

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

Doktori értekezés

Kőhidi Tímea

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Madarász Emília, DSc. professor emerita

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

Tartalom

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	7
1.1. Idegi őssejtek/progenitorsejtek az emlős agyban	7
1.1.1 Neuroepiteliális őssejtek	9
1.1.2 Radiális glia sejtek	10
1.1.3. Intermedier progenitorok/ köztes sokszorozó sejtek	18
1.2. Az idegi őssejtek/progenitorsejtek csoportosítása	22
1.3. Idegi őssejtek/progenitorsejtek in vitro	22
1.3.1 Idegi őssejtek/progenitorsejtek in vitro tenyésztésének klinikai felhasználása	24
1.4. Idegsejt előalakok migrációja	25
1.5. A depolarizáció hatása az idegi fejlődésre	26
1.5.1 Fényérzékeny ioncsatornák	28
2. Célkitűzések	31
3. Anyagok és módszerek	32
3.1 AK-ciklo[RGDfC] –vel borított tenyésztőfelszínek létrehozása	32
3.2 Embrionális primer sejtuszpenzió előállítása	32
3.3 Felnőtt primer sejtuszpenzió előállítása	33
3.4 Radiális glia- jellegű sejt kultúrák létrehozása	33
3.5 Egy sejt eredetű klónok előállítása	34
3.6 Transzfektálás pTurbo- Cre plazmával	34
3.7 ChR2-eYFP pozitív és negatív radiális glia-jellegű sejtek szétválogatása FACS-szal	35
3.8 Radiális glia- jellegű sejtek differenciálása	35
3.9 RT-PCR analízis	36
3.10 Immuncitokémiai festés	38
3.11 Kromoszóma számolás	39
3.12 Elektrofiziológiai mérések, patch clamp:	40
3.13 ChR2-eYFP fúziós fehérje expressziójának mikroszkópos meghatározása	41
3.14 Videomikroszkópia	41
3.15 A sejtmozgás analízise	42

3.16 Statisztikai analízis	43
4. Eredmények	44
4.1 Radiális glia-jellegű idegi őssejtek izolálása embrionális előagyból	44
4.2 Radiális glia-jellegű idegi őssejtek izolálása felnőtt agyból	50
4.3 Radiális glia- jellegű őssejtek jellemzésének összefoglalása	53
4.4 Radiális glia-jellegű sejtek differenciációja különböző idegi sejttypusokká	55
4.5 Asztrogliá sejtek alakulása	55
4.6 Oligodendroglia sejtek képződése	56
4.7 Idegsejtek képződése	58
4.8 A radiális glia-jellegű sejtekből fejlődő idegsejtek/idegsejt előalakok elektrofiziológiai sajátosságai.....	61
4.9 A különböző eredetű radiális glia-jellegű sejtekből <i>in vitro</i> alakuló idegsejtek neurotranszmitter fenotípusa	63
4.10 Channelrhodopsint expresszáló radiális glia-jellegű sejtek izolálása embrionális egéragyból.....	66
4.11 Channelrhodopsin2+ radiális glia-jellegű sejtek idegsejt képzése	69
4.12 Channelrhodopsint expresszáló sejtek fényingerre adott válasza.....	73
4.13 Az indukált kationáramlás hatása a radiális glia-jellegű sejtek mozgására	74
4.14 A sejtmozgás adatainak elemzése	76
5. Megbeszélés.....	82
5.1 A radiális glia jellegű sejtek kinyerésére kidolgozott módszer	82
5.2 Különböző életkorból és agyi régiókból izolált egér radiális glia-jellegű sejtek sajátosságai	85
5.3 Különböző radiális glia jellegű sejtek <i>in vitro</i> fejlődési lehetőségei	87
5.4 Az ionos stimuláció hatásai radiális glia jellegű sejtek motilitására	90
6. Következtetések	94
7. Összefoglalás	95
8. Summary.....	96
9. Irodalomjegyzék	97
10. Saját publikációk.....	112
11. Köszönetnyilvánítás	114

Rövidítések jegyzéke

A: Ala Alanin

bHLH: bázikus helix-loop-helix

BLBP: brain lipid binding protein

BR: bakteriorodopszin

BSA: Bovine serum albumin, marha szérum albumin

C: Cys Cisztein

CalB: calbindin

CB: cerebellum, kisagy

Chat: kolin- acetiltransferáz

ChR1: channelrhodopsin- 1

ChR2: channelrhodopsin-2

CX: cortex, agykéreg

CTX: cortex

D: Asp Aszparaginsav

DAB: 3,3'-Diaminobenzidín

DBH: dopamin béta-hidroxiláz

DCX: doublecortin

DG: hippocampusz gyrus dentatus-a

Dlx2: distal-less homeobox 2

DMEM: Dulbecco Módosított Eagle Médiuma

EGF: epidermális növekedési faktor

EGTA: etilén- glikol-tetraecetsav

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

Emx1: Empty spiracles homeobox 1

Emx2: Empty spiracles homeobox 2

ESC: embrionális őssejt

eYFP: enhanced yellow fluorescent protein, sárga fluoreszcens fehérje

E9-10: embrionális fejlődés 9-10. napja

E14: embrionális fejlődés 14. napja

E14,5: embrionális fejlődés 14,5. napja

E17: embrionális fejlődés 17. napja

f: D- fenilalanin

FCS: Fötális borjúsérum
FGF2: fibroblaszt növekedési faktor 2
G: Gly Glicin
GABA: gamma- amino- vajsav
GC: glomeruláris sejt
GLAST: glutamát-aszpartát transzporter
GFAP: glial fibrillary acidic protein
GFP: green fluorescent protein, zöld fluoreszcens fehérje
HC: hippocampus
HEPES: hidroxietilpiperazin- etánszulfonsav
HI: hippocampus
HyTh: hypothalamusz
Hox2b: homeobox protein B2
HPRT: hipoxantin guanin foszforibozil transzferáz
iPSC indukált pluripotens őssejt
IZ: intermedier zóna
K: Lys Lizin
TH: tirozinhidroxiláz
TN-C: Tenascin C
LGE: lateral ganglionic eminence, laterális gangliondomb
LIF: leukemia inhibitory factor
MA: mantle layer, más néven intermedier zóna
Mash1: Mammalian Achaete Scute Homolog
MES: mesencephalon, középagy
MGE: medial ganglionic eminence, mediális gangliondomb
MID: midbrain, középagy
MP: csont morfogenetikus protein
MZ: marginális zóna
NE: neuroepitélium
NEP: neuroepiteliális progenitor
Ngn1,2: Neurogenin 1,2
nIP: neurális intermedier progenitor
Nkx2.1: NK2 Homeobox 1
neuroblaszt: keletkező fiatal idegsejt előalak

NS: neural stem cell, idegi őssejt
NSC: idegi őssejt
OB: olfactory bulb, szaglógumó
Oct4: octamer-binding transcription factor 4
oIP: oligodendroglia intermediar progenitor
Olig2: oligodendrocita- specifikus transzkripció faktor2
O4: oligodendroglia marker
PGC: periglomeruláris sejt
Pax6: Paired box gene 6
PBS: foszfát- pufferelt sóoldat
PDGF: vérlemezke eredetű növekedési faktor
PFA: paraformaldehid
Pitx3: Pituitary homeobox 3
PSA-NCAM: polysialylated-neural cell adhesion molecule
P62: posztnatális fejlődés 62.napja
R: Arg Arginin
RG: radiális glia
RG1: radiális glia-jellegű
RMS: rostrális migrációs ösvény
RT- PCR: polimeráz láncreakció
SGZ: szubgranuláris zóna
SHH: sonic hedgehog
SEZ: szubependymális zóna
Sox2: SRY (sex determining region Y)- Box 2
SVZ: szubventrikuláris zóna
T3: trijód- tironin
Tph2: triptofán hidroxiláz2
TTX: tetrodotoxin
vGat: vezikuláris GABA transzporter
vGlut: vezikuláris glutamát transzporter
VZ: ventrikuláris zóna

1. Bevezetés

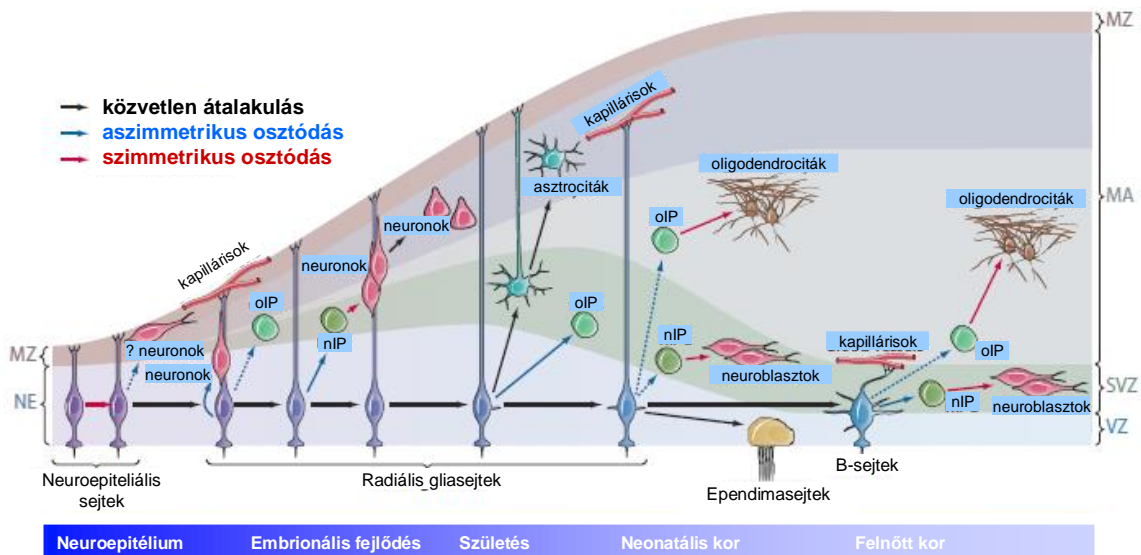
Az 1900-as évek végéig általánosan elfogadott nézet szerint, az emlős szervezetek központi idegrendszerében az idegsejt-képződés lehetősége a születés után rövid idővel megszűnik. Reynolds és Weiss (Science 1992) azonban felnőtt egér előagyából izoláltak idegi őssejteket, amelyek az in vitro feltételektől függően változatlan formában sokszorozódtak, vagy olyan utódsejteket hoztak létre, amelyek idegsejteké fejlődtek. A következő években egyre több közlemény számolt be idegi őssejtek jelenlétéről főemlősök (Gould 1999) és az ember (Svendsen 1999) érett központi idegrendszerében is. Ma már tudjuk, hogy önmegújító, de sok-irányú fejlődésre is képes sejtek – azaz szöveti őssejtek - jelen vannak a magasan differenciált, önmegújításra látszólag nem képes idegszövetben is. Ez a tudás vázolta a klinikai idegsejt-pótlás lehetőségét, de azonnal felvetette a kérdést: ha van szövetcépző sejtkapacitás, vajon miért feltűnően alacsony a regeneráció lehetősége központi idegszövetben, a többi szövethez képest. Vajon az idegszöveti őssejtek autonóm, belső fejlődési lehetőségei korlátozottak? Vagy az idegszöveti őssejtek is széles fejlődési potenciállal rendelkeznek, de a központi idegszövet belső környezete gátolja a sejtfejlődés lehetőségeinek megvalósulását?

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

1.1. Idegi őssejtek/progenitorsejtek az emlős agyban

Az idegrendszer összes neuroektodermális eredetű sejtípusát az idegi őssejtek/progenitorsejtek hozzák létre. Őssejteknek nevezzük azokat a sejteket, amelyek korlátlan mértékben képesek osztódni, képesek önmegújításra (vagyis újabb őssejtek létrehozására) és az adott szövet többféle sejtípusának képzésére is. Az ennél korlátozottabb differenciálódási képességgel rendelkező sejteket összefoglaló néven progenitorsejteknek hívjuk (Taverna és mtsai, 2014). Amíg egy differenciálatlan őssejt vagy progenitorsejt eljut a végdifferenciált sejtállapotig folyamatosan változik (1.Ábra). Ennek köszönhetően sokszor nehéz az adott időpillanatban bizonyos tulajdonságokkal

rendelkező sejtet egy jól meghatározott kategóriába, fenotípusba besorolni. Az idegi őssejteket célzó kutatások során azonban elengedhetetlen, hogy definiáljunk bizonyos őssejt/progenitorsejt típusokat, amelyeket doktori értekezésemben szeretnék bemutatni. A bemutatás során a fókusz a radiális glia sejtekre helyeztem, mivel ezt a sejtípust vizsgáltam részletesen doktori munkám során.



Kriegstein és Alvarez-Buylla 2009

1.Ábra Az idegi őssejtek/progenitorsejtek

A neuroepiteliális sejtek főként szimmetrikusan osztódnak, önmagukhoz hasonló újabb neuroepiteliális sejteket létrehozva növelik a fejlődő idegrendszer őssejt készletét. A neuroepiteliális sejtekből differenciálódnak az első idegsejtek is. A fejlődő velőcsőben az idegsejtképzés megindulásával a neuroepiteliális sejtek egyre több gliális tulajdonságra tesznek szert, fokozatosan átalakulnak radiális glia sejtekké. A radiális glia sejtek szimmetrikus osztódással képesek saját számukat növelni, asszimmetrikus mitózisaik révén keletkező progenitorsejteken keresztül pedig idegsejteket és oligodendroglia sejteket hoznak létre. Az embrionális fejlődés végén, a születés környékén sok radiális glia sejt apikális nyúlványa elválik a kamrafelszíntől; ezek a sejtek asztroglia sejtekké differenciálódnak. Más radiális glia sejtek továbbra is szorosán kapcsolódnak a kamrafalhoz, ezek ependyma sejtekké alakulnak át. Van néhány agyterület pl.: felnőtt előagy szubventrikuláris zóna, ahol a születés után is megmarad egyes glia jellegű sejt őssejt kapacitása, vagyis képesek maradnak idegsejtek és oligodendroglia sejtek létrehozására.

A folyamatos nyilak kísérletesen alátámasztott adatok, a szaggatott nyilak hipotetikus adatok. A nyilak színei a szimmetrikus osztódást, az asszimmetrikus osztódást és a közvetlen átalakulást jelzik.

oIP: oligodendroglia intermedier progenitor, nIP: neurális intermedier progenitor, neuroblaszt: keletkező fiatal idegsejt előalak, VZ:ventrikuláris zóna, SVZ: szubventrikuláris zóna, MA: mantle layer, más néven intermedier zone, a piális felszín felé vándorló, differenciálódó sejtek rétege; MZ: marginális zóna, NE: neuroepitélium

1.1.1 Neuroepiteliális őssejtek

A neuroepiteliális sejtek alkotják a kezdetben egy sejtrétegű velőcső falát (1.Ábra). Folyamatosan osztódnak, főként szimmetrikusan, önmegújító módon, így növelik a fejlődő idegrendszer őssejt készletét. Epiteliális sejtekre jellemző tulajdonságokat mutatnak: apiko-bazálisan polarizáltak és átérnek a velőcső teljes vastagságát (Huttner és Brand, 1997). Apikális nyúlványuk a kamra felszínhez, bazális nyúlványuk a piális felszínhez kapcsolódik. Jellemző rájuk az interkinetikus magvándorlás, vagyis sejtmagvaik a kamra és a piális felszín között vándorolnak a sejtciklus során (Latasa és mtsai, 2009). A neuroepiteliális sejtek jellegzetes intermedier filamentuma a nesztin fehérje (Lendahl és mtsai, 1990).

Egérben az embrionális fejlődés 9-10. napján (E9-10) beindul az idegsejt képzés az előagy területén: a szimmetrikus sejtosztódás mellett, megjelenik az asszimmetrikus osztódási mód. A neuroepiteliális sejtek osztódásuk során egy újabb neuroepiteliális sejtet és egy idegsejtet vagy egy idegsejt irányba elkötelezett intermedier progenitor sejtet (lásd lejjebb) hoznak létre (Haubensak és mtsai 2004, Noctor és mtsai 2004). Ezzel egy időben a neuroepiteliális sejtek egyre több gliális tulajdonságra is szert tesznek. Asztroglia sejtekre jellemző markereket kezdenek expresszálni, például: GLAST (glutamát-aszpartát transzporter; Shibata és mtsai, 1997), BLBP (brain lipid binding protein; Feng és mtsai, 1994), GFAP (glial fibrillary acidic protein; Levitt és Rakic, 1980, Choi, 1981), S100 β , Tenascin C (TN-C; Götz és mtsai, 1998). A nesztin mellett expresszálni kezdi a vimentin intermedier filamentumot, valamint az RC1 és RC2 epitópokat (Mori és mtsai 2005). A sejtek elvesztik tight junction kapcsolataikat, és az adherens kapcsolatokban az E-cadherin szerepét egyre inkább az N-cadherin veszi át (Aaku-Saraste és mtsai, 1997).

Megmarad azonban a sejtek néhány neuroepiteliális tulajdonsága is: továbbra is megfigyelhető az interkinetikus magvándorlás és az apiko-bazális polaritás. Azonban az idegsejtképzés során egyre vastagodó a velőcsővel/kezdetleges kéreggel együtt hosszabbodik a sejtek piális felszínhez kapcsolódó nyúlványa. Ez a nyúlvány szolgál felszínként a keletkező idegsejt intermedier progenitorok radiális vándorlásához a fejlődő agykéregben (Levitt és Rakic, 1980, Huang, 2009).

Egérben az embrionális fejlődés 12. napja körül a dorzális előagyi területeken létrejön egy új, jól karakterizálható őssejt típus: a radiális glia (Rakic 1971), amely jellegzetessége, hogy hosszú radiális nyúlványa mellett gliális és neuroepiteliális tulajdonságokat vegyesen mutat.

1.1.2 Radiális glia sejtek

1.1.2.1. Az embrionális radiális glia sejtek

A radiális glia sejtek osztódóképességét először Rakic bizonyította be Rhesus majmokon végzett vizsgálataiban során (Rakic 1972, Schmechel és Rakic 1979). Nevüket a kamrafal teljes vastagságát átérő, sugárirányban elnyújtott (radiális) alakjukról, és az embrionális főemlős agyban jól látható (asztrogliá-specifikus) GFAP-tartalmukról kapták. Mára világossá vált, hogy a jellegzetes sejtalak megléte mellett, az embrionális egéragy radiális glia sejtjeiben a GFAP fehérje szinten nem fejeződik ki (Malatesta és Götz 2013).

Számos kísérleti adat bizonyítja, hogy egérben az előagyi kéreg idegsejtképzésének fő időszakában (~E12-16) a kamrát közvetlenül határoló sejtrétegben (a ventrikuláris zónában) jelenlévő radiális glia sejtek a fő idegsejtképző őssejtek (1. Ábra) (Kriegstein és Alvarez-Buylla 2009, Malatesta és Götz 2013). Ahhoz, hogy a radiális glia sejtek őssejt kapacitása fennmaradjon speciális mikrokörnyezetre, „niche”-re van szükségük. A ventrikuláris zóna extracelluláris mátrixának glikoproteinjei és proteoglikánjai fontos szignálmolekulákat biztosítanak ezeknek a sejteknek. A radiális glia sejtek ugyanakkor kapcsolatban maradnak a kamrával és az érhálózattal is, ahonnan szintén fontos faktorokhoz pl.: morfogénekhez, citokinekhez, növekedési faktorokhoz jutnak (Faissner és Reinhard 2015, Okazaki és Gotoh 2018).

BLBP (radiális glia marker, lásd fent) promoter által meghajtott Cre rekombinázt transzfektálva az agyszövetbe, majd a Cre/loxP sorstérképet feltárva kimutatták, hogy a központi idegrendszer sejtjeinek nagy része a radiális glia sejtek leszármazottja. A radiális glia sejtek a központi idegrendszer teljes hosszában képesek idegsejtek létrehozására (Anthony és mtsai, 2004). A radiális glia sejtek leszármazottai között ugyanúgy vannak serkentő projekciós neuronok, mint interneuronok. Az idegsejteken kívül a radiális glia őssejtekből differenciálódnak az oligodendroglia sejtek is (1.Ábra) (Fogarty és mtsai 2005, Caspr és McCarthy 2006). Az embrionális fejlődés befejeztével a radiális glia sejtek egy része a kamrát határoló ependyma sejtekké alakul (1.Ábra) (Kyrousi és mtsai 2017). A születés környékén a radiális glia sejtek egy másik csoportja elveszíti apikális kapcsolatát a kamrafelszínnel és radiális nyúlványa mentén szomális transzlokáció során a piális felszín felé mozdul el, és fokozatosan átalakul asztroglia sejté (1. Ábra) (Voigt 1989, Noctor és mtsai 2008). Ez a transzformáció végbemegy az idegcső teljes hosszában és a szubkortikális előagyi területeken is (Barry és McDermott 2005). A fentieket in vitro kísérletek is alátámasztották: embrionális agyból izolált őssejt-kultúrákban a radiális glia sejtek először idegsejteket, majd később asztroglia sejteket hoztak létre (Quian és mtsai 2000). Megjelentek azonban olyan publikációk is, amelyekben leírták, hogy a radiális glia sejtek idegsejteket nem, csak oligodendroglia sejteket (Luskin és mtsai 1993) vagy csak asztroglia sejteket képesek létrehozni (McCarthy és mtsai 2001). Azonban Bonaguidi és munkatársai in vivo sejt követéses eljárással egyértelműen bebizonyították, hogy léteznek multipotens (idegsejteket és gliasejteket egyaránt létrehozó) valódi idegi őssejtek is a korlátozottabb fejlődési potenciálú (vagy csak idegsejtet, vagy csak gliasejtet létrehozó) progenitorsejtek mellett (Bonaguidi és mtsai 2011). Mindez azt bizonyította, hogy a radiális glia sejteknek több populációja, illetve több fejlődési stádiumban „megrekedt” al-populációja van jelen az embrionális előagyban is.

1.1.2.2. Radiális glia-jellegű sejtek a felnőtt agyban

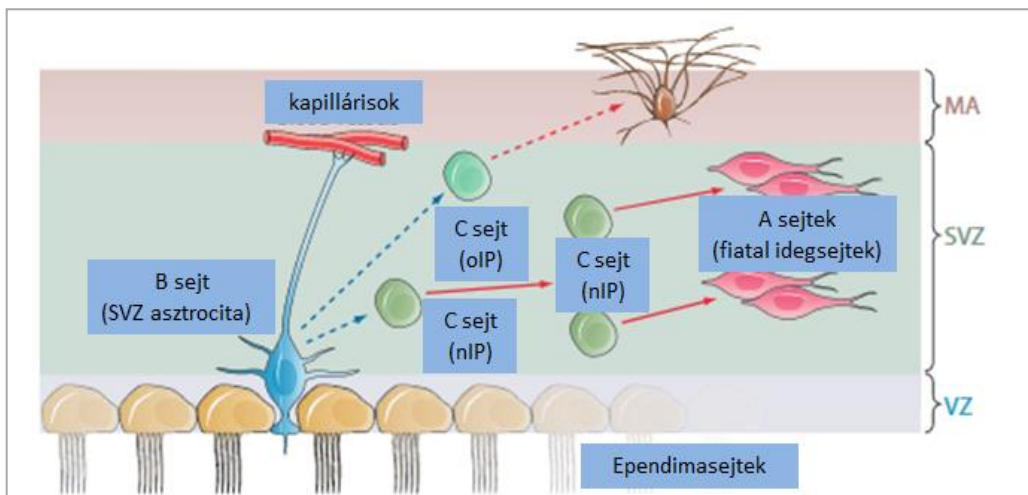
Néhány kitüntetett agyterületen megmarad egy olyan speciális mikrokörnyezet (Alvarez-Buylla és mtsai 2008, Licht és Keshet 2015), ahol a radiális glia sejtek felnőtt korban is megtartják őssejt tulajdonságaikat, nem alakulnak át végdifferenciált sejté (Gage 2002, Ming és Song 2005, Ming és Song 2011). Felnőtt agyban legelőször énekesmadarakban mutattak ki radiális glia morfológiájú idegi őssejteket, amelyek

idegsejteket is képesek voltak létrehozni (Nottebohm 1985). Nagy áttörést jelentett, amikor a rágszálókban is sikerült kimutatni felnőtt korban keletkező idegsejteket, (Altman és Das 1965, Goldman és mtsai 1996, Alvarez- Buylla és mtsai 1998). Először az előági oldalkamrák falának szubventrikuláris zónájában (SVZ) bizonyították a felnőttkori idegsejtképzést, ahonnan az újonnan keletkező idegsejtek a szaglógumóba vándorolnak (Luskin 1993, Lois és Alvarez-Buylla 1994, Imayoshi és mtsai 2008, Grubb és mtsai 2008). A felnőtt agyszövet egy másik területén is találtak bizonyítékokat újidegsejtek jelenlétére, mégpedig a hippocampus gyrus dentatus-ának szubgranuláris zónájában (SGZ) (Altman és Das 1965, Gould és Cameron 1996, Kempermann 1997). Ezek kisebb távolságot megtéve, a hippocampus gyrus dentatus-ának szemcsesejtjeit képezik (Aguilar- Arredondo és mtsai 2015). Ismert, hogy a neurogén zónák (SVZ, SGZ) mellett, idegi progenitor sejtek előfordulnak a felnőtt agyi parenchimában is. Ezek többségét oligodendrocita- (Baumann 2001), vagy oligodendrogliá-2 típusú asztrogliá (O2A) progenitorként azonosították (Raff 1983).

