

# Különböző agyterületekről izolált radiális glia- jellegű idegi őssejtek sajátosságainak összehasonlító elemzése

Doktori tézisek

**Kóhidi Tímea**

Semmelweis Egyetem  
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Madarász Emília, DSc., professzor emeritus,

Hivatalos bírálók: Dr. Apáti Ágota, Ph.D., tudományos főmunkatárs,  
Dr. Nagy Nándor Ph.D., docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Csillag András, DSc. professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Wittner Lucia, Ph.D. tudományos főmunkatárs  
Dr. Réthelyi János, Ph.D. egyetemi tanár

Budapest  
2019

## Bevezetés

Az idegrendszer összes neuroektodermális eredetű sejtípusát az idegi őssejtek/progenitorsejtek hozzák létre. A központi idegszövet őssejtjei a radiális glia sejtek. Korai embrionális korban, az elsődleges idegi germinatív réteget alkotó radiális glia sejtek hosszú, radiális nyúlványai átérrik a fejlődő agykéreg teljes vastagságát, gliális (BLBP, GLAST; főemlősök esetén GFAP) és őssejt tulajdonságokkal (nesztin, aszimmetrikus osztódás képessége) is rendelkeznek. Az általános radiális glia tulajdonságok mellett, ezek a sejtek eltérő pozicionális génexpressziós mintázatot mutatnak, attól függően, hogy melyik agyi régióban található. Ezek az ún. régióspecifikus gének meghatározzák a radiális glia sejtekből differenciálódó idegsejtek típusát és neurotranszmitter fenotípusát is. Az embrionális fejlődés késői szakaszában a radiális glia sejtek egy része a kamrát határoló ependyma sejtekké alakul, más részük elveszíti apikális kapcsolatát a kamrafelszínnel és fokozatosan átalakul asztroglia sejté. A radiális glia sejtek egy jelentős csoportja azonban osztódóképességét és ős/progenitorsejt sajátosságait megtartja, és az ependyma sejtek rétege mentén létrehozza a másodlagos idegi germinatív réteget, a szubventrikuláris zónát. Ebből a zónából származnak az előagykéreg GABAerg interneuronjai, számos kéreg alatti mag idegsejtjei és az előagygi gliasejtek többsége. A szubventrikuláris zóna sejtkepző aktivitása a születés után fokozatosan csökken, de rágszálókban az előagygi odalkamrák szubventrikuláris zónájában (SVZ) és a hippocampus szubgranuláris zónájában (SGZ) felnőtt korban is keletkeznek új idegsejtek. A keletkezés helyéről szabályozott útvonalon elvándorló progenitorsejtek, az idegszöveti fejlődés különböző stádiumaiban levő „nyugvó sejtekként”, a működő agyi parenchimában is megtalálhatók, és megfelelő ingerek hatására sejtkepzésre készíthetők. Ez a tudás vázolta a klinikai idegsejt-pótlás lehetőségét, de azonnal felvetette a kérdést: ha van szövetkepző sejtkapacitás, vajon miért feltűnően alacsony a regeneráció lehetősége a központi idegszövetben. Vajon a kifejlett agyszövetben túlélő idegszöveti őssejtek autonóm, belső fejlődési lehetőségei korlátozottak? Vagy az idegszöveti őssejtek felnőtt korban is széles fejlődési potenciállal rendelkeznek, de a központi idegszövet belső környezete gátolja a sejtfejlődés lehetőségeinek megvalósulását?

Munkám során egér központi idegszövetének radiális glia jellegű ős/progenitor sejtpopulációit izoláltam, hogy sejtbiológiai sajátosságait és sejtkepző kapacitásukat in vitro, jól definiált környezetben vizsgálhassam. Különböző idegi ős/progenitor sejtek jellemzésével és in vitro befolyásolásával kerestem választ arra, hogy a központi idegszövet idegi őssejtjeink „sorsa” hogyan befolyásolható a környezeti hatások változtatásával. A környezeti hatások közül a

sejtek fejlődésének minden szakaszát befolyásoló ionos stimuláció hatásait vizsgáltam az ősz/progenitor sejtek motilitásának szabályozásában.

## **Célkitűzések**

Doktori munkám során a következő célokat tűztem ki:

- radiális glia-jellegű idegi őssejtek izolálása az embrionális és kifejlett egéragy különböző területeiről; idegi őssejt-klónok előállítása
- különböző eredetű, klónozott radiális glia-jellegű idegi őssejtek sejtbiológiai sajátosságainak és génexpressziós mintázatának összehasonlítása
- klónozott radiális glia-jellegű idegi őssejtek differenciációs képességének összehasonlítása
- az ionos stimulálás sejtváándorlásra gyakorolt hatásának elemzése channelrhodopszin fényérzékeny ioncsatornát kifejező radiális glia-jellegű idegi őssejteken

## **Anyagok és módszerek**

### **AK-ciklo[RGDfC] –vel borított tenyésztőfelszínek létrehozása**

Az AK-ciklo[RGDfC] 1mg/ml-es törzsoldataiból közvetlenül felhasználás előtt 10 µg/ml-es oldatot készítettünk. A polystirén vagy üveg tenyésztőfelszíneket bevontuk a peptiddel 0.25µg peptidet juttatva minden cm<sup>2</sup>-re. Szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk az oldatban a tenyésztőfelszíneket, majd leszívtuk róluk az oldatot. Steril körülmények között, tenyésztő fülkében megszárítottuk a bevont felszíneket.

