

Az idegi sokféleség kialakulását szabályozó folyamatok vizsgálata klonális eredetű őssejt populációk *in vitro* differenciációja során

Doktori tézisek

Hádinger Nóra

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Madarász Emília, az MTA Doktora
MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet,
Idegi Sejt- és Feljődésbiológia Laboratórium

Hivatalos bírálók: Dr. Krizbai István, PhD
Dr. Nagy Nándor, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Csillag András, az MTA Doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Katona István, az MTA Doktora
Dr. Tárnok Krisztián, PhD

Budapest
2011

BEVEZETÉS

Az összetett felépítésű, számos ideg- és glia sejt típus tartalmazó, emlős idegrendszer egy kezdetben egy sejtrétegű, morfológiailag hasonló neuroepitéliális sejtekből álló idegrendszer kezdeményből alakul ki.

Ahhoz, hogy a bonyolult idegi struktúra kialakulhasson, az idegrendszer fejlődése során az idegi progenitorok térben és időben szigorúan szabályozott „működésére” van szükség. Az idegrendszer fejlődése során, az idegrendszer kezdeményt kezdetben felépítő neuroepitéliális őssejt populáció, a sejtek környezetéből származó szignálok, és a szignalizációs útvonalakkal szorosán összekapcsolódó belső fejlődési programok következtében sorozatos elköteleződési lépéseken megy keresztül. Ezeknek a lépéseknek az eredményeképpen, az idegi progenitorok az idegrendszeri tengelyek mentén való elhelyezkedésüknek, és a fejlődési stádiumnak megfelelően különböző ideg- és makroglia sejt típus létrehozására képesek.

Az *in vivo* fejlődési folyamatok megértéséhez és a sejtpusztulással járó idegrendszeri betegségek gyógyítását célzó terápiák kidolgozásához egyaránt fontos megismernünk, melyek azok a folyamatok, melyek a kiinduláskor homogén őssejt populációkból az *in vitro* idegi differenciáció során többféle idegi sejtípust tartalmazó tenyészetek kialakulását eredményezik, illetve azt, hogy a kialakuló sejtípusok aránya hogyan tolható el a kívánt irányba.

Doktori munkám során, olyan egy sejt-eredetű, őssejt populációk retinsavval (RA) indukált *in vitro* idegi fejlődését vizsgáltam, melyek korai – a tömeges ideg- és gliasejt képzést megelőző- idegi fejlődési stádiumból származnak (NE-4C idegi őssejtek), illetve melyek indukálatlan állapotban, idegi irányban még elkötelezetlenek (R1 embrionális őssejtek illetve P19 embrionális karcinóma sejtek).

Az *in vitro* idegi differenciáció során vizsgáltam bizonyos, úgynevezett „régió specifikus” transzkripciós faktorok kifejeződését. Ezek a transzkripciós faktorok, *in vivo* az egészen korai fejlődési stádiumoktól kezdve szabályozzák a különböző idegrendszeri területek regionális sajátosságainak kialakulását, mely sajátosságok többek között az adott területen kialakuló idegsejtek fenotípusát is meghatározzák. Ezzel párhuzamosan, vizsgáltam az *in vitro* differenciáció során kialakuló idegsejtek fenotípusát.

Kísérleteim második felében az *in vitro* idegsejt képzés indukálására általánosan használt *all-transz* retinsav (RA) asztroglia képzésre gyakorolt hatását vizsgáltam.

CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során a következő kérdésekre kerestem a választ:

- Az *in vitro* fenntartott idegi őssejtek az *in vivo* fennálló környezeti hatások, és struktúra hiányában kifejeznek-e régió specifikus (az egyes agyi régiókra jellemző, és az őssejtek/progenitor sejtek pozicionális meghatározottságát kialakító) transzkripciós faktorokat?
- Az *in vitro* idegi fejlődés során hogyan alakul a régió specifikus transzkripciós faktorok expressziója?
- Milyen neurotranszmitter fenotípussal rendelkeznek az *in vitro* idegi fejlődés során kialakuló idegsejtek?
- Hogyan befolyásolja az idegi őssejt fenotípust és az idegsejt-fejlődést egy régió specifikus transzkripciós faktor – az *Emx2* – folyamatos expresszáltatása?
- Miért késik az asztroglia fenotípus kialakulása az idegsejtek megjelenéséhez képest?
- Hogyan befolyásolja az *in vitro* idegi differenciáltatásra általánosan használt *all-transz* retinsav az asztroglia képzés folyamatát?

