legkésőbb kezdődik. A folyamat lezajlása során tapasztalt időbeli különbségek azt tükrözik, hogy a hozzáadott retinoidoknak a retinsavvá való alakulásukhoz hány enzimikus lépésre van szükségük. Az NE-4C sejtek tehát képesek a retinoidok retinsavvá alakítására és ezzel a neuronális differenciációjuk autokrin szabályozására.

A radiális gliasejtekből nem csak a retinoid raktározás enzimeit hiányoznak, hanem a lebontás enzimeit sincsenek jelen, függetlenül a differenciációs állapottól. A retinsav előállítását végző enzimek mRNS-e jelen van, de a differenciációs állapottól függ a mennyisége. A radiális gliasejtekből kimutatható a retinsav érzékeny bioassay segítségével a retinsav jelenléte. Azt azonban nem sikerült bizonyítanunk, hogy a radiális gliasejtekben lezajló neurogenézist befolyásolja-e az általuk termelt retinsav. Ez azt sugallja, hogy a retinsav hatás szükséges lehet néhány – általunk még nem azonosított - funkció fenntartásához ezekben a sejtekben. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, amely szerint a radiális gliasejtek indukciója során hozzáadott retinol, retinil-észter és retinsav nem volt hatással a differenciáció során keletkező idegsejtek számára, annak ellenére, hogy ezekben a sejtekben endogén retinsav termelést tapasztaltunk.

Retinsav a központi idegrendszerben

A retinsav hatása a posztnatális agyban csak bizonyos, erősen lokalizált régiókban érhető tetten. Ma már számtalan bizonyíték támasztja alá, hogy a hippcampusban befolyásolja a szinaptikus plaszticitást, szabályozza a proliferációt és a neurogenézist a szaglóhámban, a szubventrikuláris zónában és a szubgranuláris régióban.

A szubventrikuláris zónában a retinsav elősegíti a progenitorok osztódását és neuronális differenciációját is. Munkánk során ebben a régióban megfigyeltünk retinsav rezponzív asztroglia sejteket és idegi progenitorokat, a retinsav szintéziséért felelős enzimek jelenlétét azonban nem tudtuk bizonyítani. Ezzel szemben az oldalkamrában található choroid plexus jelentős mértékű Raldh2 immunpozitivitást mutatott.

A hippocampus szubgranuláris zónájában található retinoid rezponzív sejtek nagy többségét szemcsesejteként azonosítottuk. A hippocampális sejtek neuronális differenciációjához és túléléséhez nélkülözhetetlen az A vitamin, de a szemcsesejtek osztódásához nem szükséges. Irodalmi adatok támasztják alá, hogy in situ hibridizációs és immunhisztokémiai kísérletekkel nem lehet kimutatni a Raldh enzimeket rágcslók hippocampusában. Ezek az eredmények alátámasztják az általunk kapott képet, amely szerint az agyszövetben – és így a hippocampusban sem – figyeltünk meg Raldh2 immunpozitív sejteket. Nagyon fontos fejlemény azonban, hogy a Raldh2 enzim jelen van a hippocampust is borító agyhártyában, amely így potenciális retinsav forrása a környező szöveteknek, amelyekbe a retinsav diffúzióval gradiens szerűen bejut.

KÖVETKEZTETÉSEK

- Az asztroglia sejtek *in vitro* körülmények között képesek indukálni különböző eredetű, őssejt-sajátságokkal rendelkező sejtek neuronális differenciációját.
- A különböző agyterületekről származó, tenyésztett asztroglia sejtekben jelen van a retinsav szintéziséhez szükséges kulcsenzimek mindegyike és a tenyészetekből többféle módszer alkalmazásával kimutatható az all-transz retinsav direkt jelenléte.
- A retinsav szignalizáció gátlásakor a neuronális differenciáció mértékében tapasztalt csökkenés bizonyítja, hogy az asztroglia sejtek által termelt retinsav a retinsav receptorokon keresztül fejti ki indukációs hatását.
- Az *in vitro* tapasztalatokkal ellentétben az asztroglia sejtek *in vivo* nem termelnek retinsavat, annak ellenére, hogy rendelkeznek a szükséges enzimkészlet mRNS-ével. Az asztroglia sejtek retinsav termelése valószínűleg a tenyésztés során erősödik fel.
- Az asztroglia sejtek mellett az általunk vizsgált idegi őssejtek is termelnek retinsavat, produkciójuk azonban függ a rendelkezésre álló metabolitok mennyiségétől. Ha azonban ezek rendelkezésre állnak, akkor a sejtek képesek a szubsztrátok felhasználásával retinsavat szintetizálni, amely elősegíti a saját differenciációjukat.
- A felnőttkori neurogén zónákban jelen van a retinsav. Asztroglia sejtek és idegi progenitorok környezetében kimutatható, ezekben a sejtekben azonban a termeléshez szükséges egyik enzim, a Raldh2 nem expresszálódik. Ezek szerint az itt levő retinsavat ezek a sejtek másik enzimek segítségével állítják elő, vagy az agyhártya felől kapják diffúzióval. Az ugyanis a teljes élet során termel jelentős mennyiségben retinsavat.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőm, Dr. Környei Zsuzsanna szakmai támogatását, útmutatását, türelmét és kitartását, amelyek lehetővé tették, hogy munkám jó ütemben és jó irányba haladjon tanulmányaim során.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskolájának és az MTA-KOKI munkatársainak a segítségnyújtásért doktori tanulmányaim, munkám és dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönet illeti Dr. Madarász Emiliát, aki laborvezetőként biztosította munkámhoz a szükséges szakmai és anyagi háttérrel.