### **Embrionális és felnőtt primer sejtszuspenzió előállítása**

Időre pároztatott hGFAP-GFP, vad típusú CD1-es, CD1/EGFP és B6;129S-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm32(CAG-COP4\*H134R/EY FP)Hze/J</sup> transzgen egereket ketamin (100 µg/g)/xylazin (10 µg/g) injekcióval elaltattunk a vemhesség 14-17,5. napján vagy a posztembrionális fejlődés 62. napján. Izoláltuk az embriók (10-25 db) előagyát és a felnőtt egerek kívánt agyterületeit az előagyi oldalkamrák szubventrikuláris zónájából, a hippocampus területéről, a parietális cortex területéről és a colliculus superior dorso-laterális részéről. Mikroszkóp alatt eltávolítottuk az agyhártyákat. A szövetdarabokból Pasteur pipetta segítségével DMEM-ben triturálva a szövetet sejtszuspenziót készítettünk. A felnőtt agyszövetből származó szövetdarabok esetén a mechanikai disszociáltatás mellett enzimátikus diszszociáltatást is

végeztünk a Neural Tissue Dissociation Kit (Miltenyi Biotec) –et használva, a gyártó utasításai szerint. Az így kapott sejtszuspenziókat 45µm pórusátmérőjű szitaszöveten szűrtük át. A szűrletben lévő egyedi sejteket hemocitóméterrel megszámloltuk.

Az állatkísérleteket a helyi hatóságok engedélyei alapján (engedélyszám: 22.1 / 3894/003/2009) végeztük, különös figyelmet fordítva az állatkísérletek etikai szabályaira az Európai Közösségi Tanács ajánlása szerint (86/609/EEC and 2010/63/EU).

### **Radiális glia- jellegű sejt kultúrák létrehozása**

Az embrionális és felnőtt agyból izolált sejtszuspenziókat lecentrifugáltuk (120g, 10 perc), majd felfuszpendáltuk az alap RGI- tápoldatban, amely 50/50% DMEM/F12-t (Sigma) és 1% B27 (Gibco, Invitrogen) szupplementet tartalmaz. Majd kiültettük a sejteket  $2 \times 10^5$  sejt/cm<sup>2</sup> koncentrációban az AK-ciklo[RGDfC]-vel borított aljzatra. A sejtek kiültetését követően az alap RGI- tápoldatot kiegészítettük 20ng/ml EGF-vel (Preprotech).

Az embrionális eredetű sejt kultúrákról minden 2. nap lecseréltük a tápoldatot. Mielőtt hozzáadtuk volna a sejtekhez az új tápoldatot, PBS-sel lemostuk az aljzatról a gyengén tapadó sejteket. A felnőtt eredetű sejt kultúrákon nem végeztünk PBS-es mosást, és csak a tápoldat felét cseréltük le minden 2.nap az első hét során.

Egy hét elteltével, amikor az embrionális sejt kultúrák konfluens állapotúak lettek, a felnőtt sejt kultúrákban pedig létrejöttek a kolóniák, a sejteket tripszinnel (0.05% tripszin, 1mM EDTA PBS-ben oldva, 1 perc szobahőmérsékleten) felemésztettük, és alap RGI médiummal lemostuk az aljzatról. Az így kapott sejtszuspenziókat szétszítottuk és friss AK-ciklo[RGDfC]-vel borított tenyésztőedénybe ültettük át  $10^5$  sejt/cm<sup>2</sup> sűrűségben. Az első átültetést követően a sejt kultúrákat minden 2. vagy 3. nap szétszítottuk és új tenyésztőedénybe ültettük át. 3-4 átültetést követően a sejt kultúrák láthatóan homogén, a radiális glia sejtekre jellemző morfológiát mutattak.

### **Egy sejt eredetű klónok előállítás**

4 átültetést követően a sejteket tripszinnel (0.05% tripszin, 1mM EDTA PBS-ben oldva, 1 perc szobahőmérsékleten) felemésztettük és kihígítottuk úgy, hogy az egyedi sejtek egymástól nagy távolságra kerüljenek az átültetést követően az AK-ciklo[RGDfC]-vel borított aljzaton, 90mm-es vagy a 60 mm-es Petri csészékben. 4-6 órával később, a letapadt egyedi sejteket klónozó gyűrűvel izoláltuk. Miután az egyes klónozó gyűrűkben kifejlődtek a kolóniák egy sejt eredetű klónoknak tekintettük őket.

## **Transzfektálás pTurbo- Cre plazmival**

A B6;129S-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm32(CAG-COP4\*H134R/EYFP)Hze/J</sup> transzgén egérből izolált, *loxpStoploxpChr2(H134)-eYFP* konstrukciót tartalmazó radiális glia-jellegű sejteket 4 lyukú tenyésztőedénybe ültettük ki. Minden lyukba 1µg pTurbo-Cre plazmidot pipettáztunk (csirke-β-actin promotor szabályozta a Cre expresszióját), amelyet Lipofectamin Plus reagens (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific) segítségével transzfektáltunk a sejtek genomjába, a gyártó utasításai szerint. Ettől kezdve a tenyésztő edényekben növekvő transzfektált sejteket a fénytől alumínium fóliával letakarva védtük, valamint a mikroszkópos ellenőrzések során kék szűrőt használtunk.

## **Chr2-eYFP pozitív és negatív radiális glia-jellegű sejtek szétválogatása FACS-szal**

1 héttel a transzfektálás után FACS-szal szétválogattuk a sejteket fluoreszcenciájuk alapján.  $1-1,5 \times 10^6$  sejtől szuszpenziót készítettünk 2ml "sorting buffer"-ben oldva (1 mM EDTA és 0.4% marha szérum albumin PBS-ben).

A FACS berendezéssel (BD FACSAria II, BD Biosciences) ellenőriztük a sejtpreparátum épségét és meghatároztuk az optimális paramétereket az eYFP pozitív és negatív sejtek elválasztására. "Nagy"áramlási sebesség alkalmazásával (körülbelül 65 µl/perc, 10-es áramlási fokozat) az intakt sejtek nagyjából 3% -a mutatott magas fluoreszcenciát, a sejtek 78%-ának esetében viszont egyáltalán nem volt fluoreszcencia mérhető a FITC csatornán. A nagyon fluoreszkáló és a nem fluoreszkáló sejteket elkülönítettük, elválasztva tenyésztettük.