MÓDSZEREK

A kísérletek során vizsgált sejtvonalak

A kísérletek nagy részét az NE-4C idegi őssejt vonalon, illetve ennek genetikailag módosított al-vonalain végeztük. Az NE-4C sejtvonalt 9,5 napos, p53 deficiens egér embrió prosencephalikus és mesencephalikus agyhólyagjaiból származik, előállítását többszöri klónozással történt, így biztosítva a sejtvonalt egy-sejt eredetét. Kísérleteink egy részét megismételtük a P19 karcinóma és az R1 embrionális őssejt vonalakon.

- Az NE-4C és P19 sejtek differenciáltatása: A differenciáció megindításához a sejteket 10^{-6} M RA-val (Sigma) kezeltük 48 órán át vagy a kísérletben megadott időtartamig. Az NE-4C sejteket bizonyos kísérletekben RA-nélkül indukáltuk. Ez esetben az 5% FCS-t (fetal calf serum –fötális borjúsavó-, [Gibco]) vagy az FGF2 (10 ng/ml) és EGF (20 ng/ml) növekedési

faktorokat tartalmazó tápoldatokat FCS illetve FGF2- és EGF-mentes, definiált médiumra cseréltük.

- Az R1 sejtek differenciáltatása: Kísérleteinkhez a cDNS-mintákat Dr. Gócza Elentől (Gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont) kaptuk. A differenciáltatásához az embrionális fibroblaszt sejteken (feeder/tápláló sejtek) növény R1 sejteket zselatinnal (Sigma) borított tenyésztő edénybe (Greiner) helyezték, majd 24 óra múlva a sejtek letapadását gátló bakteriológiai tenyésztő edénybe vitték át (ezt vettük a differenciáció kezdetének). A sejtek aggregációjával kialakuló embrió-csomókat RA-val (10^{-6} M) kezelték a differenciáció 4. és 8. napja közötti időszakban. Ezután, az embrió-csomókat zselatinnal borított edényekbe helyezték és további hét napig tenyésztették.

- Genetikailag módosított NE-4C alklónok létrehozása: Az NE-4C sejteket a *GFP*- (módosított pCAGGS vektor; Niwa és mtsai, 1991) illetve *emx2*-vektorokkal (*emx2* ORF-et tartalmazó pLenti6/V5 Directional TOPO plazmid [Invitrogen], Rossella Galli -Stem Cell Research Institute, Milánó, Olaszország- ajándéka) Superfect (Qiagen) reagens segítségével transzfektáltuk. Antibiotikus (Blasticidin [InvivoGen] az *emx2*-, illetve Geneticin [Sigma-Aldrich] a *GFP*-transzfekció esetén) szelekció után a transzgént stabilan hordozó sejtekből egy sejt eredetű klónokat hoztunk létre.

- Primer idegsejt tenyészetek előállítás: A primer idegsejt tenyészeteket embrionális (E13,5) egér előagyból állítottuk elő. Az idegszövet mechanikai disszociálásával keletkező sejtuszpenziót poli-L-lizinnel borított tenyésztőedényekbe helyeztük, 5% FCS-t tartalmazó tápoldatba.

- NE-4C^{GFP}/NE-4C és NE-4C^{GFP}/primer idegsejt kokultúrák készítése: A NE-4C^{GFP} sejteket 10^{-6} M RA-val indukáltuk. A differenciáció 4. napján a sejteket a tenyésztő aljzatról 1 mM EDTA-t tartalmazó PBS-sel felszedtük, majd idegsejtben gazdag (az indukció 10. napján járó), NE-4C tenyészetekre, vagy 13,5 napos embrióból származó primer idegi tenyészetekre helyeztük.