1.1.2.2.1. A felnőtt előági szubventrikuláris zóna őssejtjei

A felnőtt rágszáló előági szubventrikuláris zónájában (SVZ) megkülönböztetjük a nyugvó állapotú őssejteket, az úgynevezett B sejteket (2. Ábra), amelyek képesek az SVZ összes többi sejtípusának megújítására (Doetsch és mtsai. 1999, Imura és mtsai 2003). Ezek a sejtek nagyfokú ultrastrukturális hasonlóságot mutatnak az asztrogliá sejtekkel, expresszálják a GFAP és GLAST markereket (Doetsch és mtsai 1997, Imura és mtsai 2003, Morshead és mtsai 2003, Platel és mtsai. 2008). Korábban végdifferenciált asztrogliá sejteknek tekintették őket (Doetsch és mtsai 1999). Annak ellenére, hogy a kamrát határoló ependymaréteg felett, a szubventrikuláris zónában található, egy vékony apikális nyúlványon keresztül mégis kapcsolatot teremtenek a kamrával az ependymasejtek között. Apikális nyúlványokról egyetlen csilló nyúlik az oldalkamrák üregében az ependymasejtek csillói közé (2. Ábra). Ugyanakkor hosszabb bazális nyúlványukon keresztül kapcsolatba lépnek a marginális zónában lévő erekkel is (2. Ábra), hasonlóan az embrionális agyban lévő radiális glia sejtekhez (Mirzadeh és mtsai 2008, Shen és mtsai 2008, Tavazoie és mtsai 2008). Expresszálják a radiális glia sejtekre jellemző *nestin* és *sox2* géneket (Kriegstein és Alvarez-Buylla 2009). Számos tulajdonságukban hasonlítanak az embrionális radiális glia sejtekhez ezért szelektív sejtjelöléses eljárással megvizsgálták, hogy milyen leszármazási kapcsolat van

az embrionális radiális glia sejtek és a B sejtek között. Merkle és munkatársai bebizonyították, hogy az SVZ B sejtjei az embrionális radiális glia sejtek közvetlen leszármazottai (Merkle és mtsai 2004). Hasonlóan az embrionális radiális glia sejtekhez, a B sejtek is kapcsolatot tartanak fent az agykamrával és az erekkel, valamint speciális extracelluláris „niche” veszi őket körül, ahonnan őssejt állapotuk fenntartásához szükséges faktorokhoz jutnak (Hungfu és Anderson 2005, Singla és Reiter 2006, Kerever és mtsai. 2007, Shen és mtsai 2008, Tavazoie és mtsai 2008). A B sejtek őssejt potenciálját bizonyítja, hogy in vitro neurosphere-ek (Weiss és mtsai 1996) létrehozására képesek (Morshead és mtsai 1994). Őssejt tulajdonságú sejtek nem csak a felnőtt rágcsálók, hanem a humán felnőtt előagy oldalkamráinak szubventrikuláris zónájában is megtalálhatók (Sanai és mtsai 2004, Quinones-Hinojosa és mtsai 2006).



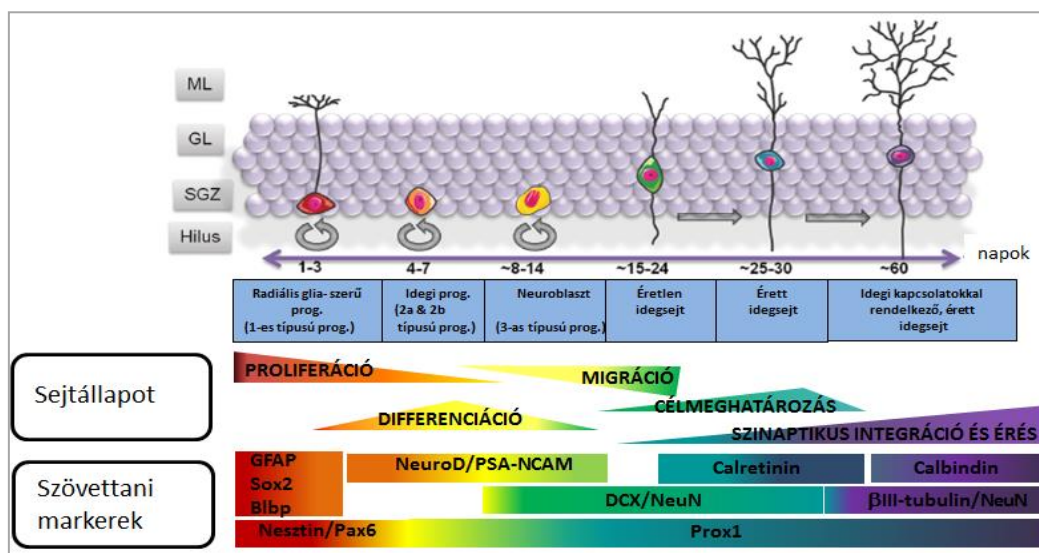
Kriegstein és Alvarez-Buylla 2009

2.Ábra A felnőtt előagyi szubventrikuláris zóna sejtjei

A B sejtek a felnőtt előagyi szubventrikuláris zóna őssejtjei, képesek a szubventrikuláris zóna összes sejtípusának létrehozására. A B sejtekből differenciálódnak a C sejtek, amelyek az intermedier progenitor sejtállapotnak felelnek meg. A C sejtek utódaiból aztán oligodendroglia sejtek vagy idegsejtek differenciálódnak. A szubventrikuláris zóna A sejtjei a nagy migrációs képességgel rendelkező fiatal idegsejtek. A folyamatos nyilak kísérletesen alátámasztott adatokat, a szaggatott nyilak a hipotetikus adatokat jelzik. A nyilak színei a szimmetrikus osztódást (piros) és az asszimmetrikus osztódást (kék) mutatják. oIP: oligodendroglia intermedier progenitor, nIP: neurális intermedier progenitor, VZ: ventrikuláris zóna, SVZ: szubventrikuláris zóna, MA: mantle, vagy intermedier réteg: radiálisan vándorló, differenciálódó sejtek zónája

1.1.2.2. A felnőtt hippocampusz őssejtjei

A másik fő felnőttkori idegsejtképző terület emlősökben a hippocampusz gyrus dentatus-ának szemcsesejt réteg (granuláris réteg) alatti zónája, a szubgranuláris zóna (SGZ) (Altman és Das 1965, Eriksson és mtsai 1998, Kempermann és mtsai 2004). A szubgranuláris zóna elsődleges őssejtjei a radiális asztrociták/radiális glia-szerű progenitorok vagy más néven 1-es típusú progenitorok (3. Ábra) (Fukuda és mtsai 2003, Seri és mtsai 2004, Garcia és mtsai 2004, Steiner és mtsai 2004, Filippov és mtsai 2003, Fukuda és mtsai 2003, Aguilar- Arredondo és mtsai 2015). Az embrionális radiális glia sejtekhez hasonlóan nesztint (Seri és mtsai 2004, Steiner és mtsai 2006) és sox2-t expresszálnak (Kriegstein és Alvarez-Buylla 2009). A radiális asztrociták hosszabb nyúlványukkal átívelik a szemcsesejt réteget, rövidebb nyúlványukkal pedig horizontálisan a szubgranuláris zónában terjeszkednek (Seri és mtsai 2004). Kapcsolatban vannak a hippocampusz érhálózatával, ahonnan őssejt tulajdonságaik fenntartásához szükséges faktorokhoz juthatnak (Palmer és mtsai 2000). Emberben is keletkeznek új idegsejtek a hippocampuszban a születés után. A legújabb eredmények szerint azonban a humán szubgranuláris zóna őssejtjei már gyerekkorban (7 éves kor környékén) elveszítik őssejt tulajdonságaikat és idegsejtképző képességüket (Sorrells és mtsai 2018).



Aguilar-Arredondo és mtsai 2015

3.Ábra A felnőtt rágcsáló hippocampusz gyrus dentatus-ának sejtjei

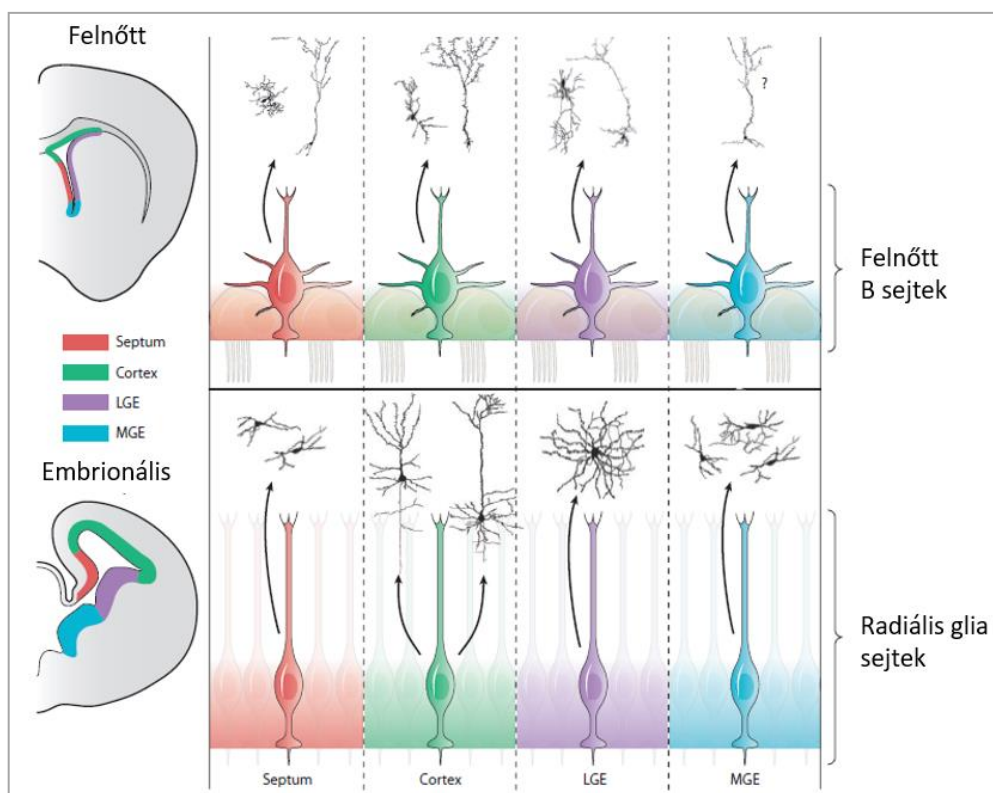
A felnőtt gyrus dentatus-ban keletkező szemcsesejtek a születésüktől számítva nagyjából 60 nap alatt fejlődnek ki és integrálódnak a hippocampus idegsejt hálózatába. A szemcsesejt réteg alatti szubgranuláris zónában elhelyezkedő radiális glia- szerű progenitorokból (1-es típusú progenitorok) idegi progenitorok (2a és 2b típusú progenitor sejtek), majd neuroblasztok (3-as típusú progenitor sejtek) differenciálódnak. Ezt követően megindul az idegsejtek érése és szinaptikus integrációja, az éretlen idegsejtekből érett idegsejtek lesznek, amelyek új szinapszisokat hoznak létre. Az ábra az egyes őssejt/progenitorsejt illetve a fejlődő idegsejt sejttállapotokra jellemző főbb tulajdonságokat (proliferáció, differenciáció, migráció, célmeghatározás, szinaptikus integráció és érés) mutatja. A differenciálódás különböző szakaszában a sejtek más-más szövettani markereket (GFAP, Sox2, BLBP, nestin, Pax6, NeuroD, PSA-NCAM, calretinin, calbindin, DCX, β III tubulin, NeuN, Prox1) expresszálnak.

1.1.2.3 A radiális glia sejtek régióspecifikus génexpressziója

Bár a radiális glia sejtek expresszálnak a fenotípusra általánosan jellemző radiális glia-specifikus (*sox2*, *glial*, *blbp*, *nestin*) géneket, a különböző agyi régiókban keletkező radiális gliasejtekre (4. Ábra) eltérő morfogén kombinációk hatnak, amelyek hatására eltérő transzkripciós faktor mintázat expresszálódik bennük mind az embrionális mind a felnőtt agyban (Campbell 2003, Puelles és Rubenstein 2003, Guillemot 2005, Flames és mtsai 2007, Long és mtsai 2009). In vivo, a régió-specifikus gének expressziója függ a sejtek születési helyétől (Kriegstein és Alvarez- Buylla 2009) azaz, az eltérő agyi régiókban születő sejtek eltérő pozicionális információt hordoznak. A régió szerinti elköteleződés nagyban meghatározza a sejt adhéziós tulajdonságait, és ezzel a sejt vándorlás lehetséges irányait, valamint az őssejtekből alakuló idegsejtek neurotransmitter-fenotípusát (Guillemot 2005, Kriegstein és Alvarez- Buylla 2009). Különösen fontos az idegsejtté történő differenciálódás során a bHLH transzkripciós faktorok (*Mash1*, *Ngn1,2*) jelenléte, amelyeket az úgynevezett proneurális gének kódolnak (Bertrand és mtsai 2002). Ezek a transzkripciós faktorok irányítják az ún. neurális gének expresszióját, amelyek az idegsejtté válás legfontosabb folyamatait szabályozzák: befolyásolják a keletkező idegsejtek migrációját, meghatározzák az idegsejtek fenotípusát (Hand és mtsai 2005, Helms és Johnson 2003, Schuurmans és

mtsai 2004). A ventrális előagyi területek idegsejtjeinek fenotípusát főként a Mash1, a dorzális előagyi területeken keletkező idegsejt-fenotípust pedig a Ngn1, és Ngn 2 transzkripciós faktorok szabják meg (Guillemot 2007).

A fejlődést meghatározó transzkripciós faktor mintázatok idővel folyamatosan változnak (Desai és McConnell 2000, Shen és mtsai 2006). Így nem csak a lokalizáció, de a keletkezés időpontja is megszabja, hogy milyen idegsejtek vagy gliasejtek alakulnak ki. Általánosságban jellemző, hogy a kortikális vetítő idegsejtek keletkeznek a fejlődés korai szakaszában, míg az interneuronok később jönnek létre (Kriegstein és Alvarez-Buylla 2009).

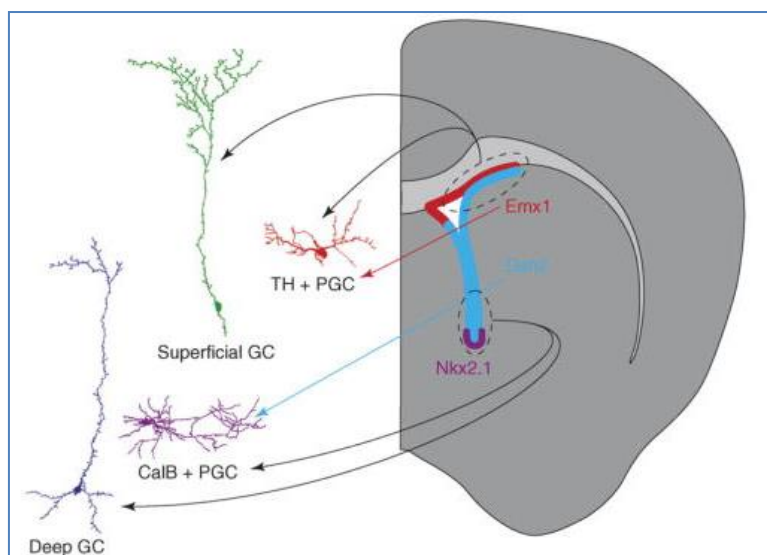


Kriegstein és Alvarez-Buylla 2009

4.Ábra Az embrionális és a felnőtt őssejt/progenitorsejt régióspecifikus mintázata. A bal oldalon az embrionális és a felnőtt egér előagy keresztmetszete látható, a különböző színek az egyes génexpressziós területeket mutatják. A jobb oldalon az embrionális radiális glia sejtek és a felnőtt B sejtek láthatók a főbb előagyi területeken (septum, cortex, LGE, MGE). Az, hogy az idegsejt melyik régióban lévő őssejtből keletkezik meghatározza fenotípusát. A camera lucida reprezentációkon jól látszik, hogy a származás meghatározza az idegsejtek morfológiáját. Az embrionális dorzális

régióban lévő radiális glia sejtekből például a nagy piramissejtek keletkeznek. A felnőtt agyban ugyanennek a területnek az őssejtjei a szaglógumó interneuronjait hozzák létre. LGE: lateral ganglionic eminence, laterális gangliondomb, MGE: medial ganglionic eminence, mediális gangliondomb

A felnőtt egér előagyi szubventrikuláris zóna eltérő területein lévő B sejtek helyfüggő génexpressziós mintázattal rendelkeznek hasonlóan az embrionális radiális glia sejtekhez (4. Ábra, 5. Ábra), amelyekből közvetlenül származtathatók (Merkle és mtsai 2004). Valószínűsíthető, hogy az embrionális radiális glia sejtek B sejtekké való átalakulásuk során nem vándorolnak tangenciálisan, hanem megtartják regionális pozíciójukat (Stenman és mtsai 2003, Kohwi és mtsai 2005, Waclaw és mtsai 2006, Young és mtsai 2007). A vizsgálatok azt mutatják, hogy a szaglógumó (olfactory bulb) calbindin-pozitív periglomeruláris sejtei főként a felnőtt előagyi SVZ ventrolaterális területeiről, míg a calretinin-pozitív periglomeruláris sejtek inkább a dorzális SVZ területekről származnak (Merkle és mtsai 2004, Young és mtsai 2007). A szaglógumó granulás sejtejei a ventrális és a dorzális előagyi SVZ területekről is származhatnak (Merkle és mtsai 2004, Lledo és mtsai 2008). Az, hogy a periglomeruláris és a granulás sejt melyik SVZ területről származik meghatározza a keletkezett idegsejtek dendritfájának elágazás-mintázatát és neurotranszmitter fenotípusát, illetve Ca-kötő fehérje tartalmát is (5. Ábra) (Kelsch és mtsai 2007).



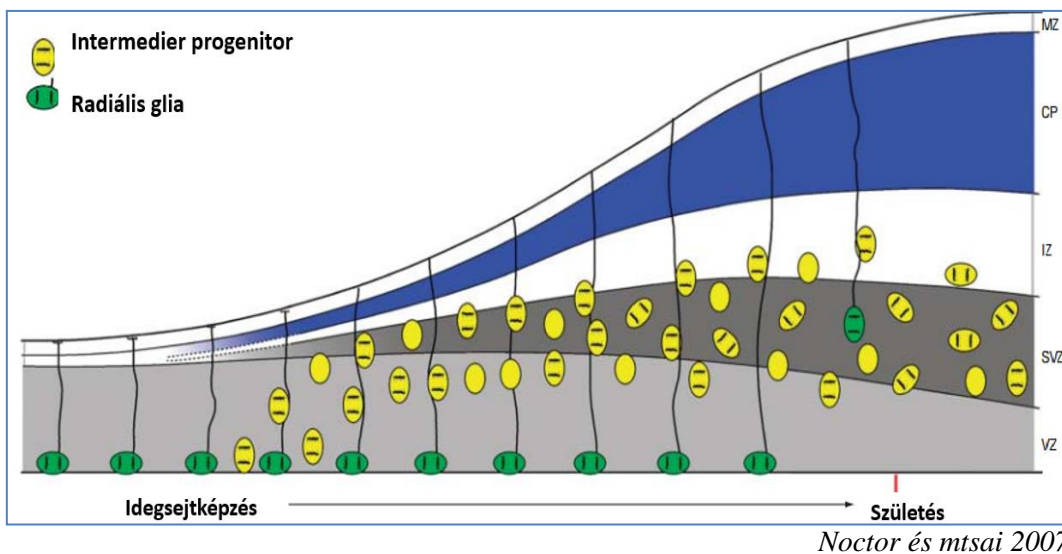
Lledo és mtsai 2008

5.Ábra A felnőtt egér előagyi szubventrikuláris zóna régióspecifikus mintázata

A bal oldalon a szaglógumó különböző, Emx1-et, Gsh2-t és Nkx2.1-et expresszáló dorzális sejtekből származó idegsejtjeinek morfológiája látható. A dorzális SVZ B Emx1⁺sejtjéből főként a szaglógumó szuperficiális granuláris sejtjei és a TH⁺ periglomeruláris sejtjei alakulnak. A ventrális szubventrikuláris zónában lévő, Nkx2.1-et és Gsh-t expresszáló B sejtekből a szaglógumó mélyebb rétegi granuláris sejtjei és a calbindin⁺ periglomeruláris sejtjei keletkeznek. Néhány kísérlet azt mutatja, hogy a Gsh-t expresszáló sejtekből keletkeznek a calbindin⁺ periglomeruláris sejtjei is. GC: glomerular cell, glomeruláris sejt, PGC: preglomerular cell, periglomeruláris sejt, CalB+: calbindin pozitív; TH⁺: tirozinhidroxiláz pozitív

1.1.3. Intermedier progenitorok/ köztes sokszorozó sejtek

Mind az embrionális, mind a felnőtt radiális glia sejtek aszimmetrikus osztódása során az esetek többségében létrejön egy olyan köztes sejtípus, amely egy meghatározott idegszöveti fejlődés irányába már elkötelezett (idegsejt intermedier progenitor, oligodendroglia intermedier progenitor, asztroglia intermedier progenitor), de még osztódóképes (1. Ábra, 6. Ábra). Ezeket a sejteket nevezzük intermedier progenitoroknak, bazális progenitoroknak vagy köztes sokszorozó sejteknek. Ezek a sejtek szimmetrikusan osztódva felszaporítják az adott progenitor-populációt, majd fokozatos érés után ugyancsak szimmetrikus mitózissal két már nem osztódó, végdifferenciálódásra képes sejtet hoznak létre (Haubensak és mtsai 2004, Miyata és mtsai 2004, Noctor és mtsai 2004, Noctor és mtsai 2007). Bár az intermedier progenitorok a radiális glia sejtek leszármazottai, ezek már nem létesítenek kapcsolatot sem a piális, sem a ventrikuláris felszínnel (Haubensak és mtsai 2004, Noctor és mtsai 2008). Teljes terjedelmükben a kamrát közvetlenül határoló ependima sejtréteg felett, a szubventrikuláris zónában (SVZ) helyezkednek el (6. Ábra). Nem figyelhető meg bennük interkinetikus magvándorlás sem (Haubensak és mtsai 2004, Miyata és mtsai 2004, Noctor és mtsai 2004).



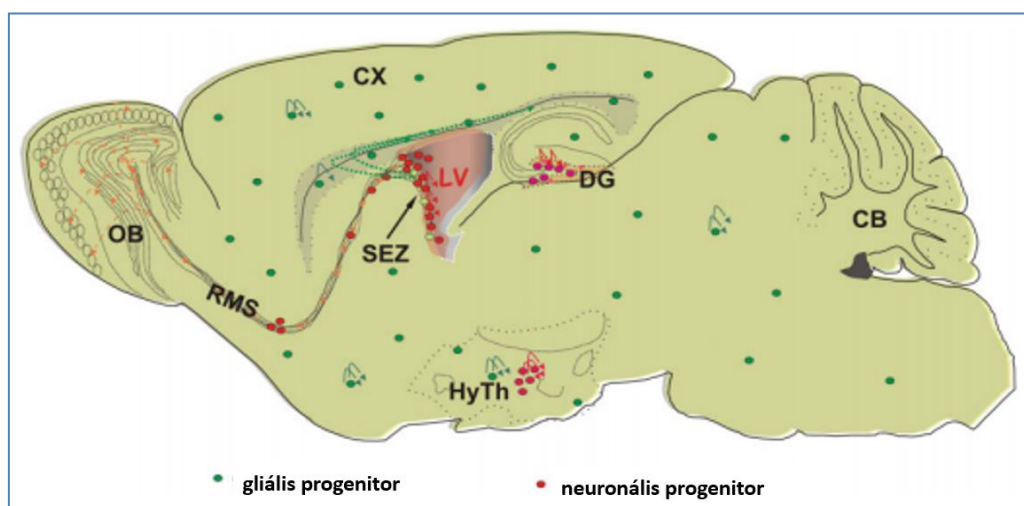
6.Ábra A radiális glia sejtek és az intermedier progenitorok elhelyezkedése a fejlődő agykéregben.

A radiális glia sejtek (zöld) a ventrikuláris zónában találhatóak. A radiális glia sejtek aszimmetrikus osztódása során létrejövő intermedier progenitor sejtek (sárga) elhagyják a ventrikuláris zónát és kialakítják a szubventrikuláris zónát. Az intermedier progenitorok nagyrészt itt a szubventrikuláris zónában osztódnak, nem létesítenek kapcsolatot sem a piális, sem a ventrikuláris felszínnel. A szimmetrikus osztódásaik során létrejövő idegsejtek alakítják és vastagítják az elő-agykéreg (cortical plate) területét. Vz: ventrikuláris zóna, SVZ: szubventrikuláris zóna, IZ: intermedier zóna, MZ: marginális zóna.

A felnőtt előagyi szubventrikuláris zóna intermedier progenitor sejtjei az ún. C sejtek, amelyek szimmetrikus osztódás során két éretlen idegsejtet (A sejtek) vagy két éretlen oligodendroglia sejtet hoznak létre (2. Ábra) (Doetsch és mtsai 1999, Kriegstein és Alvarez- Buylla 2009).

A felnőtt hippocampus szubgranuláris zónájának intermedier progenitor sejtjei a D sejtek vagy 2-es típusú progenitorok (Seki és Arai 1993, Seri és mtsai 2004, Filippov és mtsai 2003, Fukuda és mtsai 2003). Ezeknek a progenitor sejteknek több differenciációs állapotát különböztetjük meg, amelyeket a különböző markerek (doublecortin, PSA-NCAM, NeuroD, Prox1, NeuN) expressziója jelez (3. Ábra) (Seki és Arai 1993, Seri és mtsai 2004, Fukuda és mtsai 2003, Aguilar Arredondo és mtsai 2015).