## **Radiális glia- jellegű sejtek differenciálása**

Nagy mennyiségű idegsejt létrehozásához megvontuk az EGF-et a konfluens radiális glia - jellegű sejt kultúrákból. 5-7 nappal az EGF megvonást követően a keletkezett idegsejteket élő sejt kultúrákban, valamint immuncitokémiai festés után vizsgáltuk.

Az asztrogliaivá történő differenciációhoz kiegészítettük a tápoldatot 5% főtális borjúsérummal (Sigma). A GFAP pozitív asztroglia sejtek jelenlétét a főtális borjúsérum hozzáadását követő 3. naptól detektáltuk.

Az oligodendroglia sejtek differenciációját egy 5+4 napos protokoll segítségével indukáltuk. Röviden, az alap RGl tápoldatot FGF2-vel (10ng/ml; Peprotech), PDGF-fel (10ng/ml; Sigma) és forskolinnal (10 µM; Sigma) egészítettük ki, majd 5 napig ilyen körülmények között tenyésztettük a sejteket. Ezután a tápoldatot lecseréltük DMEM/F12 1/1 arányú elegyére kiegészítve 3,3,5- trijodtironinnal (T3; 30 ng/ml; Sigma) és aszkorbinsavval (200 µM; Sigma). A 9. napon az oligodendroglia sejtek jelenlétét immuncitokémiai festéssel bizonyítottuk.

### **RT-PCR analízis**

A sejtek RNS tartamát az Rneasy Mini Kit-tel (Quiagen) izoláltuk a gyártó utasításai alapján. A reverz transzkripciót 1 µg RNS-ből "First strand cDNA synthesis Kit" (Fermentas) használatával végeztük. A PCR reakcióhoz Hotstart Taq (Quiagene) polimerázt alkalmaztunk. A minták cDNS tartalmát a „háztartási” gén hipoxantin guanin foszforibozil transzferáz (hprt) PCR-termékek aránya alapján hígítottuk azonos szintre. A polimeráz lánc-reakció (PCR) paramétereit minden primer-pár esetén optimalizáltuk. A reverz transzkripcióhoz és a PCR reakcióhoz a Techne TC-512 készülékét használtuk. A PCR reakciók termékeit 0,5 % Etidium Bromid (Promega) jelenlétében 1%-os agaróz (Promega) gélen futattuk, és UV-átvilágítással tettük láthatóvá, majd CCD kamerával fényképeztük.

### **Immuncitokémiai festés**

A tenyészeteket PBS-ben oldott 4%-os PFA-oldattal szobahőmérsékleten fixáltuk 20 percig. A sejtek permeabilizálásához 10 percig 0,1 % Triton- X 100 (Promega) oldatot használtunk. Az aspecifikus ellenanyag kötő helyeket 2% BSA oldattal (Sigma) 1 óráig szobahőmérsékleten blokkoltuk. A tenyészeteket egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk blokkoló oldatban hígított első réteg ellenanyaggal. A második illetve, biotinos erősítés esetén, a harmadik réteg ellenanyagokat 1-1 órán keresztül szobahőmérsékleten alkalmaztuk. DAB-el (3,3'-Diaminobenzidin) való előhívás esetén a biotinilált második réteg ellenanyag után, PBS-ben oldott ABC reagensekkel (Vector) inkubáltuk a tenyészeteket 45 percig. A peroxidáz reakciót PBS-ben oldott 0.55 mg/ml koncentrációjú DAB (Sigma) és 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) oldatban 5-25 perces szobahőmérsékleten való inkubálással hívtuk elő. A reakciót 0.1%-os Na-azid-ot (Sigma) tartalmazó PBS mosással állítottuk le. Kettős DAB-es festés során az első immunreakció előhívását 0,1 M Ni<sup>2+</sup> -t is tartalmazó oldatban végeztük, amelynek eredményeként a reakció terméke fekete színű csapadék volt. A második immunreakciót a korábban leírtakkal azonos módon végeztük el.

A festett tenyészeteket fluoreszcens festés esetén biszbenzimid (Hoechst 33342 [Sigma]) magfestéket tartalmazó Mowiol-lal (Sigma) fedtük le. A Ni-DAB csapadékot is tartalmazó festéseket, a metszet felszálló alkoholsorral való víztelenítése után, Depex-szel (Serva) fedtük le. A mikroszkópos felvételeket Zeiss Axiovert 200M mikroszkóppal készítettük.

### **Kromoszóma számolás**

A sejtosztódást és a metafázisos kromoszómák blokkolását 0.2 µg/ml colchicinnel (Sigma) végeztük 2 órán keresztül. Majd a sejteket tripszinnel felemésztettük és alap RGI médiummal

lemostuk az aljzatról. A szuszpendált sejteket 0.56%-os KCl oldattal és desztillált vízzel hipotonizáltuk 10-10 percig. A hipotonizált sejteket metanol/ecetsav 3:1 arányú keverékével jégen fixáltuk 20 percig. A fixált sejteket nagyjából 50cm magasságról zsírtalanított tárgylemezre cseppentettük, majd az így szétesett sejtekből láthatóvá vált metafázisos kromoszómákat fázis kontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk, számoltuk.

### **Elektrofiziológiai mérések, patch clamp:**

A radialis gliasejtek ionáramait whole cell patch-clamp technikával analizáltuk. Az extracellularis oldat összetétele mM-ban: 145 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 D-Glucose, 10 HEPES; pH=7.4, osmolaritas 300 mmol/kg. A puffert 95% O<sub>2</sub> es 5% CO<sub>2</sub> keverékével folyamatosan oxigenáltattuk. Az elvezető boroszilikát üvegapillárisok ellenállása 4-8 MOhm közé esett. Az intracelluláris oldat összetétele 130 mM KCl, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES; pH = 7.2. A radiális gliasejtek in vitro indukált neurogenezise során jelentkező ionáramok feltérképezéséhez az ún. feszültséglépés (voltage step) protokollt használtuk. A KDR áramok amplitudóját +40 mV-on mértük 40 ms-nál. A Na áramok amplitudójánál a "peak" értéket vettük figyelembe.