Fehérjék sejt- illetve tenyészet szintű kimutatása

- Immuncitokémiai festés: A tenyészeteket PBS-ben oldott 4%-os PFA-oldattal (TAAB Laboratories) fixáltuk (20 perc), illetve a GABA festés esetén egy glutáraldehides (10 perc) (0,1%) (Sigma) fixálást is alkalmaztunk. A sejten belüli epitópok feltárásához 0,1%-os Triton X-100 (Promega) oldatot használtunk. A BrdU epitópok feltárásához 1N HCl oldattal kezeltük a tenyészeteket 37°C-on 30 percig.

A tenyészeteket 4°C-on egy éjszakán keresztül inkubáltuk az elsődleges ellenanyaggal. Ezután Alexa 350-, Alexa 488-, Alexa 594- (Molecular Probes) vagy biotin-konjugált másodlagos ellenanyagokat alkalmaztunk (Vector). Utóbbi esetben Alexa 488- vagy Alexa 594-konjugált avidint (Molecular Probes) alkalmaztunk harmadik réteggént. A mikroszkópos felvételeket Zeiss Axiovert 200M mikroszkóppal készítettük, majd a képeket Axiovision 4.5 szoftver segítségével elemeztük.

DAB-el (3,3'-Diaminobenzidin) való előhívás esetén a biotinilált második réteg ellenanyag után, ABC reagenssel (Vector) inkubáltuk a tenyészeteket. A peroxidáz reakciót 0.55 mg/ml DAB-t (3-3'-diamino benzidin, [Sigma]) és 0.3% H₂O₂ (Sigma) tartalmazó oldatban hívtuk elő. Kettős festés esetén az első immunreakció előhívását 0,1 M Ni²⁺-t is tartalmazó oldatban végeztük.

- Western blot analízis: A sejteket a tenyésztőaljazatról 1mM EDTA-t tartalmazó PBS-ben, proteáz inhibitorok jelenlétében szedtük fel (Roche Complete, Protease Inhibitor Cocktail). A sejteket 10 perc 200 g centrifugálás (4°C) után, proteáz inhibitorokat (Roche Complete, Protease Inhibitor Cocktail) tartalmazó lízis-pufferben, kézi homogenizátorral homogenizáltuk. 10 perc 2000 g centrifugálás után, a felülúszókhöz Laemli puffert adtunk. 5 perc forralás után, kísérlettől függően, mintánként 20-20 µg ill 10-10 µg fehérjét vittünk fel 7%-os SDS (sodium dodecyl sulfate) -poliakrilamid gélre (rotiphorese gel 30 [Roth]). A fehérjéket futtatás után PVDF membránra (Immobilon-P; Millipore) blottoltuk át. A membránokat az első réteg ellenanyaggal egy éjszakán keresztül, 4°C-on inkubáltuk. A festést alkalikus foszfatáz konjugált másodlagos ellenanyaggal (Jackson) való inkubálás után, NBT-BCIP oldattal (0.165 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate [Sigma] és 0.33 mg/ml Nitro Blue tetrazolium [Sigma]) hívtuk elő.

Génexpressziós vizsgálatok (RT-PCR analízis)

A sejteket RNS-tartalmát RNeasy Mini Kit-tel (Quiagen), vagy Trizolos (Sigma) tisztítási módszerrel izoláltuk. A reverz transzkripciót 1,5 µg RNS-ből „First strand cDNA synthesis Kit” (Fermentas) használatával végeztük. A polimeráz reakcióhoz Hotstart Taq (Qiagen) polimerázt használtunk. A PCR reakciók termékeit 0,5 % Etidium Bromid (Promega) jelenlétében 1%-os agaróz (Promega) gélen futattuk.

Sejtpusztulás kimutatása (Tunel [TdT-dependent dUTP-biotin nick end labelling] reakció)

Az apoptotizáló sejtek megjelölésére a Roche In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red kitjét használtuk.