Nem csak a neurogén zónákban, de a felnőtt agy számos egyéb területén is előfordulnak in vivo progenitor tulajdonságokkal rendelkező sejtek (7. Ábra). A striatum-ban, a hipofízisben, a hypothalamuszban, a középagyban és a kéregben is leírtak már progenitor jellegű sejteket (Luzzati és mtsai 2007, Ponti és mtsai 2010, Maggi és mtsai 2015, Cheung és mtsai 2017, Youngblood és mtsai 2018, Farzanehfar és mtsai 2017, Ahlfeld és mtsai 2017). Costa és munkatársai kimutatták, hogy a nagyagykéreg marginális zónájában is keletkeznek idegsejtek és oligodendroglia sejtek (Costa és mtsai 2007). Götz és Ninkovic szerint a felnőtt agyban csak az idegsejtek keletkezésének a helye korlátozódik 3 agyterületre: az előagyi oldalkamrák szubventrikuláris zónájára, a hippocampus gyrus dentatus-ának szubgranuláris zónájára és a hypothalamusz progenitor sejtjeire. Azonban gliasejtek számos területen keletkeznek a felnőtt agyszövetben (7. Ábra) (Ninkovic és Götz 2013).



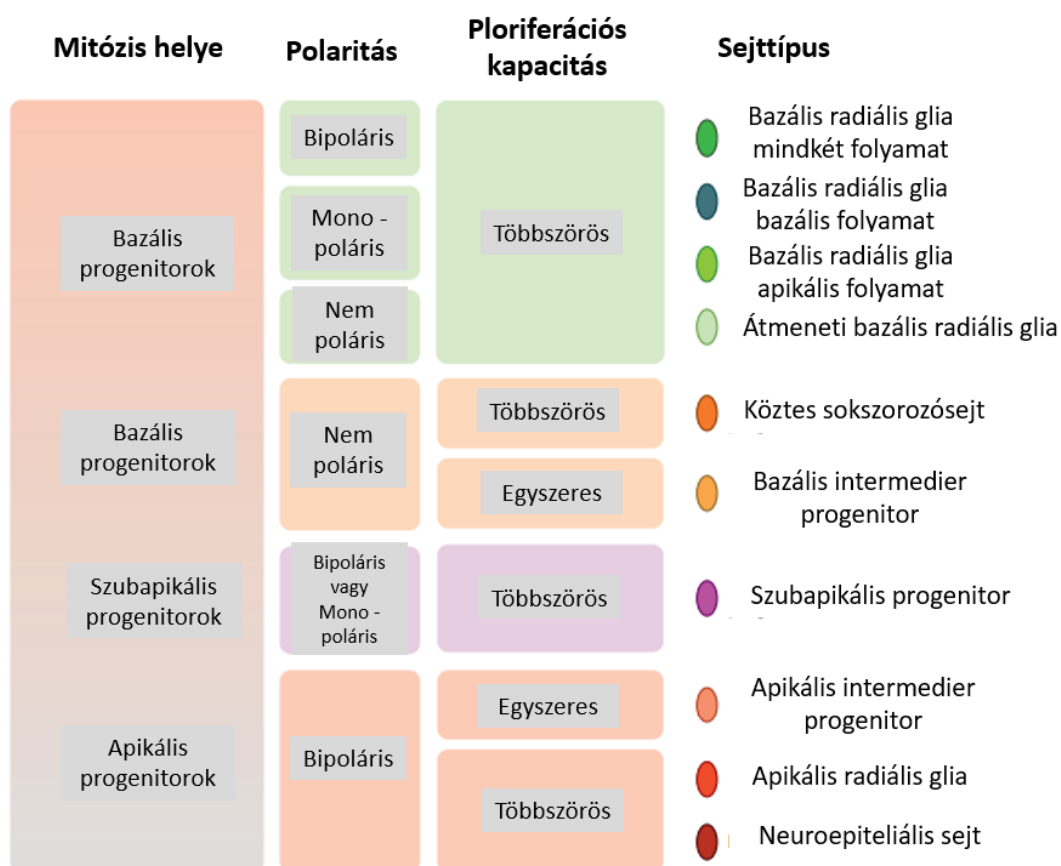
(Ninkovic és Götz 2013)

7.Ábra. Idegsejtképzés és gliasejtképzés a felnőtt agyban

A piros pontok a felnőtt egéragy neurogén, a zöld pontok a gliogén területeit mutatják. Az idegsejtképző progenitorok (piros) csak három agyterületre korlátozódnak: az előagyi szubventrikuláris vagy szubependymális zóna (SEZ), a hippocampus gyrus dentatus-a (DG) és a hypothalamus (HyTh). Gliális progenitorok (zöld) azonban számos agyterületen előfordulnak. OB: olfactory bulb, szaglógumó; RMS: rostral migratory stream, rostrális migrációs ösvény; CX: cortex, agykéreg; CB: cerebellum, kisagy

1.2. Az idegi őssejtek/progenitorsejtek csoportosítása

Az idegi őssejtek/progenitorsejtek változatossága miatt nagyon nehéz őket csoportosítani. Számos kutatócsoport megpróbált olyan génextpressziós mintázatot találni, amely megkönnyíti az egyes őssejtek, progenitorsejtek csoportba sorolását (Zhang és Jiao 2015, Dulken és mtsai 2017). Azonban in vivo a génextpressziós mintázatok vizsgálata nagyon nehéz, in vitro pedig egyes gének expressziója változhat az in vivo állapothoz képest. Taverna, Götz és Huttner kidolgoztak egy új szempontrendszer az idegi őssejtek/progenitorsejtek csoportosítására, amely figyelmen kívül hagyja a gének expresszióját (Huttner és mtsai 2014). Az ő csoportosításukat, amely az őssejtek/progenitorsejtek 3 tulajdonságát veszi alapul a 8. ábra mutatja.



8. Ábra Az idegi őssejtek/progenitorsejtek csoportosítása Huttner és munkatársai szerint

Az első csoportosítási szempont a mitózis helye. Az apikális progenitorok sejtestje a kamrafelszínhez közel található a mitózis során. A bazális progenitorok sejtestje alkotja a szubventrikuláris zónát, tehát a mitózis ebben az esetben a kamrafelszíntől bazálisan

zajlik. A harmadik csoport a szubapikális progenitorok tartoznak, amelyek kapcsolatban vannak az agykamrával, de sejttestjük a mitózis során távol van a ventrikuláris felszíntől.

A második csoportosítási szempont a sejtek polaritása. A bipoláris sejtek apiko-bazális polaritást mutatnak, rendelkeznek apikális és bazális nyúlvánnyal is. A monopoláris sejtek nem mutatnak apiko-bazális polaritást, hiányzik az apikális nyúlványuk. A nonpoláris sejtek pedig sok kisebb nyúlvánnyal rendelkeznek, szintén nem mutatnak polaritást.

A harmadik csoportosítási szempont a proliferációs kapacitás. Bizonyos sejtek több sejtosztódási cikluson mennek keresztül (multiple), más sejtek csak egyszer osztódnak (single).

1.3. Idegi őssejtek/progenitorsejtek in vitro

Az idegi őssejtek és progenitorsejtek in vivo egy ma még nem tisztázott mikro környezetben ún. „őssejt niche”-ben tudják fenntartani őssejt tulajdonságaikat. Ezt, vagy ehhez hasonló in vitro mikro környezetet megteremteni nagyon nehéz, már lassan 20 éve próbálják a kutatók optimalizálni a tenyésztési körülményeket az őssejtek számára (Conti és Cattaneo 2010). Hosszú távon fenntartható idegi őssejt/progenitorsejt tenyészetéről akkor beszélhetünk, ha a tenyésztés során teljesülnek a következő kritériumok: hatékonyság (a sejt kultúra sejtösszetétele legalább 10 átültetésen keresztül nem változik), klonalitás (a sejt kultúra összes sejtje egyetlen sejt leszármazottja), a kromoszómaszám stabilitása (a kromoszómaszám állandó marad többszöri osztódás után is), idegsejtképző potenciál megtartása (a sejtek idegsejtképző képessége az idővel nem csökken) (Conti és Cattaneo 2010).

Az elmúlt 30-40 év során csak transzformációval immortalizált idegsejtek (Bartlett és Mtsai 1988) illetve transzgenikus állatokból származó, korlátlanul osztódó idegi sejtklónok (Schlett és Madarász 1997) létrehozásával juthattunk hozzá hosszútávon fenntartható és in vitro vizsgálható homogén idegi őssejt populációkhoz. A közelmúltig, „vad típusú” idegi őssejt tenyészetekként az ún. neurosphere-modellt használták, melyben a sejtek úszó aggregátumok formájában tarthatók fent (Reynolds és Weiss 1992). A „neurosphere”-ek azonban heterogén sejtösszetételűek, és klonális eredetük is megkérdőjelezhető (Jensen és Parmar 2006). Cattaneo-nak és munkacsoportjának sikerült először adherens idegi őssejt kultúrákat létrehozni és fenntartani definiált

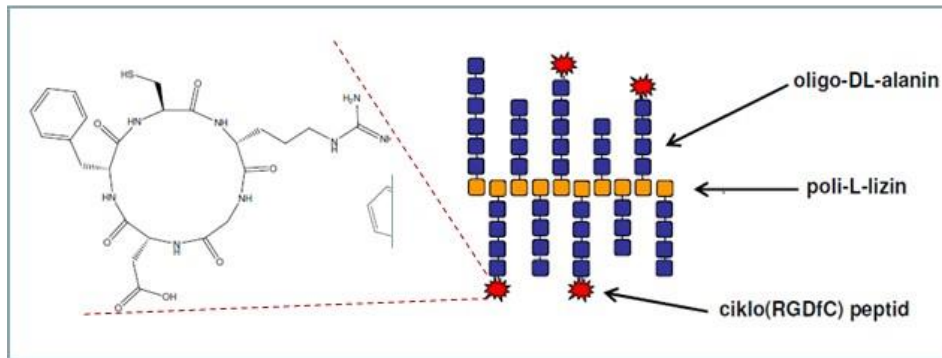
körülmények között, EGF és FGF jelenlétében. A hosszadalmas izolálási eljárással nyert letapadt ún. NS (neural stem, lásd 1. Táblázat) tenyészetek, azonban könnyen leválnak az aljzatról és neurosphere-szerű aggregátumokba tömörülnek (Conti és mtsai 2005). Az 1. táblázat néhány, irodalomból ismert in vitro idegi őssejt-preparátum összehasonlító adatait mutatja. A sejt vonalak fáradságos izolálása és fenntartása, a feno/genotípus változékonysága és a tumoros transzformáció veszélye jelentősen nehezíti az egyes idegi őssejtpopulációk in vivo viszonyokra is extrapolálható elemzését.

1. Táblázat Néhány in vitro fenntartott idegi őssejt-preparátum adatai (Conti és Cattaneo 2010)

	Származás	Létrehozás éve	Eredet	Növekedés	Növekedési faktor igény	Hosszú távú tenyésztés	A sejt kultúra tisztasága	Idegsejtképző potenciál	Klonáltság	Lefagyaszthatóság	Tumorképző potenciál
ESC	Magzati és felnőtt szövetek	1981	Humán és egér	Monolayer	Humán: ACTIVIN/NODAL és FGF2 Egér: LIF és BMP	Igen	>95%	Igen	Klonális	Igen	Teratómák
iPSC	Blasztociszta	2006	Humán és egér	Monolayer	Humán: ACTIVIN/NODAL és FGF2 Egér: LIF és BMP	Igen	>95%	Igen	Klonális	Igen	Teratómák
Primitív NEP	ESC	2001	Egér	Sphere	LIF	Nem	NA	NA	Klonális	Nem	NA
korai NEP	ESC és iPSC	2009	Humán és egér	Monolayer	SHH és SB43125	Nem	80%	NA	NA	Nem	NA
R- NSC	ESC és magzati idegszövet	2008	Humán és egér	Monolayer	Notch és SHH	NA	90%	Igen	Klonális	NA	Túlnövés
It-h ESNSC	ESC	2009	Humán	Monolayer	EGF és FGF2	Igen	>95%	Igen	Klonális	Igen	Nem detektált
RG	ESC	2004	Egér	Monolayer	NA	Nem	85-90%	NA	NA	Igen	Nem detektált
NS sejt	ESC, magzati és felnőtt idegszövet	2005	Humán, egér, patkány	Monolayer	EGF és FGF2	Igen	>95%	Igen	Klonális	Igen	Nem detektált
késői NSC	ESC és magzati idegszövet	1992	Humán, egér, patkány	Sphere	FGF2 és/vagy EGF	Igen	1%	Igen*	Klonális vagy klonális denzitás	Igen	Nem detektált
felnőtt SVZ NSC	Felnőtt SVZ	1992	Humán, egér, patkány	Sphere	FGF2 és/vagy EGF	Igen	1%	Igen*	Klonális vagy klonális denzitás	Igen	Nem detektált
Felnőtt HI NSC	Felnőtt hipposampusz	1997	Humán, egér, patkány	Sphere és monolayer	FGF2 és/vagy EGF	Igen	~85%	Igen*	Klonális vagy klonális denzitás	Igen	Nem detektált

A-gal jelölt témában a publikációk nem következtetések. A klonális denzitás arra utal, hogy a sejtek 10-1000 sejt/μl sűrűségben higíthatók a klónozás során.*

Laboratóriumunkban az ELTE-MTA Peptidkémiai kutatócsoportjával végzett kollaboráció keretében sikerült egy olyan speciális ciklusos szerkeztű peptid-konjugátumot [AK-ciklo(RGDfC)] (9. ábra) (Markó és mtsai, 2008) szintetizálni, amelyhez radiális glia sajátságú sejtek nagy adhezivitással kötődnek.



9. ábra. Az AK-ciklo(RGDfC) peptid-konjugátum szerkezete.

A peptid a tenyésztő aljzatokhoz jól tapadó hosszú (> 70 tagú) polilizin lánc minden 2.-3. lizinmolekulájához kötött 3-6-tagú alanin oldalláncot tartalmaz. Az alanin-láncok végén egy 5 aminosavból (Arginin [R]- Glicin [G]- Aszparaginsav [A]- D-fenilalanin [f]- Cisztein [C]) álló peptidciklus található, amely integrin típusú sejt felszíni molekulákhoz, elsősorban az $\alpha\beta3$ és $\alpha\beta6$ integrin-komplexhez erős kötődést mutat (Markó PhD dolgozat 2014). Az [AK-ciklo (RGDfC)] peptidkonjugátummal fedett aljzaton összejt jellegű sejtek szérumban hiányában is képesek osztozni (Markó és mtsai, 2008). A peptid-konjugátummal borított tenyésztő aljzaton sikerült az idegi összejtek homogén populációit hosszú távon fenntartani szérumban, kémiaiilag definiált környezetben, adherens monolayerben (Markó és mtsai 2011).

1.3.1 Idegi összejtek/progenitorsejtek in vitro tenyésztéseinek klinikai felhasználása

Az idegi összejtek/progenitorsejtek in vitro tenyésztési eljárásának kidolgozása a klinikai alkalmazás miatt is nagy jelentőséggel bír. Jelenleg azonban a számos tenyésztési eljárás ellenére sem áll rendelkezésre olyan in vitro rendszer, amely a klinikai kísérletekhez megfelelő biztonsággal és hatékonysággal alkalmazható idegi összejtmódelleket biztosíthatna (Casarosa és mtsai 2014). Rengeteg állatkísérlet (Zádori és mtsai 2011, Hosseini és mtsai 2018, Huang és mtsai 2018) és nagyjából 27 nyitott klinikai kísérlet (<http://www.clinicaltrial.gov/>) létezik az idegi összejtek/progenitorsejtek idegszöveti integrációjára (Casarosa és mtsai 2014). Ezekben a klinikai kísérletekben

sokszor allogén főtális idegi őssejteket használnak, amelyeket neurosphere sejt kultúrákban tenyésztenek (Tamaki és mtsai 2002). Néhány esetben sikerült bizonyítani a beültetett sejtek megtapadását, migrációját és hosszú távú túlélését (Selden és mtsai 2013), de jelenleg idegrendszeri betegségek gyógyításában nem támogatott az őssejtek használata (Lindvall és Kokaia 2010, Casarosa és mtsai 2014).

A klinikai sejt felhasználás jelenlegi legnagyobb hiányossága, hogy egyrészt, nem ismertek a sejteket befogadó in vivo mikrokörnyezet pontos paraméterei, másrészt, nem ismerjük kellőképpen a széles fejlődési potenciálú ős/progenitor sejtek lehetséges válaszait az adott környezeti hatásokra

1.4. Idegsejt előalakok migrációja

Az idegszövet szervződésének és az egyes sejtek idegsejtté történő differenciálódásának meghatározó folyamatai a sejtek születési és végső letelepedési helye közötti vándorlás alatt zajlanak. A fejlődő sejtek születési helyüktől és a születésük idejétől függően rövidebb vagy hosszabb útvonalon vándorolnak rendeltetési helyükre, majd alakítanak ki idegsejt hálózatokat vagy integrálódnak a már meglévő idegsejt hálózatokba (1. Ábra) (Kriegstein és Alvarez-Buylla 2009). Az embrionális agyszövetben az idegsejt előalakok a radiális glia sejtek nyúlványai mentén vándorolnak a megfelelő agykérgi rétegekbe (Rakic 1972, Nomura és mtsai 2008). A felnőtt előagyi szubventrikuláris zónában keletkező idegsejt előalakok, az A sejtek (2. Ábra) a működő agyszövettől elzártan, egy speciális mikrokörnyezetben (Yuan és mtsai 2015) csoportosan (ún. láncmigrációval) vándorolnak a rostrális migrációs ösvényen keresztül a szaglógumóba, ahol granuláris és periglomeruláris interneuronokká differenciálódnak (Lois és Alvarez-Buylla 1994, Doetsch és mtsai 1997, Beluzzi és mtsai 2003, Carleton és mtsai 2003). A felnőtt hippocampusz neuroblasztjai (3. Ábra), éretlen idegsejtjei egyenként vándorolnak a közeli szemcsesejt rétegbe (Nakahira és Yuasa 2005, Seki és mtsai 2014).

A migráció irányát, kinetikáját a sejtvezeték dinamikájának és a sejt környezetének (szomszédos sejtek és extracelluláris mátrix által biztosított letapadási felszín; trofikus faktorok; intracelluláris ion-háztartást befolyásoló hatások) kölcsönhatása határozza meg (Te Boekhorst és mtsai 2016). A sejt plazma áramlása és a sejtvezeték húzóereje miatt a sejten folyamatosan membrán kitüremkedések keletkeznek. Ezek hordozzák a sejt

jellemző adhéziós receptor mintázatot és mint egy szenzor folyamatosan „letapogatják” a sejt környezetét (Goudarzi és mtsai 2012, Paluch és Raz 2013). Ha a sejt membrán kitüremkedései a rajtuk lévő adhéziós receptornak megfelelő ligandummal találkoznak kialakul a receptor-ligandum kapcsolat, majd egyre több adhéziós molekula épül be és létrejön az ún. adhéziós folt. A sejt aktin-miozin mikrofilamentum rendszere az adhéziós foltot a sejt belseje felé húzza (Gardel és mtsai 2008). Ha a receptor-ligandum kapcsolat elég erős, akkor nem szakad fel az adhéziós folt, hanem a sejt súlypontja áttolódik a rögzített felület felé (Roca-Cusachs és mtsai 2013, Paluch és Raz 2013, Case és mtsai 2015). Adott helyen egyre több adhéziós folt alakul ki, amely több húzóerőt generál, kialakul a „vezető él” (lamellipodium, filopodium, lobopodium) és a sejt elmozdul a stabil letapadást nyújtó felszín felé (Pollard és Borisy 2003, Bergert és mtsai 2012, Balcioglu és mtsai 2015, Swaminathan és mtsai 2016, Te Boekhorst és mtsai 2016). A progenitor sejtek és idegsejt-előalakok adhéziós kapcsolatrendszere és belső motilitása jelentős sejt-elmozdulást tesz lehetővé. A gazdag nyúlványrendszerrel rendelkező idegsejtek fődendritjei és axon kiindulási pontjai stabilan rögzülnek. A környezethez rögzített fő-nyúlványok és a citoplazma nyúlványok osztottsága lehetetlenné teszi az idegsejtek migrációját, érett idegsejtek nem vándorolnak (Chang és mtsai 2015).

1.5. A depolarizáció hatása az idegi fejlődésre

A sejt-vándorlást lehetővé tevő mikrofilamentum-működést alapvetően szabályozza a sejten belül pillanatról pillanatra változó ion- (elsősorban Ca^{2+} és Mg^{+}) eloszlás. Az in vivo fejlődés során a sejteket rengeteg ion-eloszlást befolyásoló hatás éri. Az intracelluláris ion-eloszlás fontos szerepet játszik az idegi differenciációban az őssejtek proliferációjától kezdve az idegsejt előalakok keletkezésén és migrációján keresztül az új idegsejtek szöveti integrációjáig.

Az extracelluláris mátrix növekedési faktorai, a szinaptikusan vagy parakrin módon ható neurotranszmitterek, valamint az agyszövetben terjedő bioelektromos szignálok is jelentős ion-eltolódásokat váltanak ki (Spitzer 2006; Flavell és Greenberg 2008; Song és mtsai, 2012; Suárez és mtsai, 2014; Luhmann és mtsai, 2016). Az embrionális fejlődés során a parakrin módon ható GABA az egyik legfontosabb depolarizáló hatású faktor az idegi őssejtekre/ progenitorsejtekre nézve (Maric és mtsai 2001, Benítez-Díaz és mtsai, 2003; Jelíai és Madarasz, 2005; Song és mtsai., 2012). A GABA a fiatal SVZ-

ben (Loturco 1996) és felnőtt hipokampuszban egyaránt csökkenti az idegi őssejtek proliferációját, míg több vándorló progenitor migrációs aktivitását fokozza (Bolteus és Bordey 2004). A GABA a korai és felnőttkori idegi őssejteket is depolarizálja a GABA_A receptorokon keresztül történő Cl⁻ ion kivándorlás miatt (Tozuka és mtsai 2005). Ezzel – első sorban - a feszültségfüggő Ca-csatornák nyitásával képes változtatni a lokális intracelluláris Ca-szintet. A fejlődő velőcsőben gap junction-okon keresztül terjedő spontán Ca⁺⁺ oszcillációk (O'Donovan, 1999) és az idegi hálózatokat kialakító nagy depolarizáló hullámok (giant depolarization potential/GDP) (Ben-Ari 2001) mind kation áramok hatásán keresztül befolyásolják az idegszövet fejlődését. A depolarizáló hatás számos módon érheti a sejtet: feszültségfüggő vagy ligandumfüggő ioncsatornákon beáramló kationokon keresztül, vagy az intracelluláris raktárakból történő Ca²⁺ felszabadulásával (Bolteus és Bordey 2004).

A depolarizáció hatása függ az adott sejt aktuális fejlődési állapotától, sajátosságaitól. Az osztódó embrionális radiális glia sejtekben az intracelluláris Ca⁺⁺ oszcillációk befolyásolják a sejtciklust és szabályozzák az osztódás ütemét (Weissmann és mtsai 2004). A felnőtt szubventrikuláris zóna őssejtjeinek proliferációját gátolja a GABA depolarizáló hatása (Liu és mtsai 2005). A migráló neuroblasztokban az intracelluláris Ca²⁺ szint szabályozza a lamellipodium kialakulását és a sejtváz által kifejtett húzóerőt (Madarász 2013). A GABA befolyásolja a felnőttkori szubventrikuláris zónában keletkező és a rostrális migrációs ösvényen vándorló idegsejt előalakok migrációját (Bolteus és mtsai 2004). A fejlődő idegsejt előalakokban az intracelluláris Ca²⁺ szint megváltozása befolyásolja az axon növekedését és az axon-növekedés irányát is (Gomez és mtsai 2001, Henley és Poo 2004). A bioelektromos aktivitás az idegsejtek neurotranszmitter fenotípusát is befolyásolhatja. Xenopus embrióban kimutatták, hogy a Ca²⁺spike-ok mennyiségének csökkenésével nő a serkentő neurotranszmittert expresszáló idegsejtek száma, a gátló neurotranszmittert expresszálóké pedig csökken (Borodinsky és mtsai, 2004).

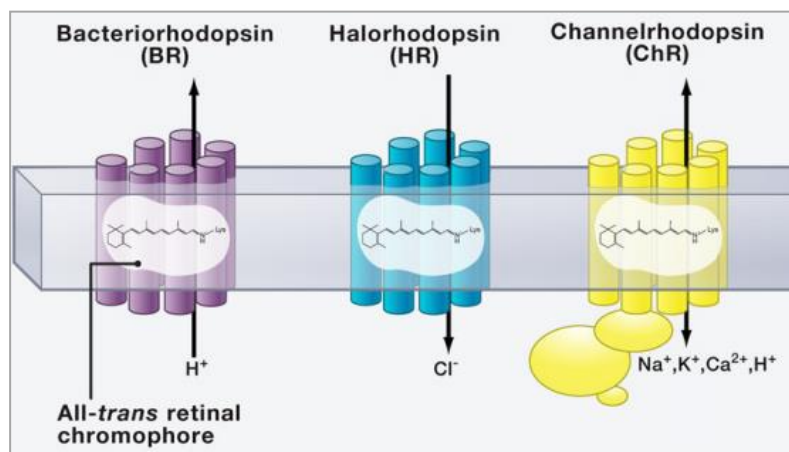
A depolarizáció és a bioelektromos aktivitás a felnőtt korban keletkező éretlen idegsejteknek nélkülözhetetlen a már meglévő ideghálózatba való integrálódáshoz (Spitzer 2006). A felnőtt hipokampuszban keletkező éretlen szemcsesejtek GABAergic depolarizációja szükséges a dendritrendszer fejlődéséhez és a szinapszisok kialakításához (Ge és mtsai, 2006). A perifériáról érkező ingerek, azaz az idegszöveti

aktivitás fokozódása (pl.: környezetgazdagítás hatására) szignifikánsan növeli a posztnatálisan keletkezett idegsejtek integrációját a hippocampális neuronhálózatba (Bergami és mtsai 2015). Több kutatócsoport is igazolta, hogy a perifériás szenzoros aktivitás és a tanulás elősegíti a felnőtt előagy szubventrikuláris zónában keletkezett idegsejtek integrációját is a szaglógumó neuronhálózatába (Hanson és mtsai 2017).