A ChR2 indukálta áramjelek elvezetéséhez a sejteket "voltage clamp" módban mérve -65 mV-on tartottuk és 50 ms lézer pulzusokkal stimuláltuk (488±20 nm).

### **ChR2-eYFP fúziós fehérje expressziójának mikroszkópos meghatározása**

Az AxioVision 4.8 (Zeiss) program alkalmazásával körberajzoltuk a sejteket és meghatároztuk a körberajzolt foltok területét és fluoreszcencia intenzitását. A fluoreszcencia intenzitás értékei 1 μm<sup>2</sup> sejterületre vonatkoztak az indukálatlan és az indukált sejtek esetében is.

### **Videomikroszkópia**

A mikroszkóppal történő videofelvételek során az E17,5 ChR2<sup>+</sup> és ChR2<sup>-</sup> indukálatlan radiális glia-jellegű sejteket és a neuronális irányba differenciálódó indukált sejteket állandó 37 °C-os hőmérsékleten, 5% CO<sub>2</sub>-ot és 95% levegőt tartalmazó mobil mini-inkubátorban tároltuk, amelyet a mikroszkóp tárgyasztalához rögzítettünk. A videofelvételeket Zeiss Axiovert 200M invert fluoreszcens mikroszkóppal készítettük.

A fényvel való stimulálásra és a fluoreszcens felvételek készítésére epifluoreszcens filtert használtuk (excitáció: λ: 470 ± 40 nm, emisszió: λ: 525 ± 50 nm). A sejteket minden 5. percben 300ms hosszan stimuláltuk 0.13 mW/ mm<sup>2</sup> intenzitású fluoreszcens fényvel 12 órán keresztül. Fázis-kontraszt és epifluoreszcens felvételeket készítettünk 10X-es objektívvel minden megvilágítási periódus végén.

## **A sejtmozgás analízise**

A videófelvételek képeit megnyitottuk a WTrack programmal és minden kezdő képen kiválasztottunk 20 sejtet, amelynek a mozgását nyomon követtük.

A kiválasztott sejtek mozgását úgy követtük, hogy a sejt közepére kattintottunk, ennek koordinátáit a WTrack program képről képre regisztrálta. A valós elmozdulást a nagyítás és a képfelbontás alapján határoztuk meg: 1 pixel 0,645 mikrométernek felel meg. A korrigált sejt koordinátákat használva meghatároztuk a sejt középpontok két felvétel közti távolságát a két dimenziós euklideszi távolság alapján  $d(p_i, p_{i+1}) = \sqrt{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2} * 0.645$ . Az így kapott adatok az elmozdulást  $\mu\text{m}/5$  min-ben mutatták. Összegezve a képről képre történő elmozdulást  $d_{\text{total}} = \sum_{i=1}^{N-1} \sqrt{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2} * 0.645$  meghatároztuk a teljes távolságát a sejtmozgásnak 12 óra alatt minden egyes nyomon követett sejt esetében.

## **Statisztikai analízis**

A statisztikai elemzéseket R statisztikai programozással végeztük. A grafikonokat ggplot2 csomaggal ábráztuk. Minden esetben  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) és  $p < 0,001$  (\*\*\*) tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A sejtek által 12 óra alatt megtett teljes távolságot 3 kategóriába soroltuk. Az adatokat ábráztuk, és a statisztikai szignifikanciát Pearson Chi-squared teszttel határoztuk meg minden egyes eseménytáblázatban, majd páros összehasonlításokat végeztünk post hoc Fisher teszttel, ahol a p-értékeket Bonferroni módszerrel állítottuk be. A megvilágítással kapcsolatos elektrofiziológiai válaszokat és a teljes távolsági adatokat boxplotként ábráztuk, és a szignifikanciákat Wilcoxon-Mann-Whitney teszttel határoztuk meg. Az 5 napos indukált ChR2 + és ChR2- sejtek 12 órás megvilágítással vagy anélkül elért távolság eloszlásának szignifikanciáját Kruskal-Wallis rangsor-teszt és Dunn-teszt alapján határoztuk meg.

## **Eredmények**

### **Különböző életkorokból és agyi régiókból nyert radiális glia-jellegű idegi őssejtek**

#### **Radiális glia-jellegű idegi őssejtek izolálása embrionális előagyból**

A hGFAP-GFP konstrukciót hordozó 14 napos egér embriók (E14) előagyából készítettünk sejtenyészeteket. A primer sejt kultúrákban a sejtek 2-3 nappal az agyszövetből való kiültetés után aggregátumokba rendeződtek. A 4. naptól kezdve egy intenzíven osztódó sejt populáció kezdte benőni az aggregátumok közti, AK-cyclo(RGDfC)-vel borított aljzato. Szérummentes médiumban (DMEM-F12-B27), egyetlen hozzáadott növekedési faktor (EGF) jelenlétében a



sejtek stabilan az aljzathoz tapadtak és folyamatosan osztódtak. Azzal, hogy a sejtek szérum eredetű növekedési faktor hiányában is stabilan az AK-cyclo(RGDfC)-vel bevont aljzathoz tapadtak lehetővé vált egy adhézió alapú sejtszelekciós eljárás kidolgozása és a sejtek definiált (szérummentes) tenyésztése és vizsgálata.

A gyorsan növekvő aljzathoz tapadó sejtek többsége kifejezte a GFP fehérjét, jelezve, hogy az AK-cyclo (RGDfC) peptiden letapadó sejtek egy elkötelezetlen, idegi sejtfeleséget képviselnek.