Proliferációs vizsgálatok (BrdU-beépülés)

A tenyészeteket a tenyésztőfolyadékban oldott 1 µM BrdU-val (5-brome-2'-deoxyuridine) kezeltük a kívánt időtartamon keresztül. A tenyészeteket, a kezelést követően, vagy a kezelés utáni meghatározott időpontokban 4% PFA-t tartalmazó PBS-ben fixáltuk. A BrdU-jelölést immuncitokémiai festéssel tettük láthatóvá.

Retinsav kimutatás

- Sejtbiológiai („bioesszé”) módszerrel: Az NE-4C sejtek által termelt retinsav méréséhez az F9 embrionális karcinóma sejtvonalat használtuk. Az F9 sejtek egy retinsav érzékeny β -galaktozidáz riporter konstrukciót hordoznak (Sonneveld és mtsai, 1999), melyben a *RAR β 2* gén promóterének retinsav érzékeny (RARE) elemét tartalmazó szekvencia szabályozza a β -galaktozidáz (*lacZ*) gén kifejeződését (RARE-LacZ). A β -galaktozidáz enzimaktivitást 1mg/ml X-gal-t tartalmazó (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside [Sigma]) oldattal „hívtuk elő”.

- RAREhsplacZ egértörzs: A RAREhsplacZ transzgén (Rossant és mtsai, 1991) három példányban tartalmazza a *RAR β* promóter RARE szekvenciáját. A RA-érzékeny promóter a β -galaktozidáz (*lacZ*) génjének expresszióját hajtja meg. Így, a β -galaktozidáz aktivitás kimutatásával az idegszöveten belül kimutathatóvá válnak azok a sejtek, melyek környezetében a RA megtalálható, és melyek érzékenyek is a RA-ra (tehát jelen vannak bennük a retinsav hatáshoz szükséges RA-receptorok és egyéb faktorok).

A retinsav magi receptorainak gátlása

A retinsav magi receptorain keresztül való hatását a pán-RAR (retinsav receptor) antagonistá AGN193109-cel (10^{-7} M) (Allergan Inc.) gátoltuk.

EREDMÉNYEK

A régió specifikus transzkripciós faktorok expressziójának vizsgálata az *in vitro* fenntartott idegi őssejtekben és az *in vitro* idegi differenciáció során

Munkám során az NE-4C idegi őssejtekben illetve az NE-4C sejtek, a P19 teratokarcinóma sejtek és R1 embrionális őssejtek RA-val indukált idegi differenciációja során vizsgáltam, az *in vivo* különböző idegrendszeri régiókra jellemző, „régió specifikus” transzkripciós faktorok expresszióját. Az *otx2*, *emx2*, *dlx2*, *pax6*, *otx3*, *gbx2*, *hoxb2* homeodomén transzkripciós faktorok expressziója mellett, vizsgáltam a bHLH DNS-kötő domént tartalmazó, *ngn2* és *mash1* proneurális gének expresszióját.

Az NE-4C sejtek indukátlan állapotban, az epiblaszt területén *in vivo* már a velőlemez kialakulását megelőzően expresszálódó *otx2* génen kívül más, általunk vizsgált régió specifikus transzkripciós faktort nem expresszáltak. Az *in vitro* differenciáció során azonban, az NE-4C tenyészetekben az összes általunk vizsgált régió specifikus gén aktiválódott (Varga és mtsai, 2008). Mivel a RA *in vivo* szerepet játszik a poszterior idegrendszeri területek identitásának kialakulásában, és a *gbx2* ill *hoxb2* gének expresszióját a RA közvetlenül is képes indukálni, elképzelhetőnek tartottuk, hogy az anterior idegrendszeri területről származó NE-4C sejtekben a poszterior idegrendszeri területekre jellemző gének közvetlenül a RA hatására aktiválódtak. A RA nélkül való differenciáltatás során azonban, a RA-as indukcióhoz hasonlóan, az összes általunk vizsgált régió specifikus transzkripciós faktor expressziója aktiválódott (Varga és mtsai, 2008). Mindezek alapján tehát úgy tűnik, hogy az NE-4C sejtek indukátlan állapotban regionálisan elkötelezetlenek.