Az ősz/progenitor sejtek ioneloszlás változásait és az általuk kiváltott sejtválaszokat a központi idegszövet komplex rendszerében szinte lehetetlen vizsgálni. Az *in vitro* vizsgálatokhoz viszont hosszú ideig nem állt rendelkezésre olyan módszer, amellyel statisztikailag értelmezhető számú őssejtet lehetett volna sejtkárosodások nélkül elemezni. A fényel nyitható/zárható ioncsatornák (Nagel Deisseroth, 2002) biztosítottak olyan eszközt, amellyel az ionáramlást nagyszámú sejtben, nem invazív módon, *in vitro* is lehet mesterségesen szabályozni, és ezáltal, az ionos stimuláció hatásait közvetlenül elemezni.

1.5.1 Fényérzékeny ioncsatornák

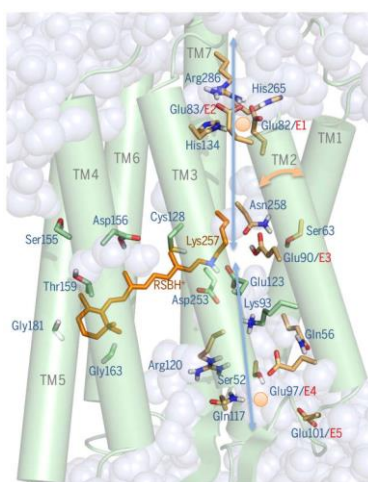
A bacteriorhodopszin (BR) volt az első olyan transzmembrán fehérje, amelyről kimutatták, hogy fény hatására protonokat juttat át a sejtmembránon (Oesterheld és mtsai 1971). Nem sokkal később leírták a halorhodopszint is, amely egy ionpumpa, és megvilágítás esetén Cl^- -kat juttat a sejtbe ATP felhasználásával (Matsuno-Yagi és Mukohata 1977, Schobert és Lanyi 1982, Bamberg és mtsai. 1984) (10. Ábra).



10.Ábra I-es típusú mikrobiális rhodopszinok (Zhang és mtsai 2011).

A channelrhodopszin fényérzékeny ioncsatornákat (channelrhodopszin-1 [ChR1] és channelrhodopszin-2[ChR2]) a *Chlamydomonas reinhardtii* egysejtű zöld algában

azonosították először (Nagel és mtsai. 2002, Nagel és mtsai 2003). Emlős idegsejtekben expresszálatva ezeket a gyors kinetikájú fényérzékeny ioncsatornákat lehetővé vált az idegsejtek kék fényvel történő non-invazív ingerlése (Byden és mtsai 2005, Li és mtsai 2005), amely számos neurobiológiai vizsgálat előtt nyitotta meg az utat (Cardin és mtsai 2010, Yizhar és mtsai. 2011, Desai és mtsai 2011, Makino és mtsai 2015, Shemesh és mtsai 2017, Afshar Saber és mtsai. 2018). Nem csak a neurobiológiában, hanem más egyéb területen is kiváló eredmények születnek a fényérzékeny ioncsatornák alkalmazásával (Ambrosi és mtsai 2014, Wu és mtsai 2016).



11. Ábra A channelrhodopszin molekula kristályszerkezete (Deisseroth és Hegemann 2018)

Mivel a channelrhodopszin-2 ioncsatorna emlős sejtekben hatékonyabban expresszálódik, mint a channelrhodopszin-1 molekula (Boyden és mtsai. 2005), kísérleteinkben a channelrhodopszin-2 egyik változatát (ChR2[H134R]) használtuk. A channelrhodopszin-2 ioncsatorna a rhodopsin molekulacsaládba tartozik, amelynek tagjai 7transzmembrán fehérjék (11. Ábra). A fehérje kofaktora a retinal, egy A vitamin származék. Megfelelő hullámhosszúságú (470nm) fényvel történő megvilágítás során a retinal all transz izomerje a fotonok abszorpcióját követően 13-cisz konfigurációt vesz fel, amely konformációváltozást okoz a fehérjében és átjárhatóvá válik az ioncsatorna a kationok számára (Zhang és mtsai 2011, Yizhar és mtsai 2011). A sejtbe beáramló kationok a Na^+ mellett H^+ K^+ és Ca^{2+} is lehetnek (Nagel és mtsai 2003, Tsunoda és Hegemann 2009). A channelrhodopszin-2 molekula Na^+ konduktanciáját egyetlen pontmutációval (egy hisztidin aminosavat argininre cseréltek [ChR2H134R]) kétszeresére sikerült növelni (Gradinaru és mtsai 2007, Nagel és mtsai 2005).

Egy másik mutációval (CatCh) 3-szorosára lehetett növelni a channelrhodopszin-2 ioncsatornán beáramló Ca^{2+} -ok mennyiségét a vad típusú channelrhodopszin-2 molekulához képest (12. Ábra) (Kleinlogel és mtsai. 2011). A channelrhodopszin-1 és a channelrhodopszin-2 molekulák ötvözésével létrehozott kimérák inaktivációs ideje és expressziójának mértéke változtatható, attól függően, hogy melyik fehérjéreszket ötvözik a két molekulából (Lin és mtsai 2009, Wang és mtsai 2009).

További genetikai módszerekkel egy másik algafajból, a *Volvox carteri*-ből is sikerült channelrhodopszin molekulákat izolálni (Zhang és mtsai 2008, Kianianmomeni és mtsai. 2009). A legújabb eredmények szerint létrehoztak anion áteresztő channelrhodopszin molekulákat is (dACRs és nACRs), amelyeket szintén számos tudományos kísérletben alkalmaznak (Kato és mtsai. 2018)

	τ_{on} (ms)	τ_{off} (ms)	I_{stat} (pA)	I_{stat}/I_{max}	λ_{max} (nm)	J (photon $s^{-1} cm^{-2}$) EC50 (mW mm^{-2})	Max spike ν	P_{Ca}/P_{Na}
CatCh	0.6 ± 0.003	16 ± 3	643.8 ± 30.9	0.69 ± 0.20	474	$10^{16}-10^{17}$ 0.7	≥ 50 Hz	0.24
vad típusú ChR2	0.2 ± 0.002	10 ± 1	216.3 ± 39.0	0.37 ± 0.18	470	$5 \times 10^{17}-10^{19}$ 0.7	≤ 20 Hz	0.15
ChR2 H134R	~ 0.6	19 ± 2	$\sim 1.5 \times I_{WT}$	0.53 ± 0.09	450	$5 \times 10^{17}-10^{19}$ 0.7	~ 20 Hz	-

12.Ábra Channelrhodopszin ioncsatornák (CatCh, vad típusú ChR2, ChR2 H134R) tulajdonságainak összehasonlítása (Kleinlogel és mtsai 2011)

WT (wilde- type): vad típus; τ_{on} (ms): a csatorna nyitott állapotának időtartama, τ_{off} (ms): a csatorna zárt állapotának időtartama; I_{stat} (pA): stacionárius állapot áramerőssége; I_{stat}/I_{max} : stacionárius állapot és a peak állapot áramerősségének hányadosa; λ_{max} (nm): fény hullámhossza; J (photon $s^{-1} cm^{-2}$): akciós potenciál kiváltásához szükséges fényintenzitás sűrűsége; max spike ν : fényimpulzus által kiváltható maximális spike- frekvencia; P_{Ca}/P_{Na} : a csatorna permeabilitása a Ca^{++} és Na^{+} -ra nézve; az adatok az átlag \pm szórás értékeket mutatják.

Munkám során (ChR2(H134R) fényérzékeny ioncsatornát expresszáló és (kontrollként) nem expresszáló sejtek in vitro vizsgálataival elemeztem az ionos stimuláció hatását a radiális glia jellegű sejtek mozgására.

2. Célkitűzések

Önmegújító, de sok-irányú fejlődésre is képes sejtek – azaz szöveti őssejtek – sokféle populációja jelen van a magasan differenciált, önmegújításra látszólag nem képes idegszövetben. Ennek ellenére, idegsejtek csak nagyon korlátozott mértékben pótlódnak a sérült agyszövetben. Az okok között egyaránt szerepelhet az egyes idegi őssejt-populációk eltérő fejlődési potenciálja, és a különböző idegszöveti régiókban alakuló fejlődést korlátozó környezet. Munkám során össze kívántam hasonlítani az egéragy különböző régióiból és különböző életkorokból származó idegi ős/progenitor sejtek sejt- és fejlődésbiológiai sajátosságait. A környezeti hatások közül a sejtek fejlődésének minden szakaszát befolyásoló ionos stimuláció hatásait vizsgáltam az ős/progenitor sejtek motilitásának szabályozásában. Az *in vivo* idegszövet komplex környezetében az egyes őssejt-populációkat nem lehet egyedileg elemezni; ezért radiális glia-jellegű idegi őssejteket izoláltam, és azok sajátosságait *in vitro* vizsgáltam.

Doktori munkám során a következő célokat tűztem ki:

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

3. Anyagok és módszerek

3.1 AK-ciklo[RGDfC] –vel borított tenyésztőfelszínek létrehozása

Az AK-ciklo[RGDfC] 1mg/ml-es törzsoldatait (desztillált vízben oldva) $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Közvetlenül felhasználás előtt beoldottuk a peptidet, desztillált vízzel 10 $\mu\text{g/ml}$ -es oldatot készítettünk. A polystirén vagy üveg tenyésztőfelszíneket bevontuk a peptiddel 0.25 μg peptidet juttatva minden cm^2 -re (2.Táblázat). Szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk az oldatban a tenyésztőfelszíneket, majd leszívtuk róluk az oldatot. Steril körülmények között, tenyésztő fülkében megszárítottuk a bevont felszíneket. A tenyésztőedények felszínén a becsült peptid-denzitás 0.25 $\mu\text{g/cm}^2$ lett, azt feltételezve, hogy a peptid molekulák nagy része abszorbeált a felszínre. Szárítás után a bevont tenyésztő edényeket legfeljebb 4 hónapig $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

2. Táblázat A tenyésztőedények bevonásánál alkalmazott mennyiségek 10 $\mu\text{g/ml}$ -es AK-ciklo[RGDfC] oldatból

Alkalmazott mennyiség a 10 $\mu\text{g/ml}$ -es oldatból	Tenyésztőedény mérete
50 μl / well (lyuk)	96 well tenyésztőedény
500 μl / well	24 well tenyésztőedény
1000 μl	35 mm-es Petri csésze
2000 μl	60 mm-es Petri csésze

3.2 Embrionális primer sejtszuszpenzió előállítása

Időre pároztatott, hGFAP-GFP (Nolte és mtsai., 2001), vad típusú CD1-es, CD1/EGFP (Valer Carstea és mtsai. 2007), és B6;129S-Gt(ROSA)26Sor^{tm32(CAG-COP4*H134R/EY FP)Hze/J} (Madisen és mtsai. 2012) transzgén egereket ketamin (100 $\mu\text{g/g}$) (CP-Pharma mbH, Germany) /xylazin (10 $\mu\text{g/g}$) (CEVA-Phylaxia, Hungary) injekcióval elaltattunk a vemhesség 14-17,5. napján. Izoláltuk az embriók (10-25 db) előagyát és steril PBS-be helyeztük. Mikroszkóp alatt (Zeiss) eltávolítottuk az agyhártyákat. A palliális és

szubpalliális szövetdarabokból Pasteur pipetta segítségével DMEM (Sigma)-ben tritúrálva a szövetet sejtszuspenziót készítettünk. A mechanikai disszociáltatás után a sejtszuspenziót 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).

3.3 Felnőtt primer sejtszuspenzió előállítása

A felnőtt CD1-es egereket ketamin (100µg/g) (CP-Pharma mbH, Germany) /xylazin (10 µg/g) (CEVA-Phylaxia, Hungary) injekcióval elaltattuk. Az agyakat izoláltuk, steril PBS-be tettük. Mikroszkóp alatt (Zeiss) eltávolítottuk az agyhártyákat és izoláltuk a kívánt agyterületeket az előagyi oldalkamrák dorzo-laterális és ventro-laterális részéről, a hippocampus területéről, a parietális cortex területéről és a colliculus superior dorso-laterális részéről. A kiperparált szövetdarabokat agyterületenként elkülönítve pengével kis rabakokra vágtuk, majd enzimatikusan is disszociáltattuk a Neural Tissue Dissociation Kit (Miltenyi Biotec) –et használva, a gyártó utasításai szerint. Az így kapott sejtszuspenziót 45µm pórusátmérőjű szitaszöveten szűrtük át. Az egyedi sejteket tartalmazó szuszpenzióban a 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)..

3.4 Radiális glia- jellegű sejt kultúrák létrehozása

Az embrionális és felnőtt agyból izolált sejtszuspenziókat lecentrifugáltuk (120g, 10 perc), majd gyorsan felszuszpendáltuk (hogy elkerüljük az aggregációt) az alap RGl-tápcoldatban, amely 50/50% DMEM/F12-t (Sigma) és 1% B27 (Gibco, Invitrogen)

szupplementet tartalmaz. Majd kiültettük a sejteket 2×10^5 sejt/cm² koncentrációban az AK-ciklo[RGDfC]-vel borított aljzatra. A sejtek kiültetését követően az alap RGI-tápoldatot kiegészítettük 20ng/ml EGF-el (Preprotech) (teljes RGI tápoldat).

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 sejt szuszpenziókat szétosztottuk és friss AK-ciklo[RGDfC]-vel borított tenyésztőedénybe ültettük át 10^5 sejt/cm² sűrűségben. Az első átültetést követően a sejt kultúrákat minden 2. vagy 3. nap szétosztottuk és új tenyésztőedénybe ültettük át. 3-4 átültetést követően a sejt kultúrák láthatóan homogén, a radiális glia sejtekre jellemző morfológiát mutattak.

3.5 Egy sejt eredetű klónok előállítása

4 átültetést követően a sejteket tripszinnel (0.05% tripszin, 1mM EDTA PBS-ben oldva, 1 perc szobahőmérsékleten) felemésztettük és kihigítottuk úgy, hogy az egyedi sejtek egymástól nagy távolságra kerüljenek az átültetést követően az AK-ciklo[RGDfC]-vel borított aljzaton, a 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.

3.6 Transzfektálás pTurbo- Cre plazmival

A B6;129S-Gt(ROSA)26Sor^{tm32(CAG-COP4*H134R/EY FP)Hze/J} (Madisen és mtsai. 2012) transzgen egérből izolált, *loxpStoploxpChR2(H134)-eYFP* konstrukciót tartalmazó radiális glia-jellegű sejteket 4 lyukú tenyésztőedénybe ültettük ki 5×10^4 sejt/lyuk

sejtszámban. Minden lyukba 1 μ g pTurbo-Cre plazmidot pipettáztunk (csirke- β -actin promotor szabályozta a Cre expresszióját (Hug és mtsai, 1996), 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 (Zeiss Axiovert 200M) ellenőrzések során kék szűrőt használtunk, amely kiszűrte a λ : 380–500 nm hullámhosszúságú fényt.

3.7 ChR2-eYFP pozitív és negatív radiális glia-jellegű sejtek szétválogatása FACS-szal

1 héttel transzfektálás után FACS-szal szétválogattuk a sejteket fluoreszcenciájuk alapján. $1-1,5 \times 10^6$ sejtet tripszinnel (0.05% tripszin, 1mM EDTA PBS-ben oldva, 1 perc szobahőmérsékleten) felemésztettünk, majd 2ml "sorting buffer" (1 mM EDTA és 0.4% marha szérum albumin PBS-ben oldva) oldattal lemostuk őket az aljatról.

A FACS berendezéssel (BD FACSAria II, BD Biosciences) ellenőriztük a sejtpreparátum épségét és meghatároztuk az optimális paramétereket (FSC és SSC elemzések, kapu beállítások) az eYFP pozitív és negatív sejtek elválasztására. "Nagy" áramlási sebesség alkalmazásával (körülbelül 65 μ l / 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 (fluoreszcein izotiocianát) csatornán. A nagyon fluoreszkáló és a nem fluoreszkáló sejteket elkülönítettük, és elválasztva tenyésztettük tovább.

3.8 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 fázis-kontraszt mikroszkóp segítségével követtük nyomon, valamint immuncitokémiai festés után vizsgáltuk.

Az asztroglivá történő differenciációhoz kiegészítettük a tápoldatot 5% főtális borjúsérummal (Fetal Calf Serum/FCS, 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 Glaser és mtsai. 2007 szerint. Röviden, az alap RGI tápoldatot FGF2-vel (10ng/ml; Peprotech), PDGF-fel (10ng/ml; Sigma) és forskolinnal (10 μ M; Sigma) egészítettük ki, majd 5 napig ilyen körülmények között tenyésztettük a sejteket. Majd a tápoldatot lecseréltük DMEM/F12 1/1 arányú elegyére kiegészítve 3,3,5-trijódtironinnal (T3; 30 ng/ml; Sigma) és aszkorbinsavval (200 μ M; Sigma). A 9. napon az oligodendroglia sejtek jelenlétét immuncitokémiai festéssel bizonyítottuk.

3.9 RT-PCR analízis

A sejtek RNS tartamát az Rneasy Mini Kit-tel (Quiagen) izoláltuk a gyártó utasításai alapján. A megmaradó DNS-szennyezést Dnáz-I-kezeléssel (Fermentas) távolítottuk el. Az izolált RNS-t felszuszpendáltuk RNáz/DNáz mentes vízben 1 μ g/ μ l koncentrációban majd -70°C -on tároltuk. A reverz transzkripciót 1 μ g RNS-ből “First strand cDNA synthesis Kit” (Fermentas) használatával végeztük. A PCR reakcióhoz Hotstart Taq (Quiagene) polimerázt alkalmaztunk. Aminták cDNS tartalmát a „háztartási” gén hipoxantin guanin foszforibozil transzferáz (hprt) PCR-termékek aránya alapján higítottuk azonos szintre. A hprt primerek a 248 bázispár hosszú cDNS mellett felismerik az 1086 bázispár hosszú genomiális szekvenciát is, ezért használatukkal a genomiális szennyezés is kimutatható. A polimeráz lánc-reakció (PCR) paramétereit minden primer-pár esetén optimalizáltuk. A denaturáció és az annelláció időtartama minden esetben 30 illetve 40 másodperc volt. Az elongációs idő <300 bázispár hosszúságú terméknel 30 másodperc, 300-600 bázispár hosszúságú terméknel 40 másodperc és >600 bp termék esetén 60 másodperc volt. 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. Az egyes gének kimutatásához használt primerek szekvenciáit, a PCR-reakció során keletkező

produktumok hosszát az annealálási hőmérsékleteket, és a ciklusszámokat a 3. Táblázat táblázat tartalmazza.

3. Táblázat Az RT PCR reakciók során használt primer-ek

	Primer szekvencia	Annealációs hőmérséklet (°C)	Termék hossza (bázispár)	Ciklusszám
Gfap	5'GACTATCGCCGCCAACTGC3'- 5'CGTCCTTGTGCTCCTGCTTC3'	58	422	32
Sox2	5'GCCCTGCAGTACAACTCCAT3'- 5'ACCCCTCCCAATCTCTTGT3'	53	400	32
Olig2	5'GGAAACAGCGAAGGGAGAGGA3'- 5'CTGCTGCTGTTGGCGGCACTT3'	58	287	35
Pax6	5'ACG AAA GAG AGG ATG CCT C3'- 5'CCC AAG CAA AGA TGG AAG3'	50	498	35
Blbp	5'ACCCGAGTTCCTCCAGTTC3'- 5'CAAAGCAAGTTCATTCATCA3'	54	431	35
Glast	5'TGGGTTTTTCATTGGAGGGTGTG3'- 5'CAGTACGTTGGTGGTGGTTCG3'	58	419	35
Oct4	5'GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC3'- 5'CTCGAACCACATCCTTCTCT3'	55	312	35
Emx2	5'TGGTTTTCAGAACCGGAGAAC3'- 5'TTTGGCATTGACTGACAGC3'	54	552	35
Nkx2.1	5'CCGCCTTACCAGGACACCA3'- 5'CCGCCCATGCCACTCATAT3'	58	433	35
Gbx2	5'TTCGAAGTCAACACCAGCAG3'- 5'CCCCTTTAAGCCCGTCTAAT3'	53	156	38
Dlx2	5'CAGGGTCCTTGGTCTCTTCA3'- 5'CTGCTGAGGTCAGTCTACG3'	58	600	35
Hoxb2	5'TCTTTGGTCCTTTCCGTCTG3'- 5'CCTGAGATTTGTTGGAAGG3'	53	159	35
	5'AAGAGGACTATGGCGTGTGG3'-			

Ngn2	5'ATGAAGCAATCCTCCCTCCT	56	649	35
Mash1	5'CCAACAAGAAGAAGATGAGCAAGG 3'- 5'TTCAAGTCGTTGGAGTAGTTGG3'	56	157	35
Math2	5'TGAGAATGGCTTGTCCAGAAGG3'- 5'TGGTAGGGTGGGTAGAATGTGG3'	56	406	35
Hprt	5'CACAGGACTAGAACACCTGC3'- 5'GCTGGTGAAAAGGACCTCT3'	56	248 cDNS/ 1086 gDNS	32

3.10 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 (Bovine serum albumin – marha szérum albumin - [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. A használt ellenanyagokat és a hígítási arányokat az (4. Táblázat) tartalmazza.

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 gyártó utasításai szerint. A peroxidáz reakciót PBS-ben oldott 0.55 mg/ml koncentrációjú DAB (Sigma) és 0.3% H₂O₂ (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 Ni²⁺ -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.

4. Táblázat Az immuncitokémiai festések során alkalmazott ellenanyagok

Ellenanyag	Gyártó	Hígítás
RC2	DSHB	1/500
nesztin	Chemicon	1/1000
GABA	Sigma	1/1000
VGAT	Synaptic Systems	1/500
VGlut2	Chemicon	1/200
tyrosin-hydroxylase (TH)	Chemicon	1/500
GFAP	Sigma	1/1000
O4	Chemicon	1/10
β III-tubulin	Exbio	1/1000
anti-egér-Alexa-594	Invitrogen	1/1000
anti-nyúl-Alexa-488	Invitrogen	1/1000
anti-nyúl-IgM biotin	Vector	1/1000

3.11 Kromoszóma számolás

A sejtsztódást és a metafázisos kromoszómák blokkolását 0.2 μ g/ml colchicine (Sigma) oldattal végeztük 2 órán keresztül. Majd a sejteket tripszinnel (0.05% tripszin, 1mM EDTA PBS-ben oldva, 1 perc szobahőmérsékleten) 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 (Nikon TS100) vizsgáltuk, számoltuk.

3.12 Elektrofiziológiai mérések, patch clamp:

A radiális gliasejtek ionáramait whole cell patch-clamp technikával analizáltuk. Az elektrofiziológiai mérésekhez a sejteket 12 mm-es üveglemezeken tenyésztettem. A mérések folyamatos perfúzió (2ml/min) mellett történtek. Az extracelluláris oldat összetétele mM-ban: 145 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 D-Glucose, 10 HEPES; pH=7.4, osmolaritás 300 mmol/kg. A puffert 95% O₂ es 5% CO₂ keverékével folyamatosan oxigenáltattam. Az elvezető boroszilikát üvegkapillárisok ellenállása 4-8 MOhm közé esett. Az intracelluláris oldat összetétele 130mM KCl, 0.5mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5mM EGTA, 10mM HEPES; pH = 7.2.

Az áram szignálokhoz MultiClamp700B amplifier (Axon Instruments) erősítőt használtunk. A mért áramjeleket 5 kHz-es mintavételezéssel digitalizáltuk (CED micro 1401 interface, Cambridge Electronics Design).

A radiális gliasejtek in vitro indukált neurogenézise során jelentkező ionáramok feltérképezéséhez az ún. Feszültséglépés (voltage step) protokollt használtuk. A sejteket "voltage clamp" módban mérve -70 mV tartófeszültségről indulva 10 mV-os lépésekben depolarizáltuk +20 mV-ig, majd hiperpolarizáltuk -160 mV-ig. Egy-egy feszültséglépés időtartama 50 ms volt. A KDR áramok amplitudóját +40 mV-on mértem 40 ms-nál. A Na áramok amplitudójánál a "peak" értéket vettük figyelembe. Az áramjelek regisztrálásához és utólagos elemzéséhez Strathclyde Electrophysiology Software Whole Cell Programjat (by John Dempster) használtuk.

A ChR2-t expresszáló radiális glia-jellegű sejtek vizsgálatánál az eYFP-t kifejező célzott elvezetésekhez Andor Spinning Disk Confocal system (Andor Technology Ltd) video mikroszkópiát használtunk. A ChR2 indukálta áramjelek elvezetéséhez a sejteket "voltage clamp" módban mérve -65 mV-on tartottuk és 50ms lézer pulzusokkal stimuláltuk (488±20 nm). A kék laser fény intenzitását fokozatosan növeltük. Az adatok regisztrálásához és utólagos értékeléséhez pClamp 10.3 software-t (Molecular Devices) használtunk.

3.13 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 $1 \mu\text{m}^2$ sejterületre vonatkoztak. Az átlagokat és a szórásokat 16-25 véletlenszerűen kiválasztott nem indukált radiális glia- jellegű sejtek és 5 napos idegsejt irányba indukált sejtek adataiból számoltuk ki.

3.14 Videomikroszkópia

A mikroszkóppal történő videofelvételek során az E17,5 ChR2+ és ChR2- indukátlan radiális glia- jellegű sejtek és a neuronális irányba differenciálódó indukált sejtek egy speciális optikai üveggel rendelkező aljzaton nőttek 35mm-es Petri csészében (Ibidi). A tenyészeteket állandó 37°C -os hőmérsékleten, 5% CO_2 -ot és 95% levegőt tartalmazó mobil mini-inkubátorban (Szabó és mtsai., 2011) 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 $0.13 \text{ mW}/\text{mm}^2$ intenzitású fluoreszcens fényvel 12 órán keresztül. Fázis-kontraszt és epifluoreszcens felvételeket készítettünk 10X-es objektívvel minden megvilágítási periódus végén.