Az elkötelezetlen sejtpopuláció további jellemzésére, valamint a tervezett implantációs kísérleteket szem előtt tartva vad típusú CD1-es egér embriók (E14) előagyából és GFP-t minden sejtjében expresszáló transzgen egértörzs embrióinak (E14,5) ventrális és dorzális előagyi területeiről is izoláltunk sejteket a fenti módszerrel.

A látszólag homogén sejtpopulációkat immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk. A sejtek nagy része a radiális glia típusú őssejtekre jellemző együttes nesztin és RC2 pozitivitást mutatott. A tenyészetek összetétele morfológiailag is teljesen homogénné vált, az összes sejt a radiális glia sejtekre *in vitro* jellemző elnyújtott morfológiát mutatta. Az adherens, monolayer-be rendeződött sejtek között spontán differenciáció nem volt megfigyelhető.

Az immunhisztokémiai módszerrel radiális glia- jellegű sejteknek látszó populációkból egy sejt eredetű klónokat hoztunk létre. Az egy sejt eredetű klónok immunhisztokémiai és mRNS profiljuk alapján is radiális glia sejtekre jellemző tulajdonságokat mutattak.

Sokszoros *in vitro* passzálás után a régióspecifikus génexpresszió csak részben tükrözte a radiális glia sejtek eredetét. Az *in vivo* eredetre egyedül a Ngn2 expressziója utalt, amely csak a dorzális előagyi eredetű klónokban expresszálódott. A többi régióspecifikus gén (pl.:Emx2, Dlx2 gén) az összes klónban kifejeződött, függetlenül azok eredetétől.

### **Radiális glia-jellegű idegi őssejtek izolálása felnőtt agyból**

Felnőtt egeragy (P62) neurogén (előagyi szubventrikuláris zóna-SVZ, hippocampus- HC) és nem neurogén (előagykéreg- CTX, középagy- MES) zónáiból szintén primer sejttenyészeteket állítottunk elő. Az AK-cyclo(RGDfC)-vel borított tenyésztő felületekre kezdetben csak a kiültetett sejtek töredéke volt képes letapadni (<1%). Azonban ez a néhány letapadt sejt 1-2 nap elteltével képes volt osztódni és kis kolóniákat hozott létre. A sejtek folyamatosan osztódtak és 10 napon belül összefüggő monolayert alkottak a szérummentes médiumban (DMEM-F12-B27), EGF jelenlétében, AK-cyclo(RGDfC)-vel borított aljzaton. A stabilan osztódó, radiális glia- jellegű tenyészetekből egy sejt eredetű klónokat állítottunk elő.

Az egy sejt eredetű klónok immunhisztokémiai és mRNS profiljuk alapján is radiális glia sejtekre jellemző tulajdonságokat mutattak. A vizsgált régióspecifikus gének közül a *dlx2*, *emx2*, *pax6*, *gbx2* és a proneurális gének közül a *ngn2* és *mash1* az összes klónban kifejeződtek, annak ellenére, hogy ezek expressziója a felnőtt agyban nem teljesen átfedő. A rhombencephalikus régiót jelző *hox2b* gén egyik klónban sem expresszáldott. Ahogyan meglepő módon az SVZ-re jellemző *nkx2.1* expresszióját sem tudtuk kimutatni. A *math2* gén ugyanakkor, a középagyi eredetű sejtektől eltekintve, egyetlen klón sejtjeiben sem íródott át; azaz, a radiális glia-jellegű sejtek többsége nem hordoz közvetlen idegsejt-alakulásra jellemző sajátosságokat.

### **Radiális glia-jellegű sejtek differenciációja különböző idegi sejttypusokká**

Különböző differenciáltatási eljárások segítségével mind a három fő idegszöveti sejttypus kialakult a radiális glia-jellegű sejtek tenyésztéseiben.

### **Asztroglia sejtek alakulása**

Radiális glia-jellegű sejtek szemi-konfluens tenyésztéséhez 10% szérum hozzáadásával 4 nap alatt GFAP pozitív, ellaposodott asztroglia sejteket hoztunk létre. A morfológiailag homogénnek látszó monolayer alkotó sejtek között – immuncitokémiai módszerekkel – sem idegsejteket, sem oligodendroglia sejteket nem tudtunk azonosítani.

### **Oligodendroglia sejtek képződése**

Egy 2 lépéses protokoll segítségével az összes klónból differenciálódtak O4 pozitív korai oligodendroglia sejtek. Ezeknek a sejteknek a mennyisége azonban eltérő volt az egyes klónokban. A dorzális és a ventrális eredetű embrionális tenyésztetekben a sejtek 6-12%-a alakult át oligodendroglivá. A ventrális eredetű klónból kétszer annyi oligodendroglia sejt keletkezett, mint a dorzális eredetű klónból. A felnőtt klónok közül az agykéregből származó klón oligodendroglia képzése kimagasló volt (23%). Szintén nagy százalékban voltak az O4 pozitív sejtek a felnőtt hippocampusból származó tenyésztetekben (16%). A felnőtt SVZ-ből és középagyból származó tenyésztetekben, ugyanakkor nagyon alacsony (1-2%) volt a keletkezett oligodendroglia sejtek mennyisége.

### **Idegsejtek képződése**

Mind a felnőtt, mind az embrionális agyból izolált klónok képesek voltak idegsejteket létrehozni. Az EGF-megvonás után 5-7 nappal bipoláris, nyúlványos sejtek jelentek meg egy ellaposodott aljzatsejtréteg tetején. Az idegsejt morfológiájú sejtek neuron-specifikus  $\beta$ III tubulin pozitivitást mutattak. Alakjuk, nyúlvány-hosszuk és elágazódásaik jelentős különbségeket mutattak a radiális glia-jellegű sejtek eredetétől függően. A legfejlettebb

idegsejt- alakkal, hosszú, elágazó nyúlványrendszerrel rendelkező sejtek a felnőtt középagyban eredetű klónból differenciálódtak. Az előagykéregből és a szubventrikuláris zónából származó radiális glia- jellegű sejtekből a vizsgálat 8 napja alatt bipoláris alakjukat megtartó, látszólag fejletlen idegsejt-formák fejlődtek.