A P19 és R1 sejtek RA-val indukált idegi differenciációja során, csakúgy, mint az NE-4C sejtek esetén, különböző *in vivo* expressziós mintázattal rendelkező homeobox (*emx2*, *dlx2*, *hoxb2*) és proneurális (*mash1*, *ngn2*) gének expresszálódtak (Varga és mtsai, 2008).

Az *in vitro* differenciáció során kialakuló idegsejtek fenotípusa

Az NE-4C sejtek differenciációja során a tenyészetekben az idegi sejsorsot befolyásoló transzkripciós faktorok széles palettája aktiválódott. Ezzel párhuzamosan, az NE-4C tenyészetekben különböző neurotranszmitter fenotípusokra (glutamaterg, GABA-erg, szerotonerg, kolinerg) jellemző markerek (*VGlut1*, *VGlut2*, *Gad65*, *Gad67*, *VGAT*, *GABA*, *5-HT*, *chat*) voltak kimutathatóak génexpressziós és/vagy fehérje szinten. Az idegsejtek nagy része *VGAT* vagy *VGlut2* pozitív volt, míg szerotonin tartalmú idegsejteket csak elvétve (<1%) találtunk (Varga és mtsai, 2008). Katekolaminerg markereket (*TH*-immunopozitivitás, *pitx3* ill. *dbh* expresszió) azonban nem tudtunk kimutatni a tenyészetekben annak ellenére, hogy a dopaminerg fenotípus kialakulásában szerepet játszó *Imx1b* és a noradrenerg sejtek kialakulásában szerepet játszó *phox2b* és *mash1* gének kifejeződtek a tenyészetekben (Varga és mtsai, 2008).

A P19 és R1 sejtek RA-val indukált idegi differenciációja során, glutamaterg (*vglut2*) és GABA-erg (*gad65*, *vgat*) markerek expressziója is kimutatható volt a tenyészetekben (Varga és mtsai, 2008).

Az *Emx2* homeodomén transzkripciós faktor túlexpresszáltatásának hatása az NE-4C idegi őssejtek fenotípusára, és differenciációs kapacitására

A következőkben azt vizsgáltam, hogyan változik meg a regionálisan elkötelezetlen NE-4C sejtek fenotípusa, és differenciációs potenciálja, ha az anterior idegrendszeri területek kialakulását szabályozó *emx2* régió specifikus transzkripciós faktort folyamatosan expresszáltatjuk a sejtekben. Ennek vizsgálatára, *emx2*-túltermelő NE-4C (NE-4C^{*emx2+*}) alklónokat hoztunk létre.

Az NE-4C^{*emx2+*} sejtek megőrizték idegi őssejt potenciáljukat. A differenciálatlan állapotot fenntartó körülmények között folyamatosan osztódtak, és számos osztódási cikluson keresztül stabilan fenntarthatók maradtak. Differenciáltató körülmények hatására, az NE-4C sejtekhez hasonlóan ideg- és asztroglia sejtek létrehozására is képesek voltak.

Az *emx2* expresszió hatására megváltoztak a sejtek adhéziós tulajdonságai. Megváltozott a különböző integrin molekulák expressziójának mértéke, és NE-4C^{*emx2+*} sejtek felszínén jelentős csökkenést tapasztaltunk az *E-cadherin* immunopozitivitásban. Hasonló csökkenés volt tapasztalható, laboratóriumunk korábbi munkái során, az NE-4C sejtek *E-cadherin* immunopozitivitásában a retinsavas indukció hatására. Az NE-4C^{*emx2+*} sejtek indukálatlan

állapotban, az NE-4C alapvonal sejtjeivel ellentétben, aggregált foltokban nőnek. Az NE-4C sejtek differenciációjának első, morfológiailag is elkülöníthető lépése a sejtek aggregációja. Laboratóriumunk korábbi munkája alapján tudjuk, hogy ez a lépés elengedhetetlen az idegsejtek későbbi kialakulásához. Ennek megfelelően, az indukátlan állapotot fenntartó növekedési faktorok megvonásának hatására a differenciációs lépések az NE-4C $emx2^+$ sejtek esetén gyorsabban következtek be, és az első idegsejtek hamarabb jelentek meg, mint az NE-4C alapvonal esetén.