A fénystimuláció és a videofelvétel mindig 24 órával és 120 órával az EGF megvonást (az indukció beindulását) követően kezdődött az 1 napos indukált és az 5 napos indukált tenyészetek esetében.

A fénystimulációnak a sejtmozgásra gyakorolt hatását a nem indukált radiális glia- jellegű sejtek tenyészetében, valamint 1 napos és 5 napos idegsejtté indukált sejteken vizsgáltuk. A kísérletek végén a sejteket szobahőmérsékleten 20 percig 4% (w/v PBS-ben) paraformaldehidben (Taab) fixáltuk, és PBS-ben 4°C -on tároltuk az immuncitokémiai analízishez.

3.15 A sejtmozgás analízise

A videófelvelekek képeit megnyitottuk a WTrack programmal (Gönci és mtsai, 2010) és minden kezdő képen kiválasztottunk 20 sejtet, amelynek a mozgását nyomon követtük. A kritérium, ami alapján kiválasztottuk ezeket a sejteket az volt, hogy a nyomon követett sejtek ne hagyják el a mikroszkóp látóterét a 12 órás felvétel alatt. Mindegyik kezdő képen kiválasztottunk egy nem mozgó referenciapontot is, hogy korrigálni tudjuk a mikroszkóp potenciális elmozdulása miatt keletkezett műterméket.

A kiválasztott sejtek mozgását úgy követtük, hogy a sejt közepére kattintottunk, ennek koordinátáit a WTrack program képről képre regisztrálta. A sejtek koordinátáit aztán a referenciapont koordinátáinak változásával korrigáltuk. 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:

$$d(p_i, p_{i+1}) = \sqrt{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2} * 0.645$$

ahol p_i és p_{i+1} az aktuális és az 5 perccel későbbi pozíciók, valamint a 0.645 koefficienset használtuk a távolság (d) mikrométerben történő kiszámolására. 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 ($n = 60$ minden egyes differenciációs fázis esetében, $n = 20$ a Chr2-t expresszáló, de nem megvilágított sejtek esetében).

3.16 Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéseket R statisztikai programozással végeztük (R Core Team, 2016). A grafikonokat ggplot2 csomaggal ábrázoltuk. Minden esetben $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) és $p < 0,001$ (***) tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A teljes távolságot, amelyet a sejtek 12 óra alatt megtettek 3 kategóriába soroltuk: kevesebb, mint 200 μm , 200 és 400 μm között és több, mint 400 μm . Az adatokat ábrázoltuk, és a statisztikai szignifikanciát Pearson Chi-squared teszttel határoztunk 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 (35. Ábra) és a teljes távolsági adatokat (39. Ábra) boxplotként ábrázoltuk, 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 (40. Ábra) Kruskal-Wallis rangsor-teszt és Dunn-teszt alapján határoztuk meg.

4. Eredmények

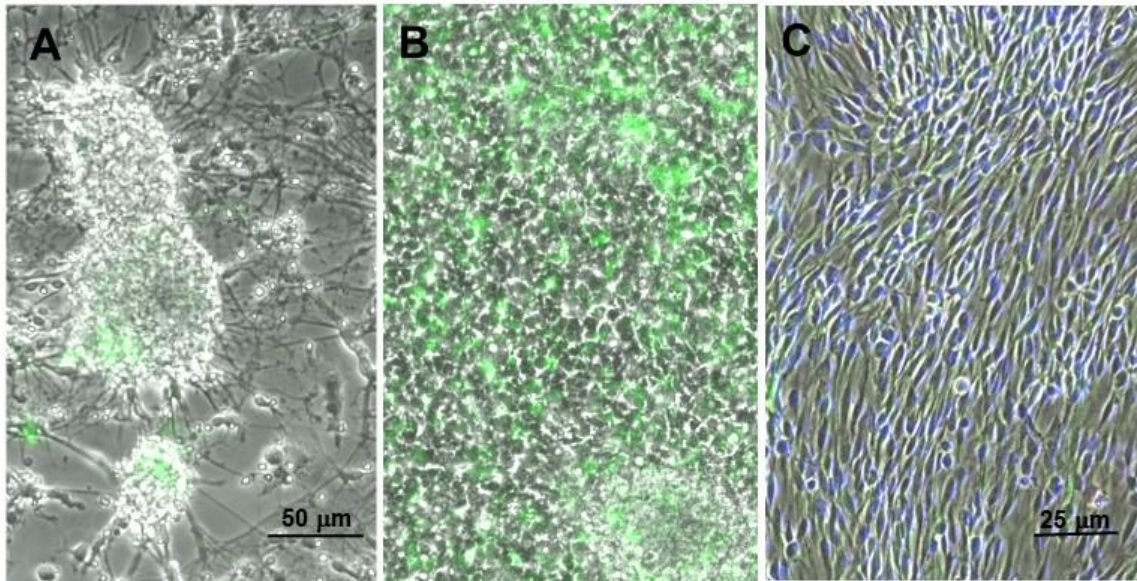
Különböző életkorokból és agyi régiókból nyert radiális glia-jellegű idegi őssejtek

4.1 Radiális glia-jellegű idegi őssejtek izolálása embrionális előagyból

Idegszöveti sejteket tenyésztő munkánk során figyeltünk fel egy gyorsan osztódó, asztrogliaiként vagy idegsejtként nem azonosítható, tömegesen csak a sejttenyésztés kezdetére jellemző sejtfeleségre. Előzetes idegi őssejtekkel való eredményeink (Schlett, Madarász 1997) alapján feltételeztük, hogy olyan differenciálatlan sejtekről lehet szó, amelyek a tenyésztés későbbi fázisaiban ideg- vagy gliasejteké alakulnak. A differenciálatlan sejtek nyomon követésére olyan transzgenikus egérembriók előagyából készítettünk tenyészeteket, amelyek minden sejtjükben hordozták a humán gliális fibrilláris asztroglia fehérje (hGFAP) promóteréről „hajtott” zöld fluoreszcens fehérje (GFP) génkonstrukciót (hGFAP-GFP) (Nolte és mtsai, 2001) A GFAP fehérje a korai embrionális egéragyban nem íródik át, de a promóter aktív, és a róla kifejeződő GFP fehérje jelzi a fejlődő elkötelezetlen idegszöveti sejteket (Malatesta és mtsai., 2003).

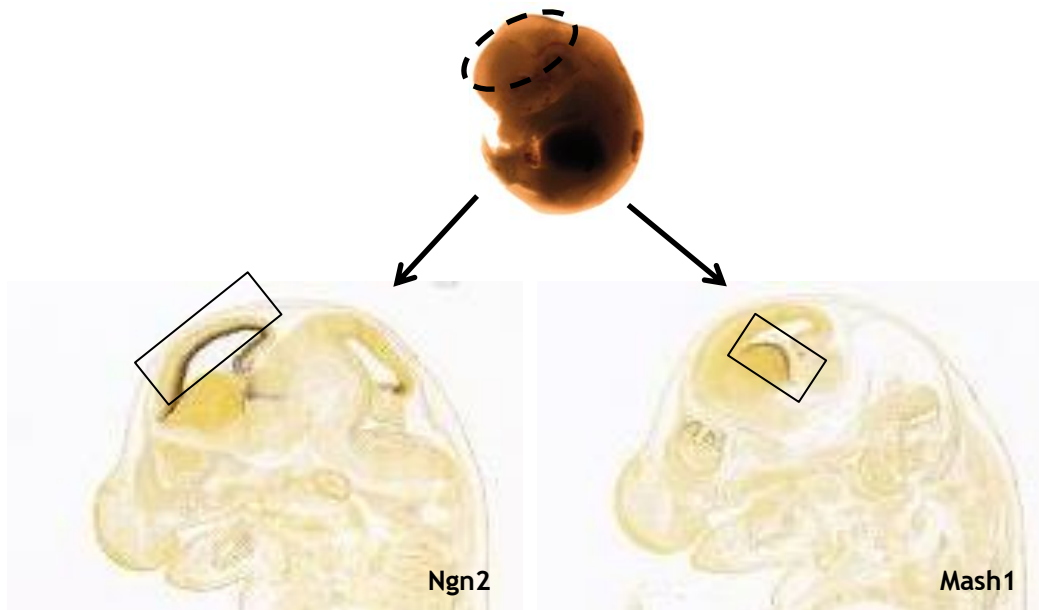
A hGFAP-GFP konstrukciót hordozó 14 napos egér embriók (E14) előagyából készítettünk sejttenyészeteket. A primer sejt kultúrákban a sejtek 2-3 nappal az agyszövetből való kiültetés után aggregátumokba rendeződtek (12. Ábra A). A 4. naptól kezdve egy intenzíven osztódó sejt populáció kezdte benőni az aggregátumok közti, AK-cyclo(RGDfC)-vel borított aljzatot (12.Ábra B). 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.



12. Ábra. hGFAP-GFP hordozó embrionális előagyból készült primér tenyészet (A, B) és a sejtek 3. átültetése utáni tenyészet (C) fázis-kontrast és fluoreszcens kombinált felvételei. A: a kiültetés utáni 1. nap; B: 3. nap.

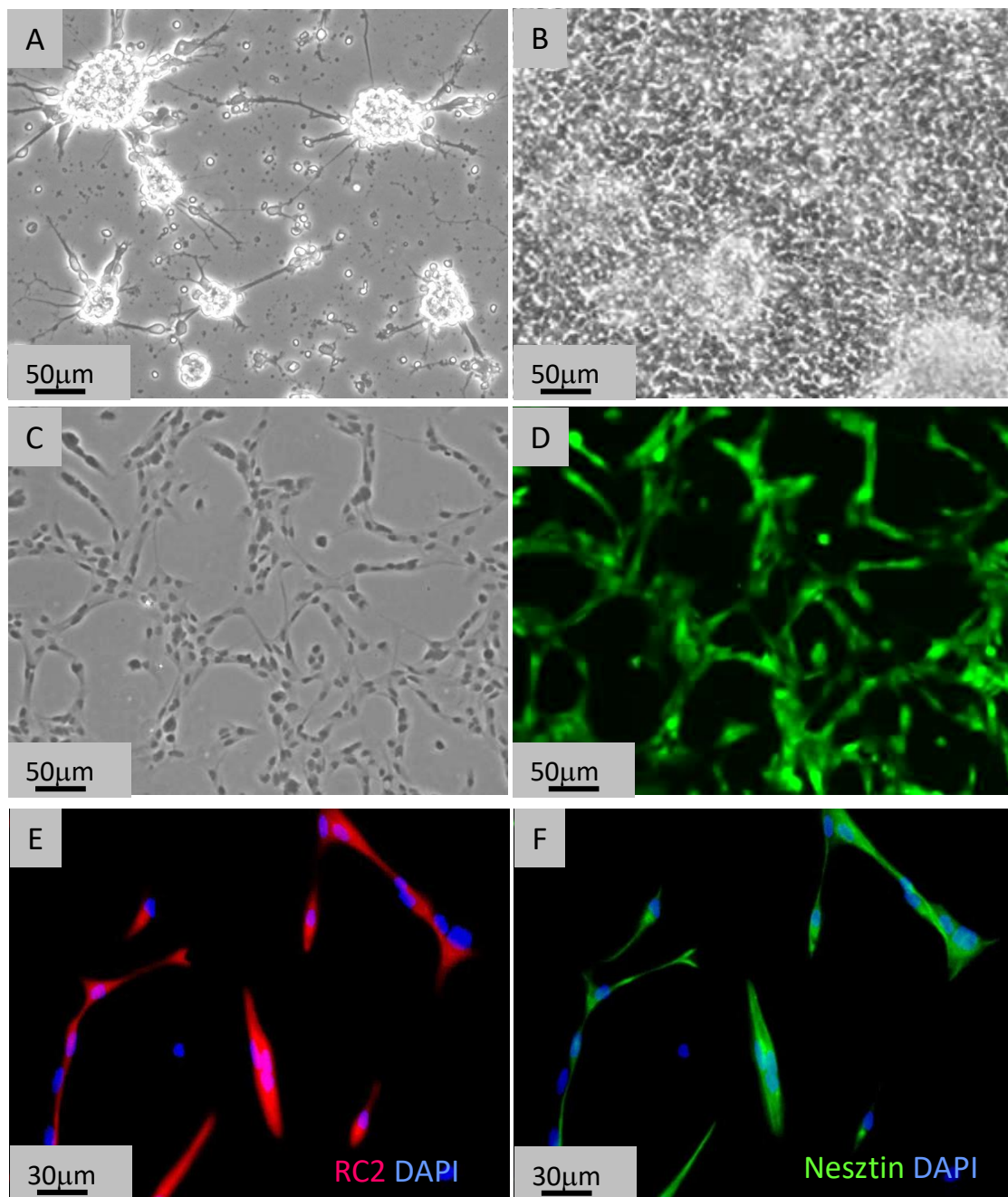
Az elkötelezetlen sejtpopuláció további jellemzésére, valamint a tervezett implantációs kísérleteket szem előtt tartva vad típusú CD1-es egér embriók (E14) és GFP-t minden sejtjében expresszáló transzgén egértörzs embrióinak (E14,5) előagyából is izoláltunk sejteket a fenti módszerrel. Míg a vad típusú embriók teljes előagyából izoláltuk a sejteket, a GFP-t expresszáló egértörzs előagyának ventrális – ebben a korban az agykéreg számára kisméretű interneuronokat - és dorzális – kérgi vetítő neuronokat produkáló - részéből elkülönítve készítettünk sejtenyészeteket (13. Ábra).



Allen Brain Atlas

13. Ábra. 14,5 napos egér embrió sagittalis metszetein jelölve a dorzális és ventrális előagyi területek, ahonnan a radiális glia- jellegű sejteket izoláltuk

Ezeknél a primer tenyészeteknél is megfigyelhető volt, hogy a 4. naptól kezdve az aggregátumokból kilépve egy intenzíven osztódó sejtpopuláció nőtte be az aljzatot (14. Ábra B). Az első hét végétől kezdve a konfluens tenyészeteket (14. Ábra B, 13. ábra C) az aljzatról felemésztettük és a sejteket új, AK-cyclo (RGDfC)-vel borított Petri csészébe ültettük át. A sorozatos átültetések után egy folyamatosan osztódó sejtpopuláció szelektálódott ki. A látszólag homogén sejtpopulációt (14. Ábra C,D) immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk. A β III-tubulin pozitív és a GFAP pozitív sejtek száma fokozatosan csökkent, majd a 3. átültetést követően elhanyagolhatóvá vált. A sejtek nagy része a radiális glia típusú őssejtekre jellemző együttes nesztin és RC2 pozitivitást (Mori és mtsai., 2005) mutatott (14. Ábra E, F). A tenyészetek összetétele morfológiailag is teljesen homogénné vált, az összes sejt a radiális glia sejtekre in vitro jellemző elnyújtott morfológiát (Conti et al, 2005) mutatta. Az adherens, monolayer-be rendeződött sejtek között spontán differenciáció nem volt megfigyelhető.

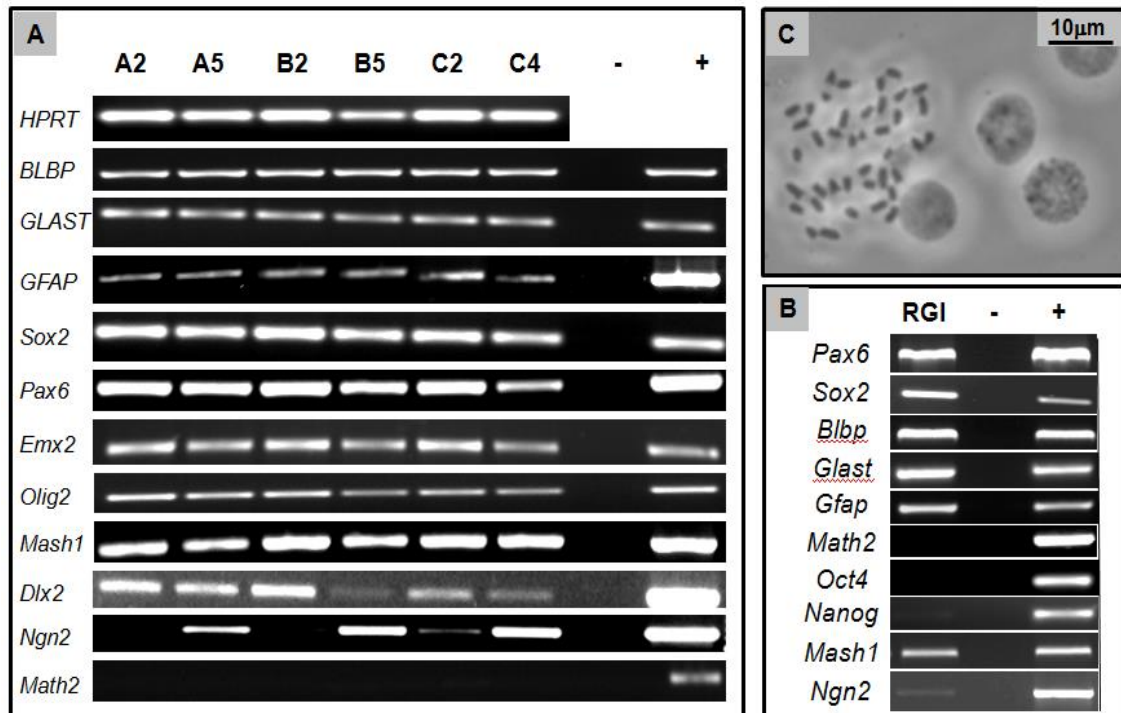


14. Ábra. Fázis- kontraszt felvételek embrionális előagyból izolált primer sejt kultúrákról AK-cyclo(RGDfC)-vel borított aljzaton 2 nappal (A) és 6 nappal (B) a kiültetés után. Morfológiailag homogén, GFP-t expresszáló sejtek a 3. átültetés után, látható fényben (C) és fluoreszcens fényben (D) készült felvétel. Az embrionális agyból készült tenyészetek RC2 (E) és nesztin (F) immunopozitivitást mutattak. Az A,B,C, D ábra a GFP-t minden sejtjében expresszáló egértörzs embrióinak előagyából történő izolálás során készült, az E, F ábra a CD1-es egértörzs előagyából izolált tenyészetek immuncitokémiai vizsgálatát mutatja.

Az immunhisztokémiai módszerrel radiális glia- jellegű sejteknek látszó populációkból egy sejt eredetű klónokat hoztunk létre. A CD1- es egérembriókból izolált tenyészetekből az RGI klónt, a CD1/GFP egérembriókból izolált tenyészetekből pedig az RGI-GFP-A2, RGI-GFP-A5, RGI-GFP-B2, RGI-GFP-B5, RGI-GFP-C2 és RGI-GFP-C4 egy sejt eredetű klónokat állítottuk elő.

Az egy sejt eredetű klónok immunhisztokémiai és mRNS profiljuk alapján is radiális glia sejtekre jellemző tulajdonságokat mutattak. Továbbra is nesztin és RC2 pozitívak voltak, valamint expresszálták a Pax6, Sox2, Olig2, Blbp, Glial 2 idegi őssejtekre jellemző génkombinációt (15.Ábra A,B). Ugyanakkor a pluripotenciát jelző Oct4 és Nanog (Rosner és mtsai.1990, Mitsui és mtsai, 2003; Chambers és mtsai, 2003) nem expresszáldott bennük (15. Ábra B). Az embrionális fejlődés során a radiális glia sejtek agyi regionalizációját jelző gének többsége (Pax6, Olig2, Dlx2, Emx2, Mash1) expresszáldott az összes klónban (15.Ábra A, B). A Ngn2 proneurális gén (Guillemot 2007), megfelelően az in vivo expresszióknak, csak a dorzális eredetű (RGI-GFP-A5, RGI-GFP-B5, RGI-GFP-C4 és alacsony szinten a RGI-GFP-C2) klónokban expresszáldott kimutatható szinten (15.Ábra A,B). A GFAP a klónokban csak mRNS szinten expresszáldott (15.Ábra A,B), a fehérjét az immunhisztokémiai festés nem mutatta ki.

Az idegsejtté való differenciálódás kezdetét jelző Math2 gén (Schwab és mtsai 2000, Farah és mtsai, 2000) egyik klónban sem fejeződött ki (15.Ábra A,B). A klónok még 20 átültetés után is 40 kromoszómát tartalmaztak (15. Ábra C), genetikailag stabilnak bizonyultak. A továbbra is definiált médiumban tartott egy sejt eredetű klónok hosszú távon megtartották osztódóképességüket (> p40). Spontán nem differenciálódtak, adherens monolayer-t alkottak.



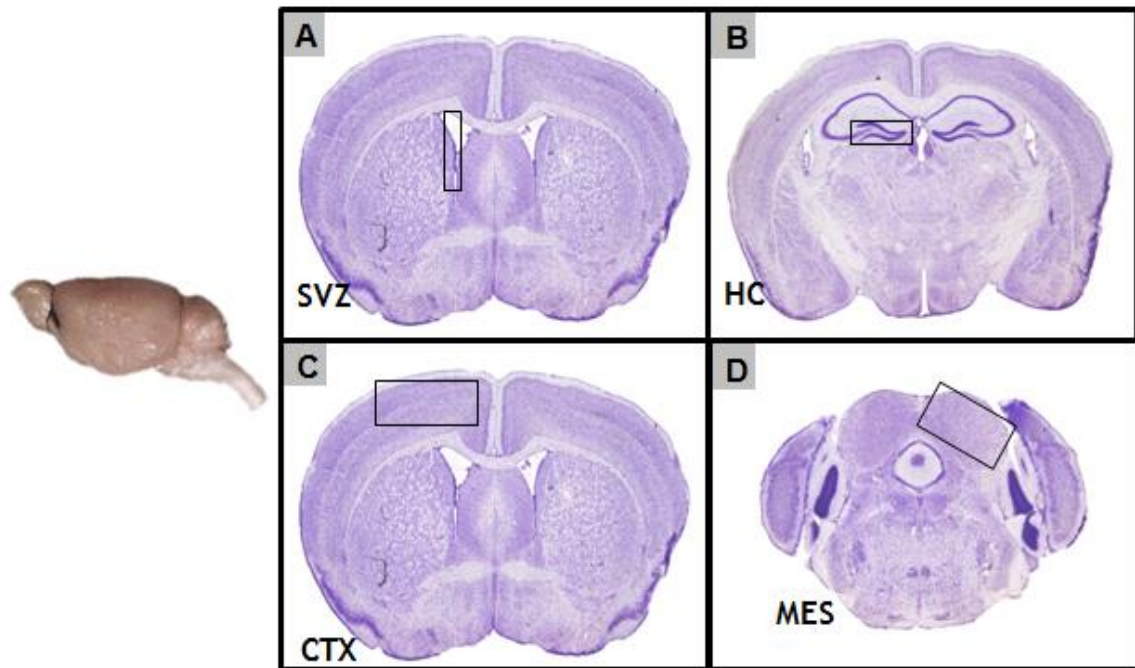
15. Ábra. Az embrionális klónok expresszálják a radiális glia/idegi őssejt markereket: Pax6, Sox2, Olig2, Blbp, Glast (A,B), de nem expresszálják a pluripotenciát jelző Oct4, Nanog géneket és az idegsejt prekurzorokra jellemző Math2-t (A,B). A proneurális gének (Pax6, Olig2, Dlx2, Emx2, Mash1) az összes klónban expresszálódtak, kivéve a Ngn2, amely csak a dorzális eredetű klónokban fejeződött ki (A,B). A radiális glia-jellegű sejtek klónjai a 20. átültetést követően is megtartották fajra jellemző kromoszómaszámukat (C, n=40)

A klónozott radiális glia- jellegű sejtek idegi őssejt-sajátságait a későbbi differenciációs vizsgálataink egyértelműen bizonyították.

Felvetődött a kérdés, hogy vajon a radiális glia- jellegű sejtjeink csupán egy embrionális agyfejlődési stádiumra korlátozott sejt, vagy megfeleltethető a későbbi fejlődési állapotokban is képződő, és felnőtt korban is jelenlevő idegszöveti ősz/progenitor sejt típusnak. Ezért azonos módszerrel sejtklónokat izoláltunk kifejlett egerek különböző agyi régióiból is.

4.2 Radiális glia-jellegű idegi őssejtek izolálása felnőtt agyból

Felnőtt egeragy (P62) neurogén (előagyi szubventrikuláris zóna-SVZ, hippocampus-HC) (16.Ábra A,B) és nem neurogén (előagykéreg- CTX, középagy- MES) (16.Ábra C,D) zónáiból szintén primer sejtenyészeteket állítottunk elő.