Viszonylag nagy mennyiségű idegsejt (~20%) differenciálódott az összes embrionális klónból, és a felnőtt klónok közül az előagyi szubventrikuláris zónából (~15%), hippocampusból (~15%), illetve a középagy területéről (~20%) izolált klónokból. A felnőtt agykéregből izolált klón tenyésztésében ugyanolyan indukciós eljárással szignifikánsan kevesebb idegsejt (~5%) képződött.

### **A különböző eredetű radiális glia-jellegű sejtekből *in vitro* alakuló idegsejtek neurotranszmitter fenotípusa**

Az RT-PCR vizsgálatok azt mutatták, hogy a GABA-kibocsátásra jellemző vezikuláris GABA transzportert (vGAT) kódoló gén minden radiális glia- jellegű sejtben kifejeződik, függetlenül a származás helyétől és idejétől. Más neurotranszmisszióra jellemző gének expressziója jelentősen függött a radiális glia-jellegű sejt eredetétől és a forrás agyszövet korától. Az embrionális eredetű radiális glia- jellegű klónban a *vgat* gén mellett expresszáldtak a glutamát vezikuláris transzporterét kódoló *vglut1*, *vglut2*, valamint a katekolamin anyagcsere tirozinhidroxiláz (TH) enzimét kódoló gén is. Az embrionális RGI eredetű idegsejtekben a megfelelő fehérjék expresszióját is kimutattuk. A felnőtt eredetű radiális glia-jellegű sejtekből fejlődő neuronokban az 1-es típusú glutamát transzporter (vGLUT1) kizárólag a hipokampális klónban expresszáldott. A tirozin-hidroxiláz (TH) a felnőtt agyi szubventrikuláris zónából izolált klónokban kifejeződött. A TH fehérje jelenlétét immuncitokémiai módszerrel is sikerült igazolni. Noradrenerg, szerotonerg és kolinerg idegsejtekre jellemző gének expressziója nem volt megfigyelhető a klónokban.

### **Az ionháztartást befolyásoló ingerek hatása a radiális glia- jellegű sejtek vándorlására és idegsejt irányú fejlődésére**

#### **Channelrhodopsint expresszáló radiális glia-jellegű sejtek izolálása embrionális egeragyból**

*LoxpStoploxpChR2(H134)-eYFP* konstrukciót tartalmazó B6 egér embriók (E17,5) előagyából primer sejttenyészeteket készítettünk. A ChR2(H134)-eYFP fúziós fehérjét a CAG promotor hajtja meg, így az a szervezet minden sejtjében stabilan expresszáldik. Hasonlóan a korábban leírt embrionális agyból származó sejt kultúrákhoz a sejtek az AK- cyclo(RGDfC)-

vel borított aljzaton, szérummentes tápoldatban kezdetben aggregátumokba tömörültek, majd benőtték az aljzatot. Miután a sejtek néhány átültetést követően homogén és konfluens tenyészeteket alkottak pTurbo- Cre plazmival indukáltuk a channelrhodopsin csatorna expresszióját. 1 hét elteltével nagyjából a sejtek 5%-a eYFP fluoreszcenciát mutatott. Az eYFP-t expresszáló tehát channelrhodopsin-t tartalmazó sejteket, valamint az eYFP-t nem expresszáló sejteket FACS segítségével elkülönítettük egymástól, és innentől kezdve egymástól elkülönítve tenyésztettük tovább. A vizsgálatok során a ChR2+ és a ChR2- sejteket tartalmazó tenyészetek között sem morfológiai, sem immuncitokémiai különbséget nem találtunk. A radiális glia markerek immuncitokémiai eljárással kimutathatók voltak a ChR2+ és ChR2- sejtekben is.

### **Channelrhodopsin2+ radiális glia-jellegű sejtek idegsejt képzése**

Ha a tenyészetektől konfluens állapotban megvontuk az EGF-et, akkor az 5. napon az eYFP pozitív (ChR2+) és eYFP negatív (ChR2-) sejtek között is megjelentek a nyúlványos,  $\beta$ III tubulint hordozó neuronok. A további vizsgálatok értelmezése miatt azt is meg kellett vizsgálnunk, hogy a ChR expresszió mértéke változik-e az idegsejtté differenciálódó sejtekben. Azonos nagyítás mellett fluoreszcens felvételeket készítettünk ChR2+ indukálatlan és idegsejt irányban differenciáltatott radiális glia-jellegű tenyészetekről. Axiovision programmal megmértük az egyes sejtek területét és a sejterület fluoreszcencia-intenzitását. Meghatároztuk 20-20 indukálatlan radiális glia- jellegű sejt, illetve radiális glia-eredetű idegsejt fajlagos fluoreszcencia intenzitásának átlagát és szórását. Az adatok szerint, a fajlagos fluoreszcencia intenzitás az idegsejtté fejlődés során szignifikánsan nem változik.

### **Channelrhodopsint expresszáló sejtek fényingerre adott válasza**

Patch clamp mérésekkel igazoltuk, hogy a kék fény ( $\lambda$ : 488 nm) kation áramokat indukál a channelrhodopsin-t expresszáló sejtekben. A channelrhodopsin-t nem expresszáló sejtekben fényre aktiválódó kationáramok nem jelentek meg. Az adatok szerint, a fényintenziás növelésével nőtt a kationáram amplitúdója, 0,5 mW/mm<sup>2</sup> intenzitás felett biológiailag releváns válasznövekedést már nem detektáltunk.