Az NE-4C $emx2^+$ sejtekben több olyan, az idegi fejlődés szabályozásában kulcsfontosságú fehérje (*EGFR*, *Hes3*, *BLBP*, *Pax6*) génje mutatott megemelkedett expressziót, melyek az NE-4C sejtekben indukátlan állapotban nem, vagy csak alacsony szinten fejeződtek ki, és melyek expressziója az NE-4C alapvonal sejtjeiben csak a differenciáció megindulásával fokozódott.

Az *emx2* túltermeltetése tehát megváltoztatta az NE-4C sejtek fenotípusát. A következőkben a sejtek differenciációs potenciáljára gyakorolt hatását vizsgáltuk. Mivel az *emx2* a fejlődő idegrendszerben az anterior idegrendszeri területeken fejeződik ki, és e területek regionális identitásának meghatározásában jelentős szerepet játszik, feltételeztük, hogy túlexpresszáltatása befolyásolhatja az NE-4C sejtek regionális identitását. Az idegi differenciáció során azonban, az NE-4C $emx2^+$ tenyészetekben, az NE-4C tenyészetekhez hasonlóan, aktiválódtak a különböző régió specifikus homeobox és proneurális gének. Az *Emx2* az idegsejt képzés idején *in vivo* döntően a kérgi glutamaterg idegsejteket képző dorzális előagyi VZ progenitoraiban expresszálódik. Az *emx2* túlexpresszáltatása azonban az NE-4C tenyészetekben nem gátolta az egyéb (GABA-erg, szeroton immunopozitív) idegsejt fenotípusok kialakulását. Sőt, az NE-4C $emx2^+$ sejtek az NE-4C sejtekkel ellentétben (Varga és mtsai, 2008), katekolaminerg idegsejteket is képeztek.

A retinsav hatása az *in vitro* asztroglia képzésre

Doktori munkám további részében az *in vitro* idegsejt képzés indukálására széleskörűen alkalmazott *all-transz* retinsav asztroglia képzésre gyakorolt hatását vizsgáltam. *In vitro* és *in vivo* egyaránt megfigyelhető, hogy az asztroglia sejtek az idegi fejlődés során az idegsejtekhez képest késleltetetten jelennek meg. Az NE-4C sejtek az asztroglia képzést elősegítő körülmények (*bmp*, *cntf* gének expressziója, a sejtek idegsejt gazdag környezetbe való helyezése) ellenére sem képeznek asztroglia sejteket a differenciáció kezdeti, idegsejt képző fázisában (Hádinger és mtsai, 2009). Mivel tudtuk, hogy a RA az idegsejt irányú

differenciációt támogatja, és hogy a progenitorok környezetében a korai, idegsejt képző stádiumokban *in vivo* és *in vitro* egyaránt jelen van, felmerült bennünk a kérdés: kihat-e a retinsav szabályozó szerepe az asztroglia irányú fejlődésre is?