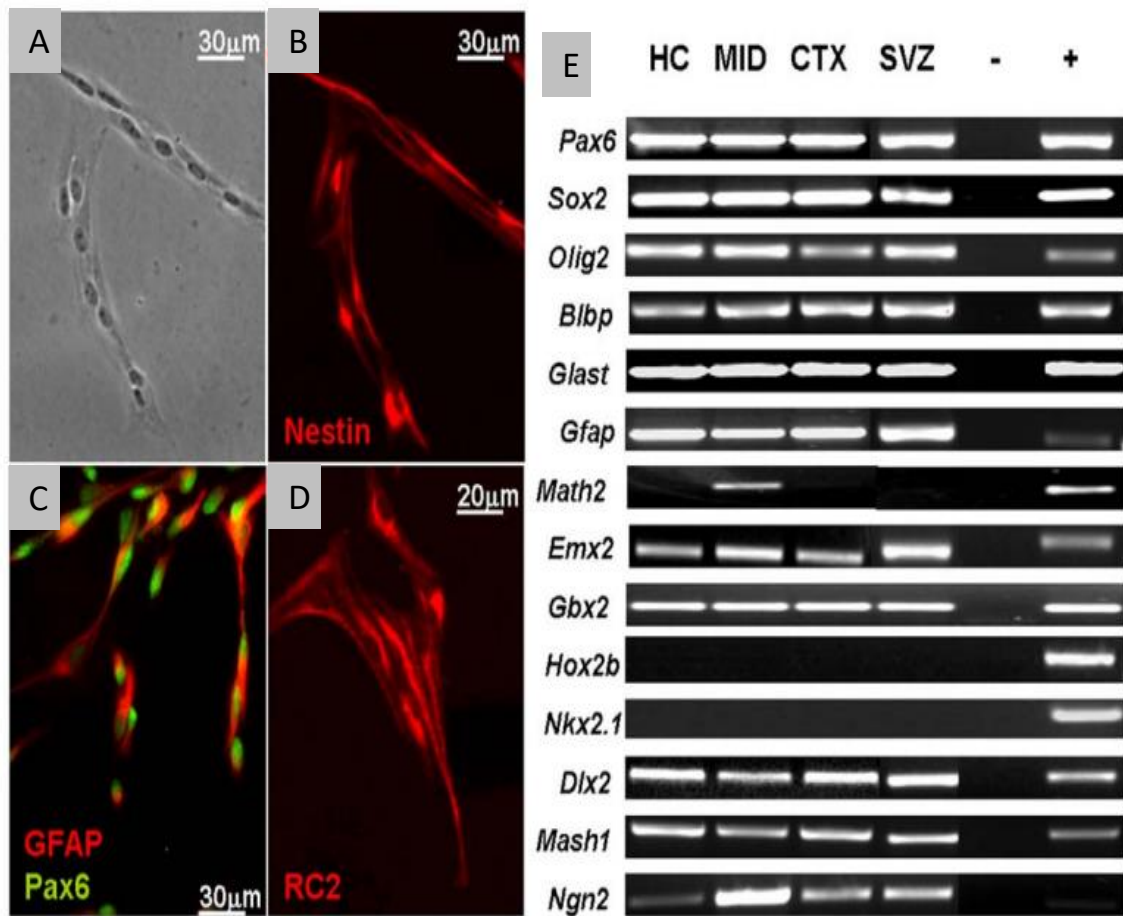
Allen Brain Atlas

16. Ábra. Felnőtt egeragy frontális metszetein jelölve a radiális glia-jellegű sejtek izolálási helye. A neurogén zónák: előagyi szubventrikuláris zóna-SVZ (A), hippocampus- HC (B) és a nem neurogén zónák: előagykéreg- CTX (C), középagy- MES (D).

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. Az embrionális agyból izolált sejtekhez hasonlóan ezek a sejtek is elnyújtott, radiális glia-jellegű morfológiát mutattak (17. Ábra A). A tenyészetek többségében sem ellaposodott, asztroglia morfológiájú sejtek, sem β III-tubulin pozitív idegsejtek nem

voltak megfigyelhetők. Kivéve a középagyi régiót, ahonnan származó sejt kultúrákban azonban β III-tubulin pozitív idegsejtek spontán is differenciálódtak.

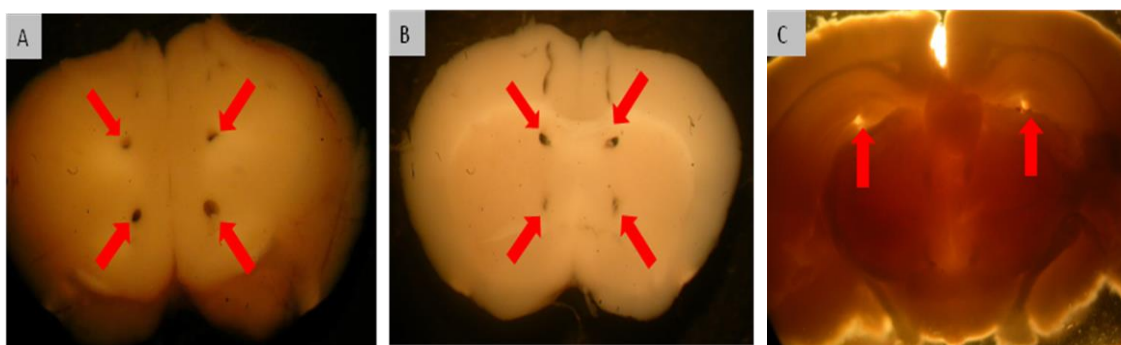
A stabilan osztódó, radiális glia- jellegű tenyészetekből egy sejt eredetű klónokat állítottunk elő. A szubventrikuláris zónából 4 különböző klónt is sikerült létrehozni (SVZ_I, SVZ_K, SVZ_T, SVZ_M), míg a hippocampus-ból, előagykéregből és a középagyból 1-1-et (HC_A, CTX_H és MES_D). A klónok mindegyike expresszálta a Nesztin (17.Ábra B), Pax6 és GFAP (17.Ábra C) és az RC2 (17.Ábra D) fehérjéket, mRNS szinten pedig a Pax6, Sox2, Olig2, Blbp, Glast géneket (17.Ábra E), amely expressziós mintázat definiálja a radiális glia sejteket. A vizsgált pozicionális gének közül a Dlx2, Emx2, Pax6, Gbx2 és a proneurális gének közül a Ngn2 és Mash1 az összes klónban kifejeződtek (17.Ábra E), annak ellenére, hogy ezek expressziója a felnőtt agyban nem teljesen átfedő. A rhombencephalikus régiót jelző Hox2b gén (Alexander és mtsai, 2009; Tümpel és mtsai, 2009) egyik klónban sem expresszálódott (17.Ábra E). Ahogyan meglepő módon az SVZ-re jellemző Nkx2.1 (Lledo és mtsai, 2008) expresszióját sem tudtuk kimutatni (17.Ábra E).



17. Ábra. A felnőtt hippocampális eredetű HC_A klón radiális glia-jellegű morfológiája látható fényben (A). A HC_A klón expresszálta a radiális glia sejtekre jellemző fehérjéket: Nestin (B), GFAP, Pax6 (C) és RC2 (D). A többi felnőtt eredetű klón (SVZ_I, SVZ_K, SVZ_T, SVZ_M, CTX_H, MES_D) morfológiája és fehérjeexpressziója megegyezett a HC_A klónnál leírtakkal. A radiális glia/ idegi őssejt- specifikus gének (Pax6, Sox2, Olig2, Blbp, Glast) és a proneurális gének (Dlx2, Emx2, Pax6, Gbx2, Ngn2, Mash1) is az összes klónban kifejeződtek. A Hox2b-t és az Nkx2.1-et azonban egyik klón sem expresszálta. A Math2 gén expresszióját kizárólag a közepagi eredetű klónban (MID) figyeltük meg (E). Az E ábra az SVZ_M klón génexpresszióját mutatja, amellyel a többi SVZ eredetű klón (SVZ_K, SVZ_T, SVZ_I) génexpressziója teljes mértékben megegyezett.

Tovább tesztelve az izolálási módszer hatékonyságát, Hádinger Nóra munkatársam együttműködésével biopsziás tüvel célzott agyterületekről nyert, kb 3mm³ nagyságú

szövet-darabkákból próbáltunk meg sejteket kinyerni. A felnőtt előagyi szubventrikuláris zónának számos - SVZ ventrális, SVZ dorzális, SVZ anterior dorzális, SVZ anterior ventrális, SVZ posterior dorzális - területéről (18.Ábra A, B) sikerült stabilan osztódó sejtek tenyészetét létrehozunk. Ugyanezzel a módszerrel célzottan a hippocampus gyurus dentatus-a körüli régióból is nyertünk ki sejteket (18.Ábra C). A hippocampus egyéb területeiről radiális glia jellegű sejteket nem tudtunk kitenyészteni. A sikeresen izolált sejtenyészeteket felszaporítottuk, a jövőben tervezett további vizsgálatok megkezdéséig folyékony nitrogénben tároltuk.



18. Ábra. A biopsziás tűvel izolált szövetminták helyei: anterior SVZ dorzális és ventrális területei (A), posterior SVZ dorzális és ventrális területei (B), a hippocampus gyurus dentatus-ának területei (C).

4.3 Radiális glia- jellegű őssejtek jellemzésének összefoglalása

A különböző életkorú egerek különböző agyi régióiból izolált radiális glia-jellegű sejtek mindegyikében kifejeződtek a radiális glia sejtekre jellemző (*sox2*, *olig2*, *pax6*, *blbp*, *glast*, *oct4*, *emx2*) gének. A *dlx2* és *mash1*, valamint a *gbx2* expressziója jelezte, hogy az összes vizsgált klón sejtjei kifejeznek ventrális és előagyi/középagyi sajátosságok megjelenítésére alkalmas géneket. A nyúltagyra jellemző *hox2b* viszont, egyetlen klónban sem volt kimutatható. Meglepő módon, a *dlx2* expresszió mellett, szinte minden klón sejtjeiben átíródott a dorzális agyi régiókra jellemző *ngn2* proneurális gén. A *math2* gén ugyanakkor, a középagyi dorzális (MES_D) sejtektől eltekintve, egyetlen klón sejtjeiben sem íródott át; azaz, a radiális glia-jellegű sejtek többsége nem hordoz közvetlen idegsejt-alakulásra jellemző sajátosságokat. Ezt megerősítette az asztrogliá sejtekre jellemző *gfap* gén általános átíródása is. A génexpresszió elemzés azt jelezte, hogy az előagyból és középagyból izolált, és *in vitro* propagált radiális glia-jellegű

sejtekben anteriorális agyi jellemzők rögzültek, de az előagyi sejtek dorzális- ventrális helyzetét és az idegszöveti sejtípust szabályozó génextresszió – ebben a sejtfejlődési stádiumban – nem utal sem a fejlődő sejt jövődő típusára, sem annak lehetséges agyszöveti pozíciójára.

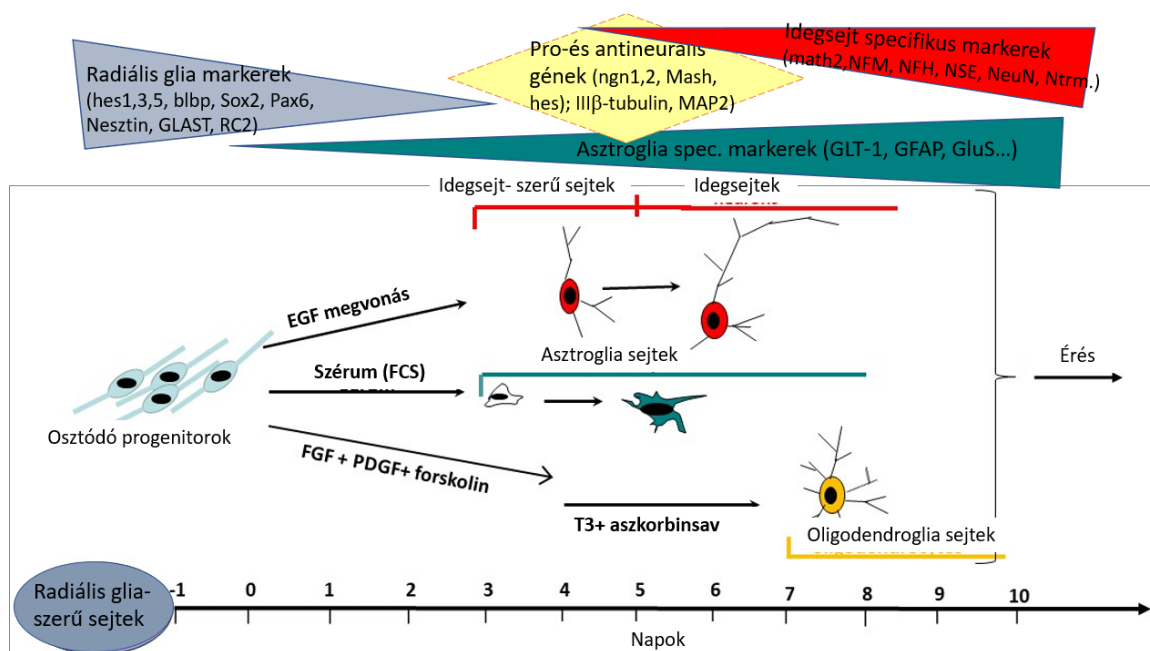
Klónok	Embrionális (E14, E14,5)			Felnőtt (P62)						
	A2, B2	A5, B5, C2, C4	RGI	HC_A	CT X_H	MES_D	SV Z_I	SVZ _K	SVZ _T	SVZ _M
Származás	ventrális előagy	dorzális előagy	teljes előagy	hippocampus	parietális cortex	dorzolaterális colliculus superior	felnőtt előagyi SVZ			
RC2/Nesztin immunopozitivitás	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GFAP immunopozitivitás	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Génextresszió										
<i>sox2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>olig2</i>	+	+	na	+	+	+	+	+	+	+
<i>pax6</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	na	na
<i>blbp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>glast</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>oct4</i>	na	na	-	na	na	na	na	na	na	na
<i>emx2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>gbx2</i>	na	na	na	+	+	+	+	+	+	+
<i>dlx2</i>	+	+	na	+	+	+	+	+	+	+
<i>hoxb2</i>	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-
<i>ngn2</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

<i>mash1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>gfap</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>math2</i>	-	-	na	-	-	+	-	-	-	-

19. Ábra Összefoglaló táblázat a radiális glia-jellegű sejtek jellemzéséről (na=nincs adat)

4.4 Radiális glia-jellegű sejtek differenciációja különböző idegi sejttypusokká

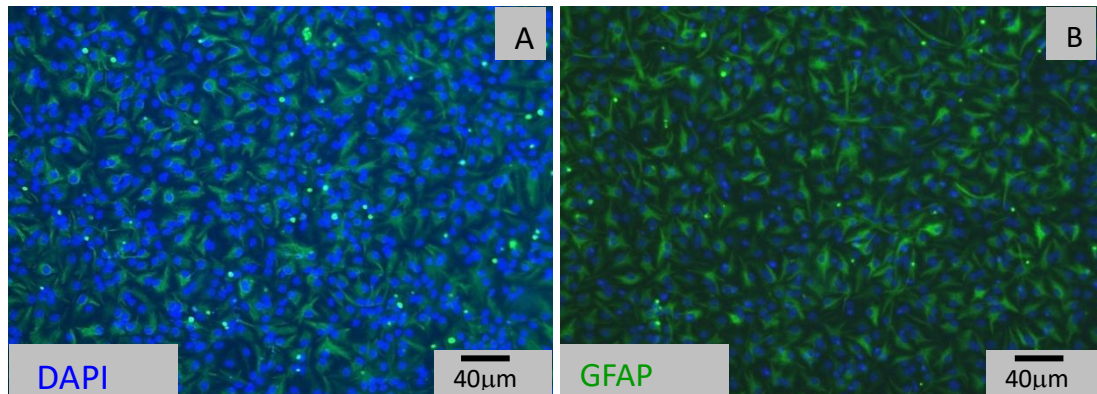
Különböző differenciáltatási eljárások segítségével mind a három fő idegszöveti sejttypus kialakult a radiális glia-jellegű sejtek tenyésztésében (20. Ábra).



20. Ábra. A radiális glia- jellegű sejtek in vitro differenciálódásának sémája (Madarász 2013)

4.5 Asztroglia sejtek alakulása

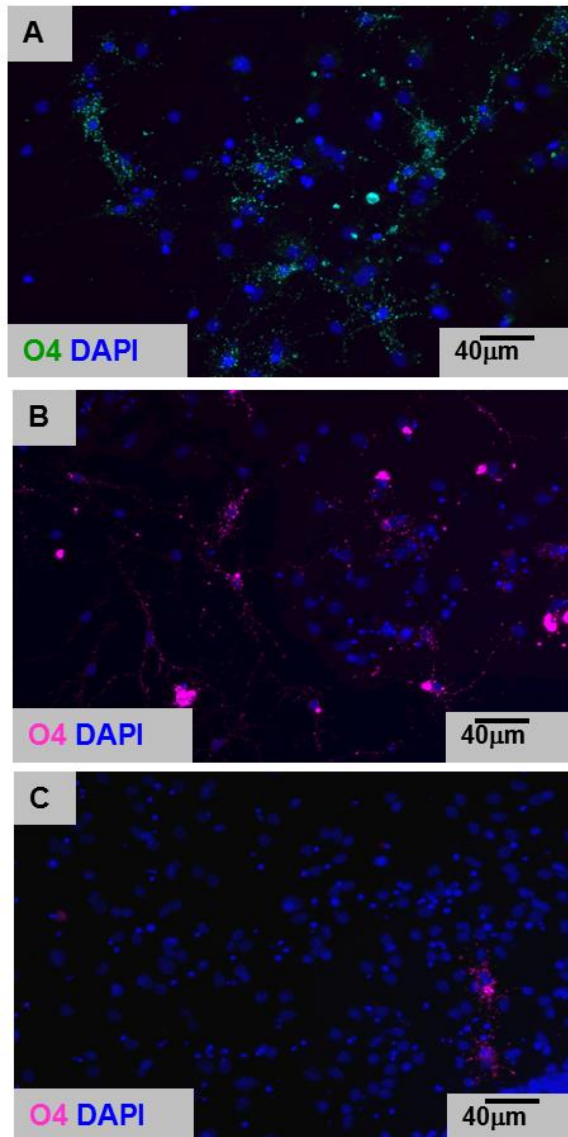
Radiális glia-jellegű sejtek szemi-konfluens tenyésztéséhez 10% szérum (FCS) hozzáadásával 4 nap alatt GFAP pozitív, ellaposodott asztroglia sejteket hoztunk létre (21.Ábra A, B). A morfológiailag homogénnek látszó monolayer alkotó sejtek között – immuncitokémiai módszerekkel – sem idegsejteket, sem oligodendroglia sejteket nem tudtunk azonosítani.



21.Ábra GFAP immunfestés (zöld) az embrionális RGl-GFP-C4 klón (A) és a felnőtt SVZ_K klón (B) tenyészteiben. Az összes embrionális és felnőtt klón GFAP pozitív volt 4 nappal a szérum hozzáadása után.

4.6 Oligodendroglia sejtek képződése

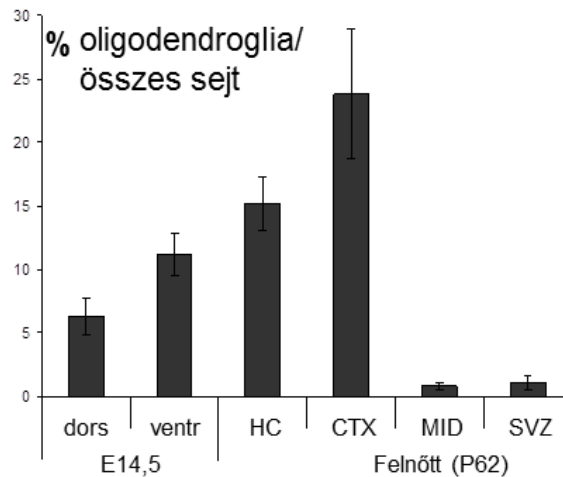
Oligodendroglia sejteket 2 lépéses protokoll segítségével differenciáltattunk mind embrionális mind felnőtt agyi eredetű radiális glia-jellegű sejtekből (Glaser et al, 2007). 8 nap elteltével az összes klónból differenciálódtak O4 pozitív korai oligodendroglia sejtek (22.Ábra A, B, C).



22.Ábra O4 immunopozitív oligodendroglia sejtek az embrionális agyból származó RGL-GFP-C4 klónban (A), valamint a felnőtt agyból származó CTX_H (B) és MES_D (C) klónban. Az összes embrionális és felnőtt klónból lehetett O4 pozitív oligodendroglia sejteket differenciáltatni.

Ezeknek a sejteknek a mennyisége azonban eltérő volt az egyes klónokban. A dorzális és a ventrális eredetű embrionális tenyészetekben a sejtek 6-12%-a alakult át oligodendroglivá. A felnőtt klónok közül az agykéregből származó klón (CTX_H) oligodendroglia képzése kimagasló volt (23%). Szintén nagy százalékban voltak az O4 pozitív sejtek a felnőtt hippocampusból (HC_A) származó tenyészetekben (16%). A felnőtt SVZ-ből (SVZ_I, SVZ_K, SVZ_T, SVZ_M) és középagyból (MES_D)

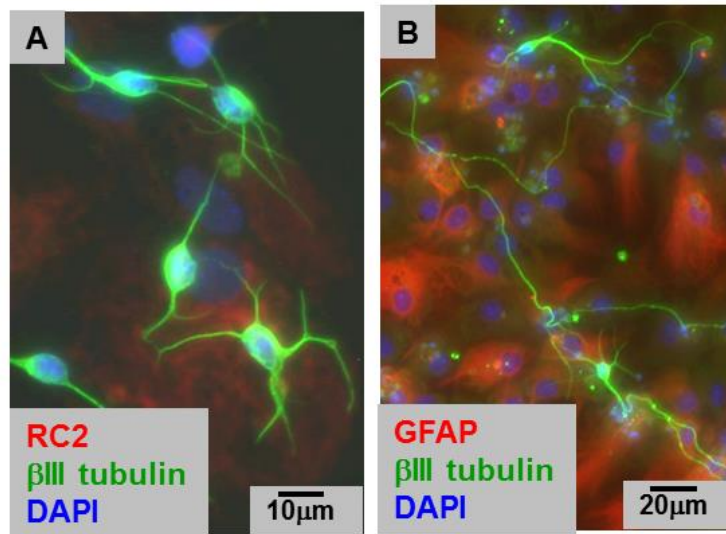
származó tenyészetekben, ugyanakkor nagyon alacsony (1-2%) volt a keletkezett oligodendroglia sejtek mennyisége (23.Ábra).



23. Ábra A klónok oligodendroglia képzésének mértéke különbséget mutatott. Az embrionális előagy ventrális területéről származó klón (RGI-GFP-A2) tenyészetében majdnem kétszer annyi oligodendroglia sejt keletkezett, mint a dorzális területől származó klón tenyészetében (RGI-GFP-C4). A felnőtt klónok közül az agykérgi (CTX_H) és a hippocampális (HC_A) klónok oligodendroglia képzése szignifikánsan nagyobb volt, mint a középagyi (MES_D) és a szubventrikuláris zónából származó klónoké (SVZ_I, SVZ_K, SVZ_M, SVZ_T).

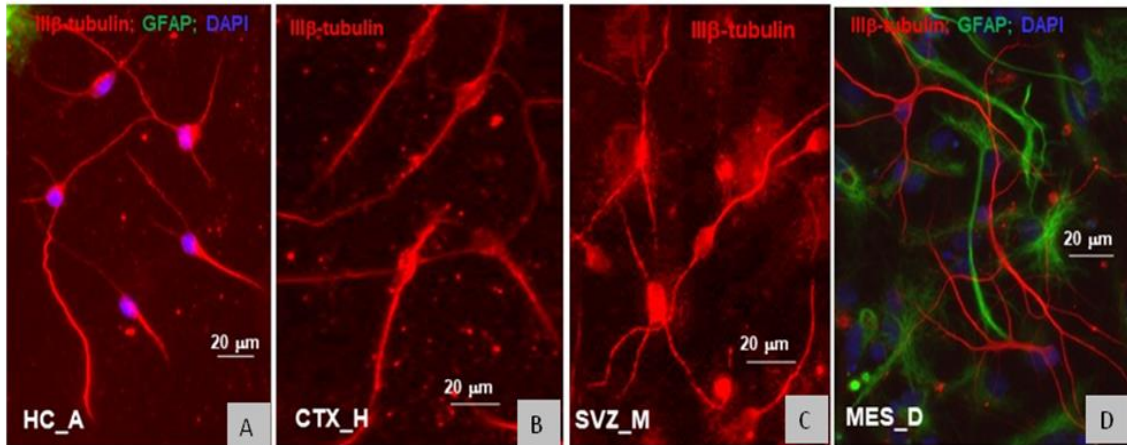
4.7 Idegsejtek képződése

Mind a felnőtt, mind az embrionális agyból izolált klónok képesek voltak idegsejteket létrehozni. A laboratóriumunkban korábban létrehozott korai (E9) embrionális idegi őssejteknel alkalmazott *all-trans retinsav*val történő idegsejt-indukció (Schlett és Madarász 1997) azonban a radiális glia-jellegű klónok egyikében sem váltott ki idegsejt-fejlődést (Orsolits és mtsai, 2013). Az indukátlan radiális glia-jellegű sejtekből idegsejtek akkor alakultak, ha konfluens, szérumentes tenyészeiteiktől megvontuk az EGF-et. Az EGF-megvonás után 5-7 nappal bipoláris, nyúlványos sejtek jelentek meg egy ellaposodott aljzatsejtréteg tetején (24.Ábra A,B). Az aljzatsejtek a felnőtt agyból izolált tenyészetek esetében erősen festődtek GFAP-ra (24.Ábra B), míg az embrionális agyból izolált tenyészeteknél az aljzatsejtek RC2 pozitívak voltak (24.Ábra A).