### **Az indukált kationáramlás hatása a radiális glia-jellegű sejtek mozgására**

Különböző intenzitású, 300 ms hosszúságú megvilágítást különböző időtartamon át 5 percenként ismételve azt találtuk, hogy a ChR2+ sejtek 400 perc után már károsodnak, és 12 óra alatt elpusztulnak, ha megvilágító fény intenzitása nagyobb, mint 0,25mW/mm<sup>2</sup>. A fényérzékenység vizsgálatok adatai alapján, a motilitás vizsgálatokhoz 0.13 mW/mm<sup>2</sup> teljesítményű, egyenként 300 ms időtartamú fényimpulzusokat alkalmaztunk 5 percenként

ismételve, 12 órán át. Minden egyes fényimpulzus után a sejtekről fázis-kontraszt felvétel készült. Azonos megvilágítás-sorozatok mellett vizsgáltuk ChR2<sup>+</sup> és ChR<sup>-</sup> sejtek elmozdulását indukátlan radiális glia-jellegű állapotban, illetve az idegsejt differenciálódás indukációjának 1. és 5. napján.

### **A sejtmozgás adatainak elemzése**

A látható fényben készült képsorozatokon az egyes sejtek középpontjának elmozdulását követtük nyomon a WTrack szoftver segítségével. Meghatároztuk minden egyes képen a sejt középpontok x,y koordinátáit, amelyeket egy látszólag mozdulatlan referenciapont hasonló koordinátaival korrigáltunk. Az egyes sejtek helykoordinátáinak időbeli változását követve ábrázoltuk az adott sejt mozgásának útvonalát, trajektogramját. A trajektoria görbékről szemmel leolvasható volt, hogy a sejtek által „bejárt” útvonal az idegsejtté alakulás időszakában jelentősen csökken. Ez a mozgás-redukció az idegsejt-indukció 5. napján a ChR2<sup>+</sup> sejtek esetén kifejezettebb volt, mint ChR2<sup>-</sup> sejteknél.

A megfigyelt sejtmozgásokat részletesebb adat- és eloszlás-vizsgálatokkal elemeztük tovább. Ismerve az egyes sejtek középpontjának 12 óra alatt történt elmozdulását, meghatároztuk a 200 µm-nél kisebb elmozdulást mutató – „nem vándorló” - , a 200 és 400 µm között vándorló és a 400 µm-nél nagyobb távot bejáró – „nagy migrációs aktivitású” – sejtek számát a különböző sejtpopulációkban, az in vitro sejtfejlődés különböző stádiumaiban. A migráció-elemzés azt mutatta, hogy indukátlan radiális glia-jellegű sejtek tenyészetekben gyakorlatilag nincs „álló” sejt: az indukátlan radiális glia-jellegű sejtek migráló sejtek, függetlenül az indukált kationáramok jelenlététől. Az indukció 1. napján a ChR2<sup>+</sup> sejtek migrációs aktivitása megnőtt az indukátlan sejtek aktivitásához képest, míg a ChR2<sup>-</sup> sejtek migrációs aktivitása csökkent. Az indukció 5. napján a ChR2<sup>+</sup> és ChR2<sup>-</sup> sejtek motilitása is jelentősen lecsökkent az indukátlan sejtek migrációs aktivitásához viszonyítva. A ChR2<sup>+</sup> sejtek az idegsejtté történő differenciálódás 5. napján szignifikánsan kisebb migrációs aktivitást mutattak, mint a ChR2<sup>-</sup> sejtek. Azoknak a sejteknek a száma, amelyek 12 óra alatt nagyobb távolságra migráltak, mint 400µm jelentősen csökkent az idegsejtté való differenciáció 5. napján. Ezek után meghatároztuk a sejtek teljes elmozdulásának hosszát, és szintén azt láttuk, hogy az átlagos úthossz csökkent az idegsejtté való differenciáció előrehaladtával mind a channelrhodopsin-t expresszáló, mind a channelrhodopsin-t nem expresszáló tenyészetek esetében. Az indukciót követő 5.napon ugyanakkor, a channelrhodopsin-t expresszáló sejtek migrációs úthossza nagy mértékben csökkent a channelrhodopsin-t nem expresszáló (kontrol) sejtekhez képest is. Hogy kizárjuk a genomba

beillesztett ChR2-eYFP konstrukció hatását a motilitásra, olyan kísérletsorozatot végeztünk, amelyben a ChR2-t expresszáló (ChR2+) sejtek mozgásait célzott megvilágítás nélkül elemeztük. A ChR2+, 5 napon át indukált sejtek migrációs aktivitása közvetlen megvilágítás nélkül is csökkent a ChR2- sejtekhez képest. A kék fényel történő megvilágítás azonban szignifikánsan fokozta az aktivitás csökkenést.

## **Következtetések**

Laboratóriumunkban egy szintetikus peptid-konjugátum segítségével (AK-cyclo(RGDfC)) sikerült megbízható izolálási módszert kidolgoznunk és definiált, szérum-mentes tenyésztési körülményeket kialakítanunk az idegi ősz/progenitor sejtek klónozására. Létrehoztunk egy olyan in vitro rendszert, amelyben a radiális glia-jellegű sejtek stabilan expresszálják a channelrhodopszin fényérzékeny ioncsatornát, így a csatorna nyitásával létrejövő ion-eltolódás hatása sejt kultúrában, definiált körülmények között vizsgálható.