Külön köszönettel tartozom Barabás Liának, aki végtelen türelemmel és hozzáértéssel segített hozzá számos módszer elsajátításához és bevezetett a sejttenyésztés rejtelmeibe.

Hálás vagyok az Idegi Sejt- és Fejlődésbiológiai Laboratórium minden régi és jelenlegi tagjának a szakmai támogatásért és a nagyszerű légkör megteremtéséért, amely színesebbé és könnyebbé tette a szorgos munkanapokat.

Ágoston Viktor	Köhidi Tímea	Székács Inna
Barabás Kornélia	Környei Zsuzsanna	Szelényi Judit
Demeter Kornél	Madarász Emília	Tárnok Krisztián
Fekete Rebeka	Markó Károly	Vágovits Balázs
Gaál Katalin	Mészáros Zsófia	Van Weert Szuzan
Hádingér Nóra	Murali Kumarasami	Varga Balázs
Herberth Balázs	Neubrandt Máté	Vőfély Gergő
Jády Attila	Nyámándi Piroska	Vörös Erzsébet
Jelitai Márta	Papp Noémi	Zádori Anita
Kenesei Kata	Schlett Katalin	

Köszönöm az együttműködést kollaborációs partnereinknek:

- Dr. Borsy Adrienn és Dr. Welker Ervin (MTA-Kémiai Kutató Központ)
- Dr. Deli Mária és Dr. Veszélka Szilvia (MTA-Szegedi Biológiai Központ)
- Dr. Gócza Elen (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont)
- Dr. Ralph Rühl (Debreceni Egyetem)
- Dr. Szabó Bálint (Eötvös Loránd Tudományegyetem)

Köszönettel tartozom a KOKI Nikon Mikroszkóp Központjának, a Nikon Austriának, az Auro-Science Kft.-nek és Katona Istvánnak, hogy lehetővé tették a konfokális mikroszkóp használatát. Hálás vagyok Barna Lászlónak, amiért nagy türelemmel és hozzáértéssel segített elsajátítani a műszer használatát és lehetővé tette, hogy munkám során csodálatos képek szülessenek.

Valamint köszönöm családomnak és barátaimnak a rengeteg biztatást és támogatást, amivel tanulmányaimat segítették, hogy mindig számíthattam rájuk és mindazért az időért, amit tőlük vettem el a doktori munkám végzésével.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Környei Z, Gócza E, Rühl R, **Orsolits B**, Vörös E, Szabó B, Vágovits B, Madarász E. (2007) Astroglia-derived retinoic acid is a key factor in glia-induced neurogenesis. *FASEB J.* 21(10):2496-509.

Impakt factor: 6,791

Orsolits B, Borsy A, Madarász E, Mészáros Z, Kőhidi T, Markó K, Jelítai M, Welker E, Környei Z. (2013) Retinoid machinery in distinct neural stem cell populations with different retinoid responsiveness.

Stem Cells Dev. 2013 Oct 15;22(20):2777-93.

Impakt factor: 4,670

Disszertációtól független közlemény

Veszélka S, Tóth AE, Walter FR, Datki Z, Mózes E, Fülöp L, Bozsó Z, Hellinger E, Vastag M, **Orsolits B**, Környei Z, Penke B, Deli MA. (2013) Docosahexaenoic Acid Reduces Amyloid- β Induced Toxicity in Cells of the Neurovascular Unit.

J Alzheimers Dis. 36(3):487-501.

Impakt factor: 4,174