24. Ábra β III tubulin pozitív idegsejtek az EGF megvonás után 5-7 nappal. A bipoláris idegsejtek az embrionális klónokban RC2 pozitív aljzatsejtréteg tetején láthatók (A), a felnőtt klónokban (HC_A) pedig GFAP pozitív aljzatsejtréteg tetején (B). Az ábra az RGl klón tenyészetéről (A) és a HC_A klón tenyészetéről (B) készített felvételeket mutatja

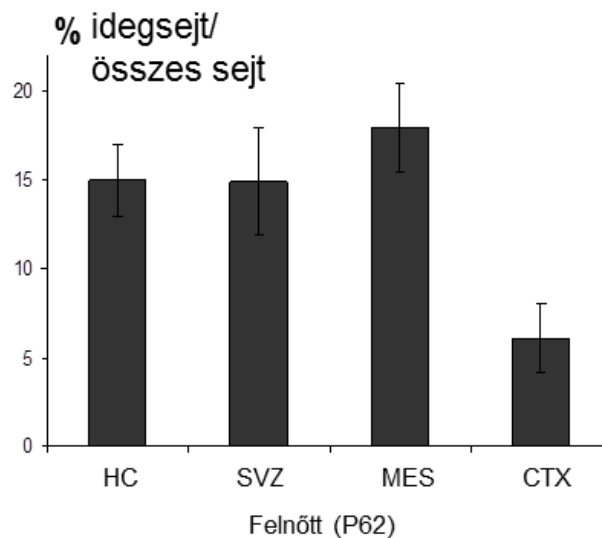
Az idegsejt morfológiájú sejtek neuron-specifikus β III tubulin pozitivitást mutattak (24. Ábra és 25. Ábra). Alakjuk, nyúlvány-hosszuk és elágazódásaik jelentős különbségeket mutattak a radiális glia-jellegű sejtek eredetétől függően. Az embrionális eredetű klónokban az indukció 5. napjától kis bipoláris, rövidnyúlványú sejtek voltak jelen, amelyek fokozatosan alakultak hosszú nyúlvánnyal rendelkező alakilag érettebbnek látszó idegsejtekké (24. Ábra A). A felnőtt hippocampusz radiális glia-jellegű sejtjeiből kevésbé elágazó nyúlvány-rendszerű, de viszonylag hosszú axonnal rendelkező sejtek alakultak (25. Ábra A). Az előagykéregből (CTX_H) és a szubventrikuláris zónából származó radiális glia-jellegű sejtekből (SVZ_M, SVZ_K, SVZ_I) a vizsgálat 8 napja alatt bipoláris alakjukat megtartó, látszólag fejletlen idegsejt-formák fejlődtek (25. Ábra B, C). A dorzális középagyi eredetű sejtekből (MES_D) fejlődő neuronok hosszú, elágazó nyúlvánnyal, fejlett idegsejt-alakkal rendelkeztek (25. Ábra D).



25. *Ábra. Különböző felnőtt egéragyi régiókból származó radiális glia-jellegű sejtek idegsejt-leszármazottai eltérő idegsejt-alakot vagy fejlettséget mutattak az in vitro indukció 7. napján.*

A: HC_A klón, B: CTX_H klón, C: SVZ_I klón, D: MES_D klón

Az in vitro kialakuló idegsejtek mennyisége is különbözött a radiális glia-jellegű sejtek eredetétől függően. Viszonylag nagy mennyiségű idegsejt (~20%) differenciálódott az összes embrionális klónból (RGI-GFP-A2, RGI-GFP-A5, RGI-GFP-B2, RGI-GFP-B5, RGI-GFP-C2 és RGI-GFP-C4, RGI). A felnőtt klónok közül az előagyi szubventrikuláris zónából (SVZ_I, SVZ_K, SVZ_T, SVZ_M) (~15%), hippocampusból (HC_A) (~15%), illetve a közepagy területéről (MES_D) (~20%) izolált klónokból. A felnőtt agykéregből izolált klón (CTX_H) tenyésztésében ugyanolyan indukciós eljárással szignifikánsan kevesebb idegsejt (~5%) képződött (26. *Ábra*).

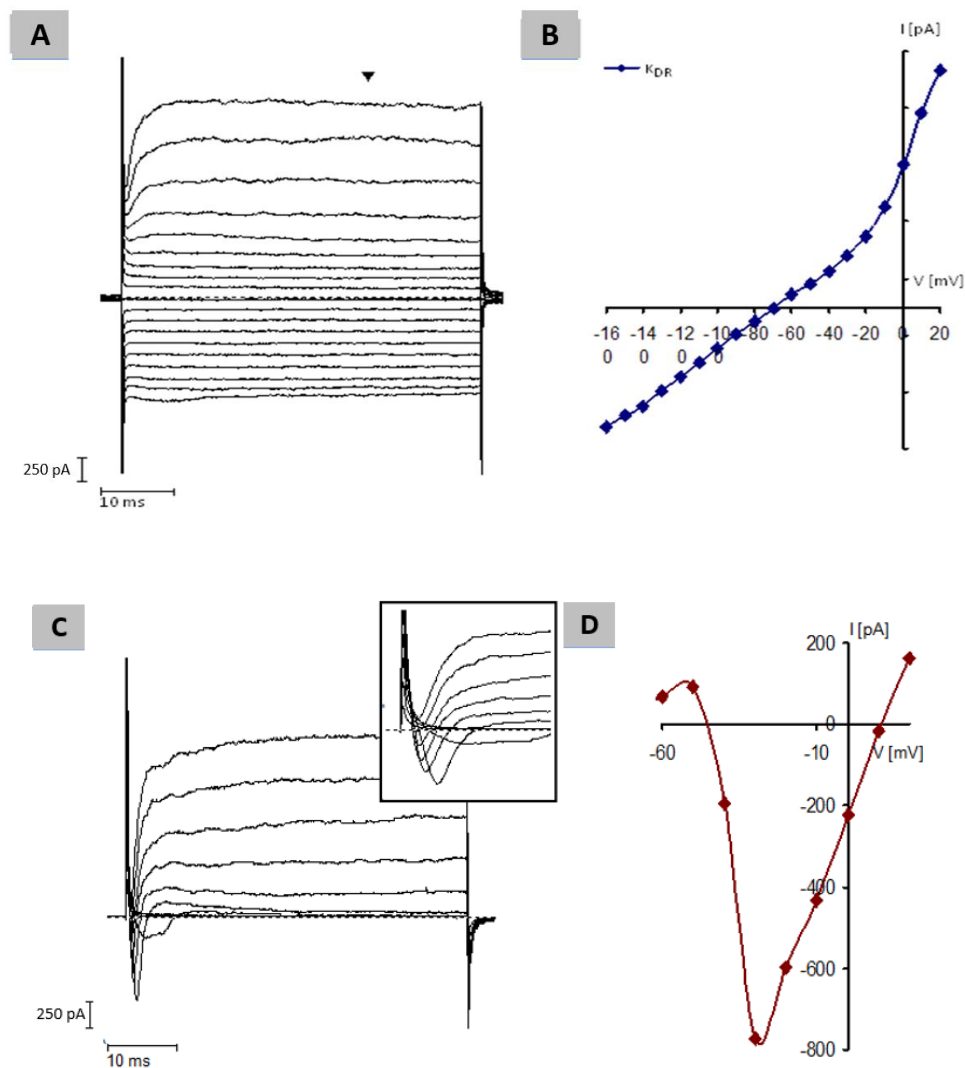


26. Ábra. Felnőtt eredetű radiális glia klónok idegsejtképzésének mértéke különbséget mutatott. 7 nappal az EGF megvonás után a felnőtt agykéregből származó klónból (CTX_H) szignifikánsan kevesebb idegsejt keletkezett, mint a többi felnőtt klónból

4.8 A radiális glia-jellegű sejtekből fejlődő idegsejtek/idegsejt előalakok elektrofiziológiai sajátosságai

Az idegsejtté/idegsejt prekurzorrá való differenciáció elektrofiziológiai sajátosságok alapján is kimutatható volt. A patch clamp méréseket dr Jelítai Márta munkatársam végezte. Míg az embrionális és a felnőtt agyból izolált radiális glia-jellegű sejtekre jellemző a nagy passzív konduktancia (4.2 ± 0.7 nS) (27. Ábra A), addig a fenti sejtekből differenciáltatott idegsejteknél/idegsejt prekurzoroknál alacsony passzív konduktanciát (0.6 ± 0.08 nS) és nagy bemenő ellenállást lehetett kimutatni (27. Ábra C). A sejtek „tartófeszültségét” (lásd Anyag és Módszer fejezet) -70 mV-ról 10 mV-onként negatív irányba változtatva, az ionáramok időben és intenzitásban is passzívan követték a feszültség-ingert. A tartófeszültség pozitív irányú változását is passzívan követték az ionáramok, egészen -30 mV - -40 mV feszültség értékig. Körülbelül -40 mV potenciál értéknél, a passzív áramok mellett a sejtek feszültségfüggő, kifelé irányuló kálium áramokat mutattak (27. Ábra A, B). A kifelé irányuló kálium áramok nem inaktiválódtak az 50 ms időtartamú tesztpulzusok alatt, jelezve, hogy késleltetett rektifikáló kálium áramokról (KDR) van szó. 20 mV-os tartó áram mellett a radiális

glia-jellegű sejtek 1781 ± 238 pA amplitudójú KDR áramokat produkáltak, ellentétben a fejlődő neuronok 780 ± 80 pA amplitudójú KDR áramaival (27. Ábra C). Az indukátlan radiális glia-jellegű sejtekben befelé rektifikáló kálium áramot vagy feszültségfüggő Na-áramot nem detektáltunk. A nyúlványos, neuronális morfológiával rendelkező sejtekben azonban a KDR áram mellett megjelent a feszültségfüggő inward nátrium áram is (27.Ábra C,D). A Na-áram -40 mV, vagy annál pozitívabb tartófeszültségeknél jelentkezett, és TTX-nal gátolható volt.



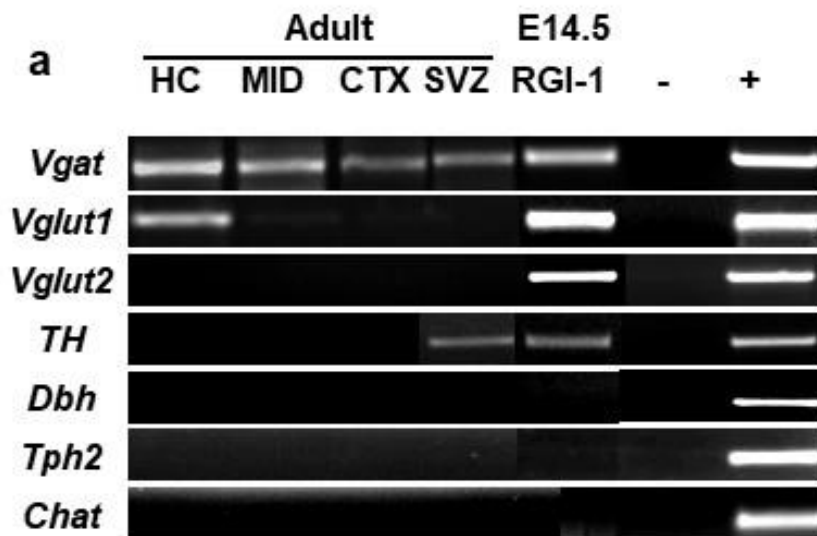
27. Ábra. **A:** az indukátlan embrionális radiális glia-jellegű (RGI klón) sejtben mért nagy passzív vezetőképesség=konduktancia, és késleltetett rektifikáló K-áram (KDR) detektálható a tartófeszültség 10 mV-os lépésként történő változtatásával, **B:** az indukátlan embrionális radiális glia-jellegű sejtben mért K-áram feszültség függésének I-V görbéje.

C: Az embrionális radiális glia-jellegű klónból (RGl) egy in vitro alakult idegsejt reprezentatív tartófeszültség-áram profilja 10 mV feszültség-lépések (-160 mV to +20 mV) mellett. D: a mért neuron áram/feszültség (I-V) görbéje

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

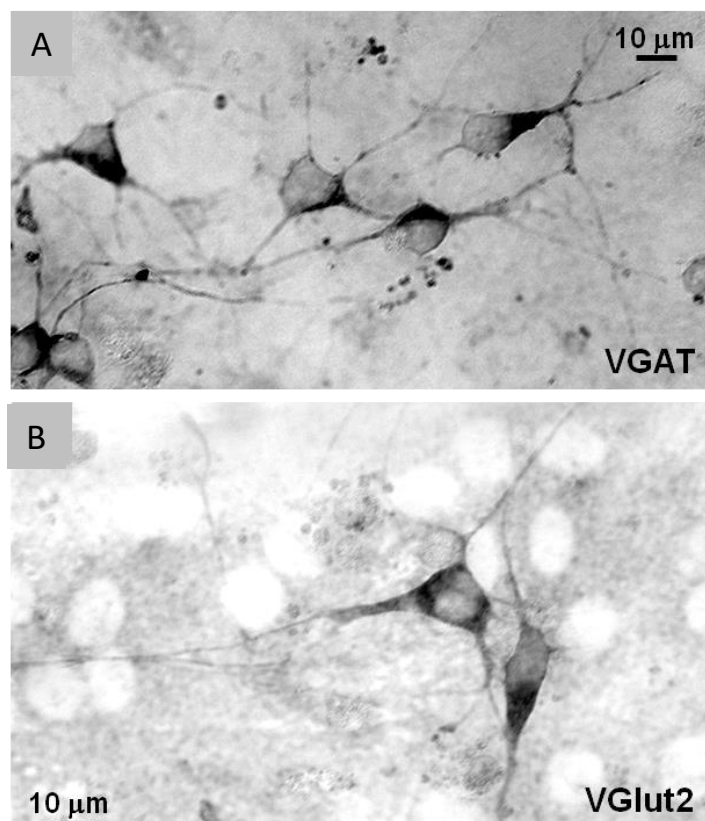
Miután különböző agyi régiókból sikerült egymáshoz hasonló sajátságú radiális glia-jellegű sejteket klónoznunk, felmerült a kérdés, hogy az egyes régiókra és fejlődési időszakokra jellemző neurotranszmitter-elköteleződés (Spitzer 2012; Borodinsky és mtsai, 2015) jelentkezik-e a radiális glia-jellegű sejtekben.

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 (28. Ábra). Más neurotranszmisszióra jellemző gének expressziója jelentősen függött a radiális glia-jellegű sejt eredetétől és a forrás agyszövet korától.



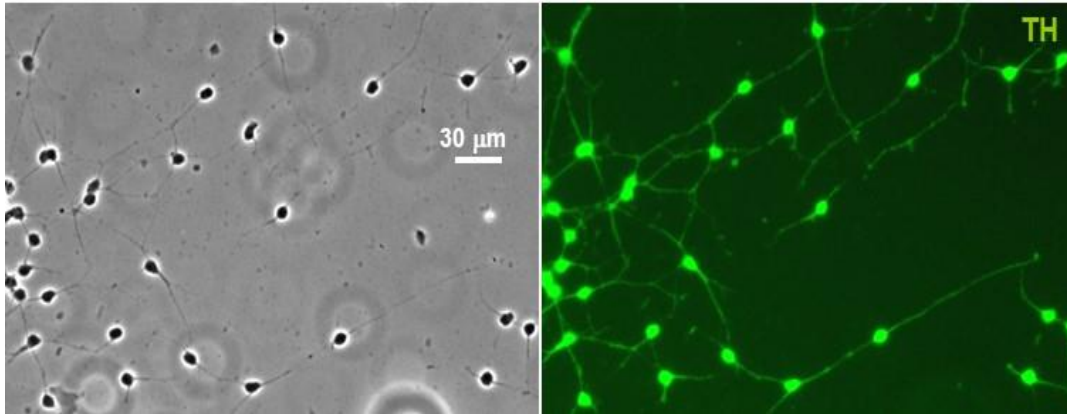
28. Ábra Neurotranszmitter fenotípust jelző gének expressziójának RT-PCR vizsgálata a radiális glia-jellegű felnőtt klónokban és az embrionális RGl klónban.

Az embrionális eredetű radiális glia-jellegű klónban a GABA anyagcserére jellemző (*vgat*) gén mellett expresszálódtak a glutamát vezikuláris transzporterét kódoló *vglut1*, *vglut2*, valamint a katekolamin anyagcsere tirozinhidroxiláz (TH) enzimét kódoló gén is (28.Ábra). Azonban a noradrenerg, szerotonerg és kolinerg idegsejtekre jellemző gének expressziója (*pitx3*, *dbh*, *tph2*, *chat*) embrionális eredetű klónban nem volt megfigyelhető (28.Ábra). A 2-es típusú glutamát transzporter (vGLUT2) mRNS-e csak az embrionális klónban volt kimutatható. Az embrionális RGI eredetű idegsejtekben a megfelelő fehérjék expresszióját is kimutattuk (29.Ábra).



29. Ábra Az embrionális RGI klónból differenciáltatott idegsejtekben fehérje szinten is kimutatható volt a GABA-erg idegsejtekre jellemző vGAT (A) és a glutamaterg idegsejtekre jellemző vGlut2 (B) expressziója

A felnőtt eredetű radiális glia-jellegű sejtekből fejlődő neuronokban az 1-es típusú glutamát transzporter (vGLUT1) kizárólag a hippocampális klónban (HC_A) expresszálódott (28.Ábra). A tirozinhidroxiláz (TH) a felnőtt agyi szubventrikuláris zónából izolált klónokban kifejeződött (28. Ábra). A TH fehérje jelenlétét immuncitokémiai módszerrel is sikerült igazolni (30.Ábra).



30. ábra. Tirozinhidroxiláz-pozitív idegsejtek a szubventrikuláris zóna eredetű SVZ_M sejtek leszármazottai között.

DBH mRNS-ének a hiánya ugyanakkor azt mutatta, hogy a felnőtt szubventrikuláris zóna eredetű sejtek dopaminerg típusú idegsejteké differenciálódtak (28. Ábra).

A szerotonerg és a kolinerg neurotranszmitter fenotípust a felnőtt eredetű klónokban nem tudtuk kimutatni (28.Ábra).

Az adatok azt jelzik, hogy az ősz/progenitor stádiumban környezetükből kiemelt sejtek fejlődési lehetőségei még „megengednek” olyan fejlődési irányokat, amelyek az in vivo fejlődés során „tiltottak” az adott régióból fejlődő idegsejtek számára. A környezet sejt-sorsot befolyásoló hatásainak vizsgálata elengedhetetlen annak megértésében, hogy a még többé-kevésbé nyitott fejlődési lehetőségekkel rendelkező idegi ősz/progenitor sejtek fejlődésmenetét megérthessük és kellő tudás birtokában, klinikai célokra is alkalmazhassuk.

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

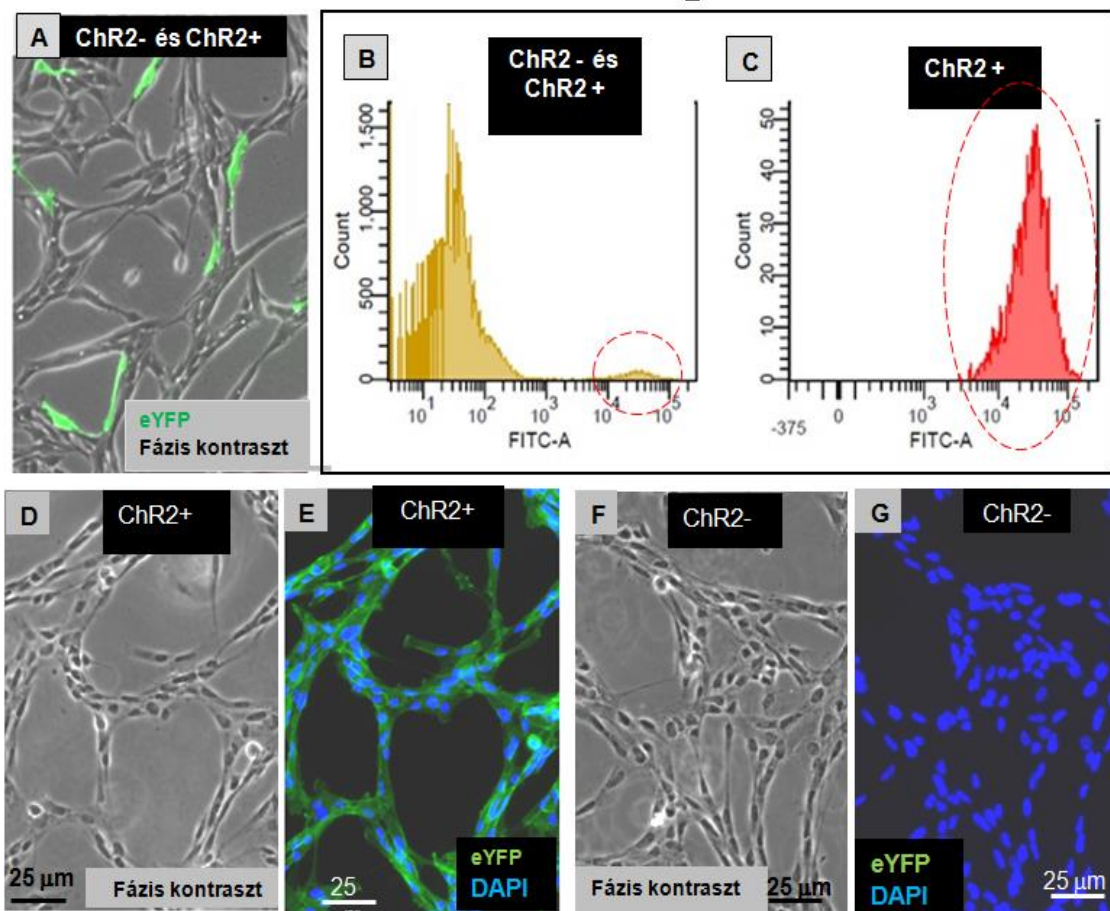
Miután az idegi ősz/progenitor sejtek teljes élettartamuk alatt ki vannak téve olyan a környezetből érkező bioelektromos vagy kémiai ingereknek, amelyek a sejtek ionháztartását jelentősen befolyásolják, vizsgáltuk a radiális glia-jellegű sejtek kationos

stimulációra adott válaszait. A lehetséges sejtválaszok közül elsősorban a progenitor sejtek sorsának meghatározásában alapvető szerepet játszó sejtváándorlás és idegsejttéérés jelenségeit vizsgáltuk. Az intakt sejtek ionháztartásának nem-invazív befolyásolására az optogenetikai módszerek nyújtottak lehetőséget. Ezért olyan radiális glia-jellegű populációkat állítottunk elő, amelyek stabilan expresszálták membránjukban a fény hatására megnyíló Channelrhodopsin2(H134) kationcsatornát.

4.10 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 expresszálódik (Niwa és mtsai 1991, Alexopoulou és mtsai 2008). A fúziós fehérje stabilitását, valamint, hogy a YFP a channelrhodopsin2 csatorna működését nem befolyásolja Madisen és mtsai 2012 bizonyították. Hasonlóan a korábban leírt embrionális agyból származó sejt kultúrákhoz a sejtek az AK-cyclo(RGDfC)-vel borított aljzaton, szérumentes tápoldatban kezdetben aggregátumokba tömörültek, majd benőtték az aljzatot.

Miután a sejtek néhány átültetést követően homogén és konfluens tenyészeteket alkottak pTurbo-Cre plazmival (Hug és mtsai, 1996) indukáltuk a channelrhodopsin csatorna expresszióját. 1 hét elteltével nagyjából a sejtek 5%-a eYFP fluoreszcenciát mutatott (31. Ábra A). A konfluens tenyészeteket felemésztettük az aljzatról és az eYFP-t expresszáló tehát channelrhodopsin-t tartalmazó sejteket, valamint az eYFP-t nem expresszáló sejteket FACS segítségével elkülönítettük egymástól (31. Ábra B, C). Innentől kezdve a channelrhodopsin-t expresszáló (ChR2+) (31. Ábra D, E) és a channelrhodopsin-t nem expresszáló sejteket (ChR2-) (31. Ábra F, G) egymástól elkülönítve tenyésztettük tovább.



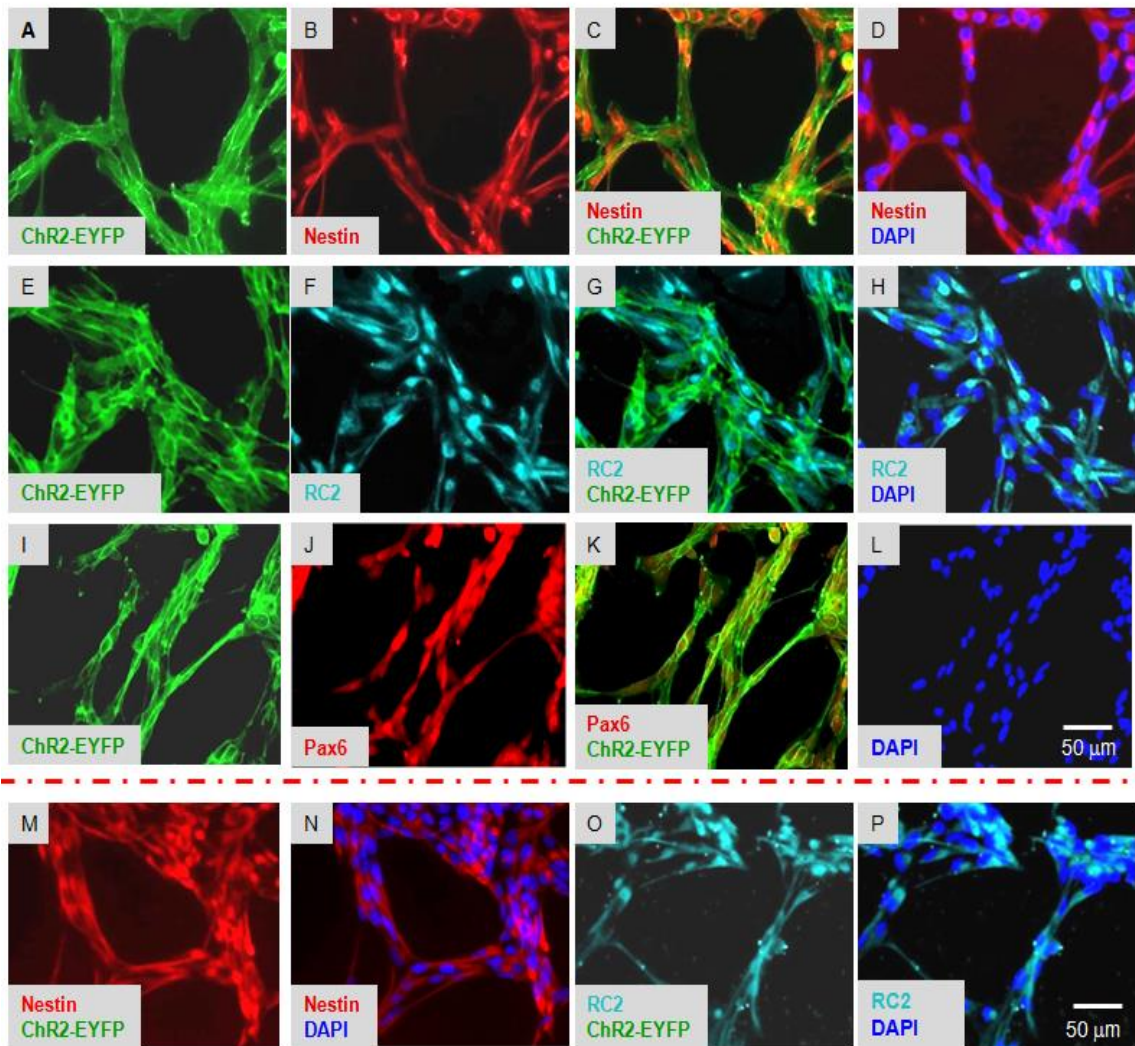
31. Ábra **A:** fluoreszcens és fáziskontraszt mikroszkópos felvétel a radiális glia-jellegű sejtek kiültetésének 7. napján azt mutatta, hogy viszonylag kevés sejt tartalmazott a ChR2-eYFP fehérjét. **B:** FACS analízis eredménye szerint a sejtek kevesebb, mint 5%-a volt eYFP, azaz ChR2 pozitív. **C:** A fluoreszcencia alapján kiválogatott (FACS-sorted) populáció gyakorlatilag 100%-ban ChR2-eYFP pozitív sejteket tartalmazott. A mikroszkópos vizsgálatok szerint a ChR2-eYFP pozitív (ChR2+) sejtek (**D,E**) morfológiája nem tért el ChR-eYFP negatív (ChR2-) sejtek (**F,G**) alakjától.