Doktori munkám eredményei alapján a következő megállapítások tehetők:

- Létezik olyan módszer, amellyel embrionális és a felnőtt agyból is nagy hatékonysággal izolálhatók idegi őssejtek.
- Megfelelő tenyésztési eljárásokkal az embrionális és felnőtt agyból izolált idegi őssejtek is fenntarthatók in vitro; klónozott populációik hosszú távon, stabilan tenyészthetők definiált körülmények között.
- A különböző korú egeragyból eltérő agyterületekről származó radiális glia-jellegű idegi őssejtekben többféle, in vivo együtt nem expresszálódó régióspecifikus génnek fejeződnek ki.
- Az in vivo regionális jellemzők közül in vitro is fennmarad a proneurális *ngn2* gén dorzális embrionális eredetre utaló meghatározottsága
- A radiális glia-jellegű sejtek differenciációs képessége függ attól, hogy a sejtek milyen agyterületről és milyen korú agyszövetből származnak.
- Channelrhodopszin2(H134) fényérzékeny ioncsatornát stabilan expresszáló radiális glia-jellegű sejtek migrációs aktivitását a kationcsatorna nyitása az őssejt-állapotban nem befolyásolja, a vándorló progenitor-állapotban jelentősen fokozza, míg az idegsejt-előalakokban szignifikánsan csökkenti.
- Az ionos stimulálás a sejtek sajátosságait a fejlődési állapottól függő módon befolyásolja; idegsejt-előalakokban nagy valószínűséggel az érettebb idegsejt fenotípus megjelenését segíti.

## **Publikációs jegyzék:**

### **A Doktori disszertáció alapját képező publikációk:**

**Kohidi T**, Jady AG, Marka K, Papp N, Andrási T, Kornyei Z, Madarasz E

Differentiation-Dependent Motility-Responses of Developing Neural Progenitors to Optogenetic Stimulation.

FRONTIERS IN CELLULAR NEUROSCIENCE 11: 401, 12 p. (2017)

Marko K, **Kóhidi T**, Hadinger N, Jelítai M, Mezo G, Madarasz E

Isolation of radial glia-like neural stem cells from fetal and adult mouse forebrain via selective adhesion to a novel adhesive peptide-conjugate..

PLOS ONE 6 : 12 p. e28538 , 12 p. (2011)

### **Egyéb publikációk:**

Berces Zs, Pomothy J, Horvath AC, **Kóhidi T**, Benyei É, Fekete Z, Madarasz E, Pongracz A  
Effect of nanostructures on anchoring stem cell-derived neural tissue to artificial surfaces.

JOURNAL OF NEURAL ENGINEERING 15 : (5) 056030 10p. (2018)

Jady AG, Nagy AM, **Kohidi T**, Ferenczi S, Tretter L, Madarasz E

Differentiation-Dependent Energy Production and Metabolite Utilization: A Comparative Study on Neural Stem Cells, Neurons, and Astrocytes.

STEM CELLS AND DEVELOPMENT 25 : 13 pp. 995-1005. , 11 p. (2016)

Orsolits B, Borsy A, Madarasz E, Meszaros Z, **Kohidi T**, Marko K, Jelítai M, Welker E, Kornyei Z.

Retinoid machinery in distinct neural stem cell populations with different retinoid responsiveness.

STEM CELLS AND DEVELOPMENT 22 : 20 pp. 2777-2793. (2013)

Zadori A, Agoston VA, Demeter K, Hadinger N, Varady L, **Kohidi T**, Gobl A, Nagy Z, Madarasz E

Survival and differentiation of neuroectodermal cells with stem cell properties at different oxygen levels.

EXPERIMENTAL NEUROLOGY 227 : 1 pp. 136-148. (2011)

## **Köszönetnyilvánítás:**

Mindenekelőtt, szeretnék köszönetet mondani Dr. Madarász Emiliának, aki biztosította a doktori munkám végzéséhez és a disszertáció megírásához szükséges feltételeket, és aki szakdolgozó korom óta egyengette tudományos pályafutásomat.

Külön köszönöm Dr. Markó Károlynak a szakdolgozó éveimben való témavezetést, valamint, hogy a disszertáció anyagát képező témákon szorosan együttműködve dolgozhattunk. Ez idő alatt megtanulhattam tőle a sejtenyésztés és a tudományos gondolkozás alapjait.

Köszönettel tartozom Dr. Hádinger Nórának a biopsziás tüvel való sejtizolálás során, Dr. Jelitai Mártának és Dr. András Tibornak az elektrofiziológiai mérések során, és Dr. Jády Attilának a migrációs vizsgálatok statisztikai elemzése és az ábrák elkészítése során nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Hádinger Nórának és Dr. Demeter Kornélnak, hogy szakdolgozó éveimben számos módszerre megtanítottak. Köszönöm Dr. Környei Zsuzsannának és Dr. Kenesei Katának, hogy bármikor számíthattam rájuk, ha a mikroszkópos vizsgálatokban segísre volt szükségem.

Köszönöm Barabás Kornéliának, Gaál Katalinnak és Nyámándi Piroskának kísérletes munkámban nyújtott segítségüket.

Köszönöm az MTA-KOKI Idegi Sejt- és Fejlődésbiológia Laboratórium minden jelenlegi és volt munkatársának segítőkészségét, hogy volt kivel megvitatom az aktuális tudományos kérdéseket és a munkát kísérő jó hangulatot:

Barabás Kornélia, Demeter Kornél, Fekete Rebeka, Gaál Katalin, Hádinger Nóra, Jády Attila, Jelitai Márta, Kenesei Kata, Környei Zsuzsanna, Madarász Emília, Markó Károly, Mészáros Zsófia, Murali Kumarasami, Neubrandt Máté, Nyámándi Piroska, Papp Noémi, Székács Inna, Szelényi Judit, Orsolits Barbara, Van Weert Szuzan, Varga Balázs, Vőfély Gergő, Zádori Anita

Köszönöm az együttműködést a kollaborációs partnereinknek:

Dr. Gereben Balázs, Juhász Andrea (MTA-KOKI, Molekuláris Sejt Metabolizmus)

Dr. Varga Viktor (MTA-KOKI, In vivo fiziológiai laboratórium)

Dr. Mező Gábor (ELTE, Peptidkémiai kutatócsoport)

Köszönöm Ferenczi Szilamérnek, hogy elvállalta Doktori disszertációm intézeti bírálatát. Köszönöm értékes megjegyzéseit.

Köszönöm az MTA-KOKI vezetőségének és munkatársainak, hogy munkámat színvonalas tudományos közegben végezhettem.

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.