Az NE-4C sejtek differenciáltatására használt kezdeti, 48 órás RA kezelés nem gátolta az asztroglia sejtek későbbi kialakulását. Sőt, míg idegsejt képzés RA nélkül is kiváltható az NE-4C tenyészetekben, az asztroglia sejtek kialakulásához szükség volt a kezdeti RA kezelésre (Hádinger és mtsai, 2009). A RA folyamatos jelenléte az idegsejt képzés időszakában nem gátolta a későbbiekben bekövetkező asztroglia képződést. A differenciáció fő idegsejt képző szakasza után, az asztroglia képző stádiumaiban adott RA azonban, jelentősen csökkentette a kialakuló *GFAP*-pozitív asztroglia sejtek számát, mind a P19 mind az NE-4C tenyészetekben (Hádinger és mtsai, 2009). A RA kezelés ugyanakkor, nem növelte a képződő idegsejtek, illetve nem csökkentette a tenyészetekben fennmaradó SSEA-1 pozitív progenitorok számát (Hádinger és mtsai, 2009). A RA tehát nem azáltal csökkentette a kialakuló asztroglia sejtek számát, hogy a tenyészetekben fennmaradt progenitorok idegsejt irányú differenciációját okozta. Asztroglia sejtekben gazdag tenyészeteket RA-val kezelve, nem tapasztaltunk változást az apoptotikus sejtek számában (Hádinger és mtsai, 2009), ami azt jelenti, hogy a RA nem az asztroglia sejtek szelektív elpusztításán keresztül csökkentette a *GFAP*-pozitív sejtek számát. A RA tehát valószínűleg közvetlenül az asztroglia sejtek kialakulását gátolta. Az NE-4C sejtek által a differenciáció során termelt, endogén RA transzkripciót szabályozó hatását pán-RAR antagonistával (AGN193109) gátoltuk. Ha a RA hatást az asztroglia képző szakaszban gátoltuk, jelentősen nőtt a kialakuló *GFAP* pozitív sejtek száma (Hádinger és mtsai, 2009). Az idegsejt képzés szakaszában alkalmazott AGN193109 kezelés azonban nem okozott idő előtti asztroglia képzést (Hádinger és mtsai, 2009). Ezek alapján, bár az idegi differenciáció korai szakaszaiban a differenciálódó sejtek által termelt RA nem játszott szerepet az asztroglia irányú fejlődés késleltetésében, az idegsejt képzést követő stádiumban szerepet játszott a kialakuló asztroglia sejtek számának szabályozásában.

KÖVETKEZTETÉSEK

- A korai idegi fejlődési stádiumból származó NE-4C őssejtek *in vitro* körülmények között regionálisan elkötelezetlenek. Az egy sejt eredetű őssejt populációk (NE-4C idegi őssejtek, R1 embrionális őssejtek illetve P19 teratocarcinoma sejtek) *in vitro* idegi differenciációja során a tenyészeteken belül kialakuló kölcsönhatások következtében, számos

regionális identitást és idegsejt sorsot meghatározó gén expressziója indukálódhat, és ezzel párhuzamosan különböző idegsejt típusok alakulhatnak ki. Az idegsejtekben gazdag NE-4C tenyészetekben, glutamaterg, GABA-erg, szerotonerg és kolinerg idegsejt markerek is kimutathatók, katekolaminerg sejtek azonban, a vizsgált körülmények között, nem alakulnak ki.

- Az elő-és köztiagyi regionalizációs folyamatokat szabályozó *Emx2* transzkripció faktor túlexpresszálatása megváltoztatja az NE-4C idegi őssejt fenotípusát, és differenciációs kapacitását.

- Bár az NE-4C^{*emx2*+} sejtek megtartják idegi őssejt potenciáljukat, az *emx2* túltermeltetése megváltoztatja az NE-4C sejtek fenotípusát. NE-4C^{*emx2*+} sejtek indukátlan állapotban expresszálnak olyan, progenitor fenotípust szabályozó géneket, melyek az NE-4C alapvonalon csak az idegi differenciációval aktiválódnak, megváltozott adhéziós tulajdonságokkal rendelkeznek, és a differenciálatlan állapotot fenntartó körülmények megszűnésére gyorsabban reagálnak. Mindezek alapján, úgy tűnik, az NE-4C^{*emx2*+} sejtek az alapvonalhoz képest egy későbbi fejlődési stádiumot képviselnek.

- Az *emx2* transzgén kifejeződésének ellenére, az NE-4C^{*emx2*+} sejtek regionálisan elkötelezetlenek maradnak, és képesek mind GABA-erg mind szerotonint tartalmazó és glutamaterg sejtek létrehozására.

- Az NE-4C^{*emx2*+} sejtek az NE-4C alapvonallal ellentétben katekolaminerg idegsejtek létrehozására is képesek.

- Az *all-transz* retinsav fejlődési időablakonként eltérő hatást vált ki az asztroglia irányú differenciációra. A differenciálatlan NE-4C őssejtekben az idegsejt irányú fejlődés indukálásával párhuzamosan, egyes progenitor populációkban megalapozza a későbbi asztroglia képzés lehetőségét. Az idegsejt képzés lezajlása utáni stádiumban, a RA gátolja a *GFAP*-pozitív sejtek kialakulását.

- Eredményeink nem igazolták, hogy az NE-4C sejtek által termelt, vagy a kívülről adott RA közvetlenül gátolná az asztroglia képzést az *in vitro* differenciáció korai -idegsejt képző- szakaszában. A RA tehát, közvetlenül, valószínűleg nem játszik szerepet „idegsejtképzés először – asztroglia képzés csak ezt követően” időrendiség kialakulásában.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

A Doktori disszertáció alapját képező publikációk:

Hádinger N, Varga BV, Berzsenyi S, Környei Z, Madarász E, Herberth B, Astroglia genesis in vitro: distinct effects of retinoic acid in different phases of neural stem cell differentiation. *Int J Dev Neurosci.* 27(4):365-75. (2009)

Varga BV, Hádinger N, Gócza E, Dulberg V, Demeter K, Madarász E, Herberth B, Generation of diverse neuronal subtypes in cloned populations of stem-like cells. *BMC Dev Biol.* 8:89. (2008)

Egyéb publikációk:

Zádori A, Agoston VA, Demeter K, Hádinger N, Várady L, Köhídi T, Göbl A, Nagy Z, Madarász E, Survival and differentiation of neuroectodermal cells with stem cell properties at different oxygen levels. *Exp Neurol.* 227(1):136-48. Epub 2010 Oct 20. (2011)

Varga B, Markó K, Hádinger N, Jelítai M, Demeter K, Tihanyi K, Vas A, Madarász E, Translocator protein (TSPO 18kDa) is expressed by neural stem and neuronal precursor cells. *Neurosci Lett.* 462(3):257-62. (2009)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

Köszönettel tartozom Herberth Balázsnak és Varga Balázsnak, akikkel a disszertáció anyagát képző témákon szorosán együttműködve dolgoztunk. Külön köszönöm Herberth Balázsnak a szakdolgozó éveimben való témavezetést, melynek során gyakorlati és elméleti tudományos ismereteimet megalapozhattam.

Köszönettel tartozom Gócza Elennek, Környei Zsuzsannának, Berzsenyi Sárának, Vered Dulbergnek és Demeter Kornélnak, akik szerzőtársaim a disszertáció alapját képző publikációkban.

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

Köszönöm Jelitai Mártnak, Markó Károlynak, Kőhidi Tímeának és Neubrandt Máténak, hogy volt kivel megvitatom az aktuális tudományos kérdéseket, és hogy bármikor számíthattam segítségükre a munkám és a disszertáció megírása során felmerült problémák megoldásában.

Köszönöm ezen kívül az MTA-KOKI Idegi Sejt- és Fejlődésbiológia Laboratórium minden jelenlegi és volt munkatársainak segítőkészségüket, a munkát kísérő jó hangulatot.

Dr. Ágoston Viktor	Orsolits Barbara	Vizi Csenge
Czöndör Katalin	Dr. Schlett Katalin	Vörös Erzsébet
Jády Attila	Dr. Szelényi Judit	Vőfély Gergő
Kenesei Kata	Dr. Székács Inna	Dr. Zádori Anita
Mészáros Zsófia	Dr. Tárnok Krisztián	
Németh Valéria	Vágovits Balázs	

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.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretnék köszönetet mondani családomnak, akik a kezdetektől fogva az élet minden területén mögöttem álltak.