Annak érdekében, hogy teljes mértékben kizárjuk annak lehetőségét, hogy a ChR2 csatorna a látható fény kék/UV komponensére spontán aktiválódjon, a mindennapos rutin vizsgálatok során is alufóliával letakarva szállítottuk a tenyésztőedényeket, a sejteket pedig kék fényt kiszűrő filtert tartalmazó mikroszkóppal vizsgáltuk.

A vizsgálatok során a ChR2+ és a ChR2- sejteket tartalmazó tenyészetek között sem morfológiai, sem immuncitokémiai különbséget nem találtunk (32.Ábra). A radiális glia

markerek immuncitokémiai eljárással kimutathatóak voltak a ChR2⁺ és ChR2⁻ sejtekben. A ChR2⁺ és ChR2⁻ sejtek tenyészetében is expresszáldott a Nesztin (32. Ábra A, B, C, D, M, N), az RC2 (32. Ábra E, F, G, H, O, P) és a Pax6 (32. Ábra I, J, K, L) fehérje.

ChR2⁺



ChR2⁻

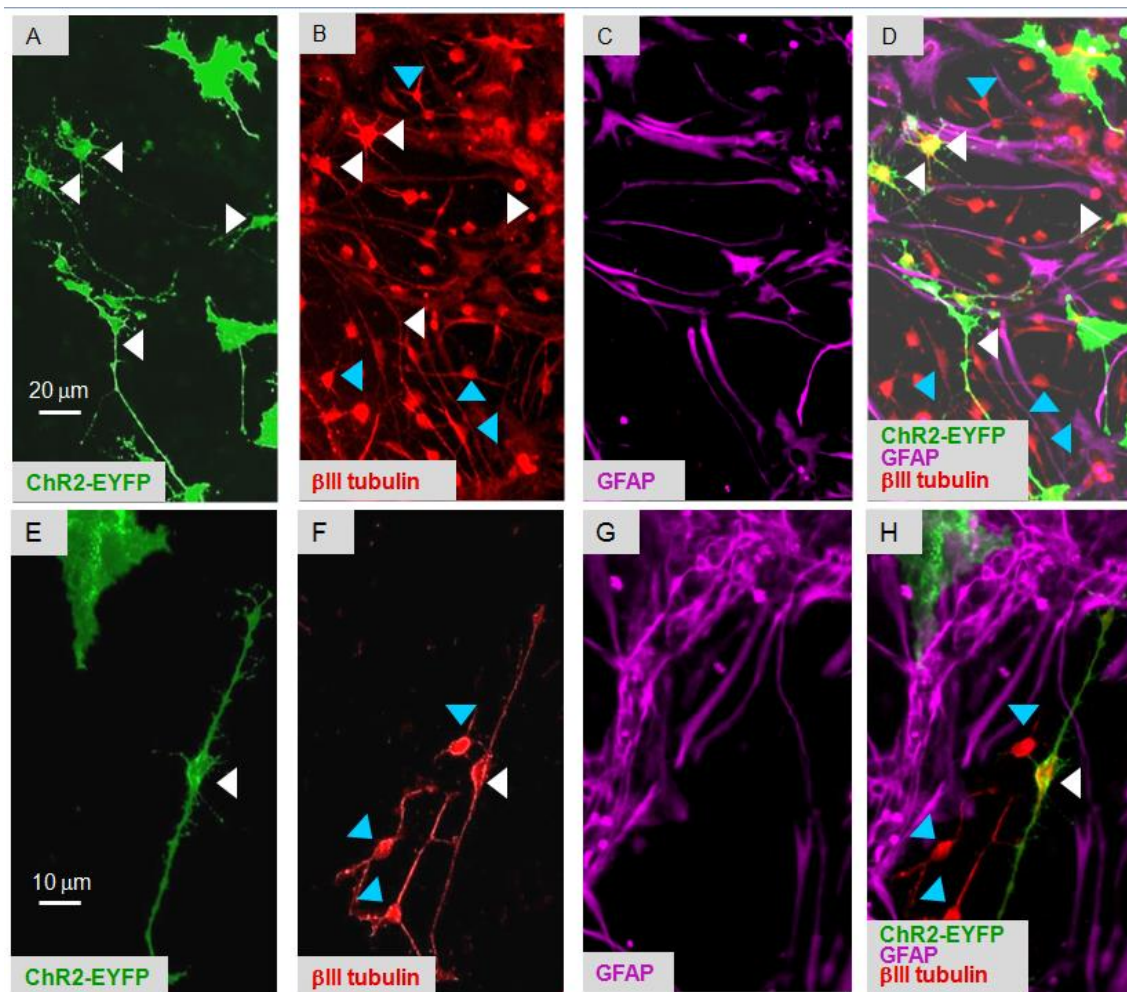
32. Ábra. A ChR2⁺ sejteket az eYFP fluoreszcenciája alapján azonosítottuk (A, C, E, G, I, K). Mind a ChR2⁺ (A-L), mind a ChR2⁻ (M-P) sejtekben expresszáldtak a radiális glia sejtekre jellemző marker fehérjék: Nesztin (B,C,D,M,N: piros), RC2 (F,G,H,O,P: türkiz) és a Pax6 (J,K: piros). Kékkel a DAPI-val festett sejtmagokat jelöltük. Azonos látóterekről készült fluoreszcens felvételek: A-D; E-H; I-L; M-N; O-P.

Az adatok azt mutatták, hogy a radiális glia- jellegű sejtek jellemző sajátosságait a ChR2 eYFP konstrukció kifejeződése nem változtatta meg. Külön kísérletek során vizsgáltuk, hogy a konstrukció expressziója befolyásolhatja-e a radiális glia- jellegű sejtek idegsejtképzését.

4.11 Channelrhodopsin2+ radiális glia-jellegű sejtek idegsejt képzése

A radiális glia-jellegű sejtek idegsejtképző képességét – a közvetlen összehasonlíthatóság érdekében - olyan sejt kultúrákban vizsgáltuk, amelyek vegyesen tartalmazták a channelrhodopsint expresszáló és nem expresszáló sejteket. A tenyészeteket fénytől védve tartottuk, a mikroszkópos elemzéseket csakis kék fényt át nem eresztő szűrő mellett végeztünk. A ChR2+ sejteket az eYFP fluoreszcencia segítségével, a differenciálódó sejt típusokat (idegsejteket és asztroglia sejteket) immuncitokémiai festéssel azonosítottuk.

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, β III tubulint hordozó neuronok (33. Ábra).

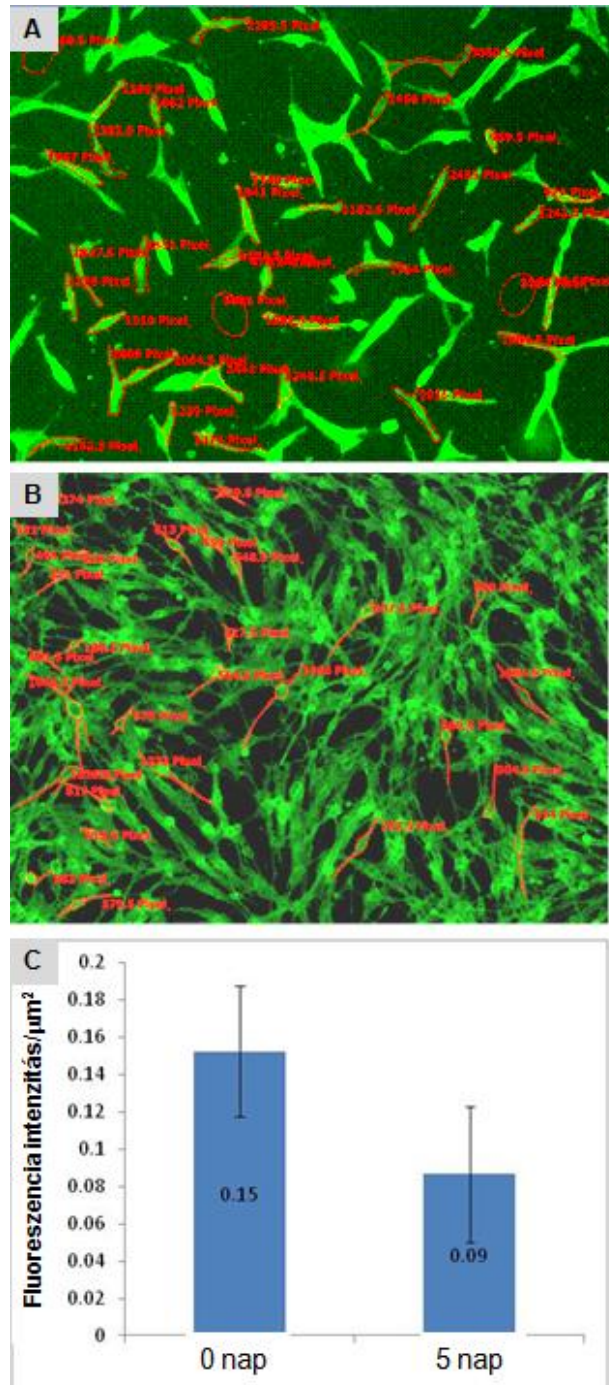


33. Ábra. 5 nappal az EGF megvonása után a ChR2+ és ChR2- sejteket vegyesen tartalmazó tenyészetekben β III tubulin-t expresszáló idegsejt prekurzorok (B, D, F, H) jelentek meg, mind a chanelrhodopsin-t expresszáló(Δ), mind a chanelrhodopsin-t nem expresszáló(\blacktriangle) sejtekből differenciálódva. A GFAP pozitív, ellaposodott asztroglia sejtek szintén megfigyelhetőek voltak a ChR2+ és a ChR2- sejtek között is (C,D,G,H). A nyúlványos, β III tubulin pozitív idegsejteket nagyobb nagyításban az E-H ábrák mutatják.

Az adatok azt mutatták, hogy fénytől elzárt tenyésztési és kezelési körülmények mellett a fényérzékeny csatornát tartalmazó sejtek idegsejtképző képessége nem sérült.

Az idegsejtté való differenciálódást jelentős mértékű sejthalál kíséri, mind ChR2+, ChR2- mind a chanelrhodopsin-eYFP konstrukciót nem hordozó „vad típusú” tenyészetekben. A sejthalál mértékét a ChR2-expresszió nem fokozta

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+ (FACS-szal szelektált) indukátlan és idegsejt irányban differenciáltatott radiális glia-jellegű tenyészetekről. Axiovision programmal megmértük az egyes sejtek területét és a sejterület fluoreszcencia-intenzitását (34. ábra A,B). A fluoreszcencia intenzitásokat elosztva a megfelelő sejterülettel megkaptuk az 1 μm^2 sejterületre eső fajlagos fluoreszcencia intenzitás értékeit. Meghatároztuk 20-20 indukátlan 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 (34. ábra C).

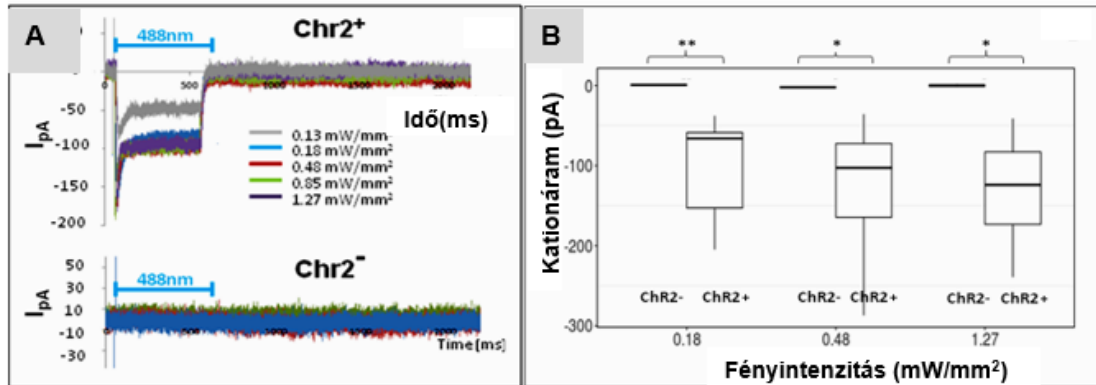


34. Ábra. Az Axiovision programmal mért sejtek területe és az eYFP fluoreszcencia intenzitása indukátlan radiális glia-jellegű tenyészetekben (A) és EGF megvonás után 5 nappal (B). A fluoreszcencia intenzitásokat elosztva a megfelelő sejt területtel megkaptuk a fluoreszcencia intenzitás értékeket $1 \mu\text{m}^2$ -ra vonatkoztatva (C), amelyek átlagát és szórását kiszámolva nem volt szignifikáns különbség az indukátlan és az indukált tenyészetek között ($n > 20$).

4.12 Channelrhodopsint expresszáló sejtek fényingerre adott válasza

Az indukátlan radiális glia sejteket kék fényel világítottuk meg (λ : 488 nm), hogy ellenőrizzük fényérzékeny channelrhodopsin csatornák nyitására meginduló kation áramokat.

Patch clamp mérésekkel igazoltuk, hogy a kék fény (λ : 488 nm) kation áramokat indukál a channelrhodopsin-t expresszáló sejtekben. A channelrhodopsin-t nem expresszáló sejtekben fényre aktiválódó kationáramok nem jelentek meg (35.Ábra A). A sejteket megvilágító fény intenzitását szintén a patch clamp mérések során teszteltük (35. Ábra B). Fokozatosan növeltük a fényintenzitást 0,13 mW/mm² és 1,3 mW/mm² felületre eső fényteltjesítmény értékek között, és mértük a kiváltott ionáram amplitúdóját. Az adatok szerint, a fényintenziás növelésével nőtt a kationáram amplitúdója, 0,5 mW/mm² intenzitás felett biológiailag releváns válasznövekedést már nem detektáltunk (35. ábra A).



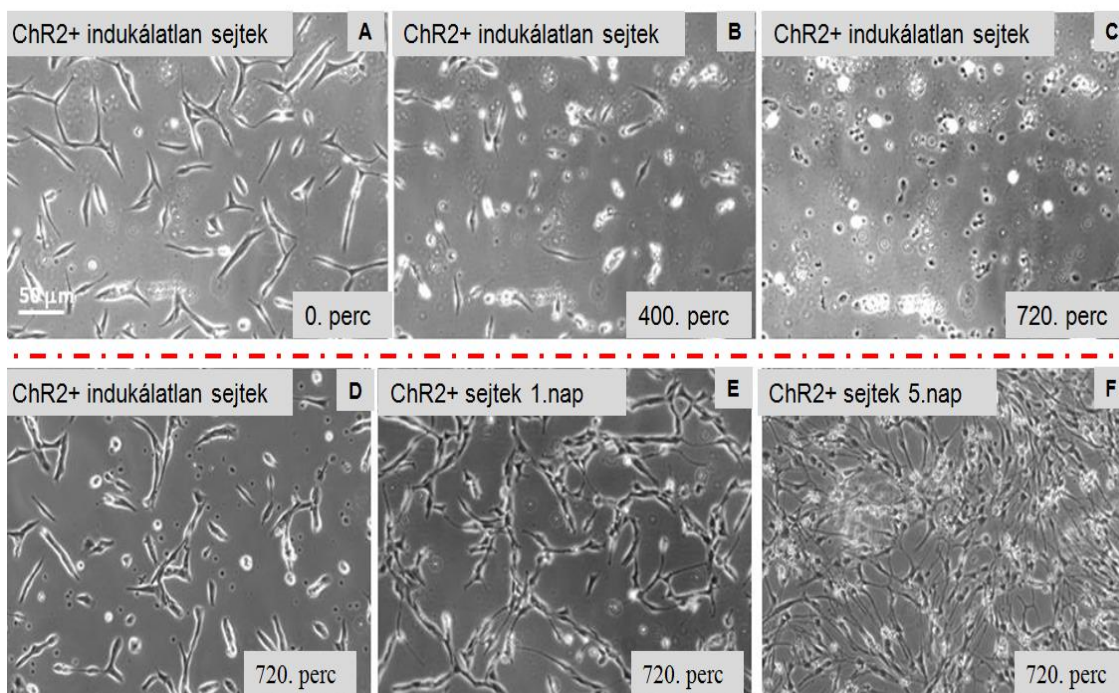
35. Ábra. **A:** reprezentatív regisztrátum sorozat Chr2+ és Chr2- radiális glia-jellegű sejtekből. Felső regisztrátum: Chr2+ radiális glia-jellegű sejtekben befelé irányuló kation áramokat mutattunk ki, amelyek nagysága a megvilágító lézer intenzitásától függött. Alsó regisztrátum: Chr2- radiális glia-jellegű sejtekben a legnagyobb lézerintenzitással (1.27 mW/mm²) sem tudtunk ionáramokat kiváltani. **B:** A fénykiváltott áramok csúcsamplitúdóinak eloszlása a megvilágító fény intenzitásának függvényében (Chr2- sejtek: n = 4, Chr2+ sejtek: n=7)

A fényel nyitható ChR2 csatornákat hordozó (ChR2+) és csatornákat nem expresszáló radiális glia-jellegű sejtek birtokában megvizsgálhattuk, hogy a radiális glia- jellegű idegi ős/progenitor sejtek vándorlását hogyan befolyásolja a kationeloszlás kísérletes változtatása.

4.13 Az indukált kationáramlás hatása a radiális glia-jellegű sejtek mozgására

Miután a sejtek in vitro elmozdulása csak viszonylag hosszú – több órás – felvételek elemzésével vizsgálható, a sejtek helyváltoztató mozgását csak hosszú idejű megvilágítás alatt/után tudtuk meghatározni. Meg kellett győződnünk arról, hogy a több órán át tartó ismételt megvilágítás, illetve az ezáltal kiváltott kationáramlás károsítja-e a sejteket. Különböző intenzitású, 300 ms hosszúságú megvilágítást különböző időtartamon át 5 percnként ismételve azt találtuk, hogy a ChR2+ sejtek 400 perc után már károsodnak, és 12 óra alatt elpusztulnak, ha megvilágító fény intenzitása nagyobb, mint $0,25\text{mW/mm}^2$ (36. Ábra A,B,C). A fényerőt $0,13\text{ mW/mm}^2$ értékre csökkentve tudunk olyan feltételeket biztosítani, amelyek mellett mind az indukálatlan mind a differenciálódó sejtek osztódóképesek és differenciációra képesek maradtak 12 óra kísérleti időtartam után is (36. Ábra D, E, F).

Fényintenzitás: 0.27 mW/mm^2



Fényintenzitás: 0.13 mW/mm^2

36. Ábra. A-C: Fázis kontraszt felvételek a radiális glia- jellegű ChR2+ sejtekről a megvilágítás kezdetén (A: 0.perc), az 5 percnként ismétlődő, 300 ms hosszú, 0.27 mW/mm^2 -es intenzitású kék fényvel való megvilágítás kezdete utáni 400. (B) és 720. percben (C). A sejtek többsége a 720 perc (12 óra) kitettség alatt elpusztult (C).

D-F: 5 percnként ismételt 300ms hosszú megvilágítás 0.13 mW/mm^2 - es fényintenzitás mellett nem okozott sejthalált sem az indukátlan sejteknél (D), sem az idegsejt-indukció 1. (E), vagy 5. (F) napján.

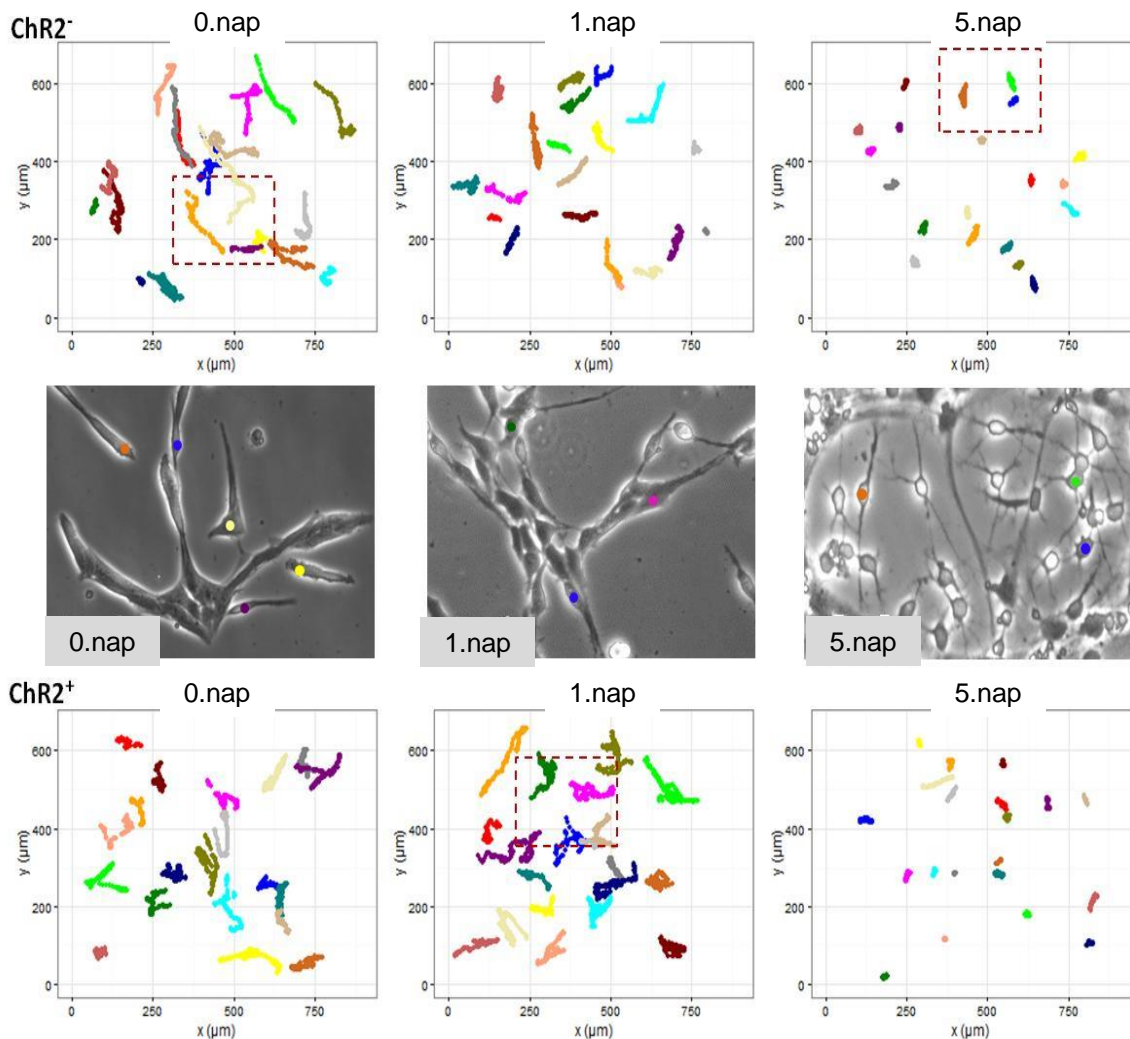
A fényérzékenység adatai alapján, a motilitás vizsgálatokhoz 0.13 mW/mm^2 teljesítményű, egyenként 300 ms időtartamú fényimpulzusokat alkalmaztunk 5 percnként ismételve, 12 órán át. A vizsgálandó ChR2+ és ChR2- radiális glia- jellegű sejtek tenyésztéseit a mikroszkóp tárgyasztalán rögzített miniinkubátorban helyeztük el, amelyben 37°C hőmérsékletet, és 95% levegő 5% CO₂-ot tartalmazó gázkörnyezetet biztosítottunk. Minden egyes fényimpulzus után a sejtekről fázis-kontraszt felvétel készült.

Azonos megvilágítás-sorozatok mellett 12 órán át vizsgáltuk ChR2+ és ChR- sejtek elmozdulását indukátlan radiális glia-jellegű állapotban, illetve az idegsejt

differenciálódás indukciójának 1. és 5. napján. Az idegsejt irányba differenciáltatott sejtek tenyészetében olyan sejteket választottunk elemzésre, amelyek alakilag az idegsejtté alakulás jeleit hordozták; lekerekedett kis sejttel és hosszú nyúlványokkal rendelkeztek. Kontrollként elemeztük a Chr2+ sejtek elmozdulását megvilágítás nélkül is.

4.14 A sejtmozgás adatainak elemzése

A látható fényben készült képsorozatokon az egyes sejtek középpontjának elmozdulását követtük nyomon a WTrack szoftver segítségével (Gönci et al., 2010). 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 (37.Ábra).



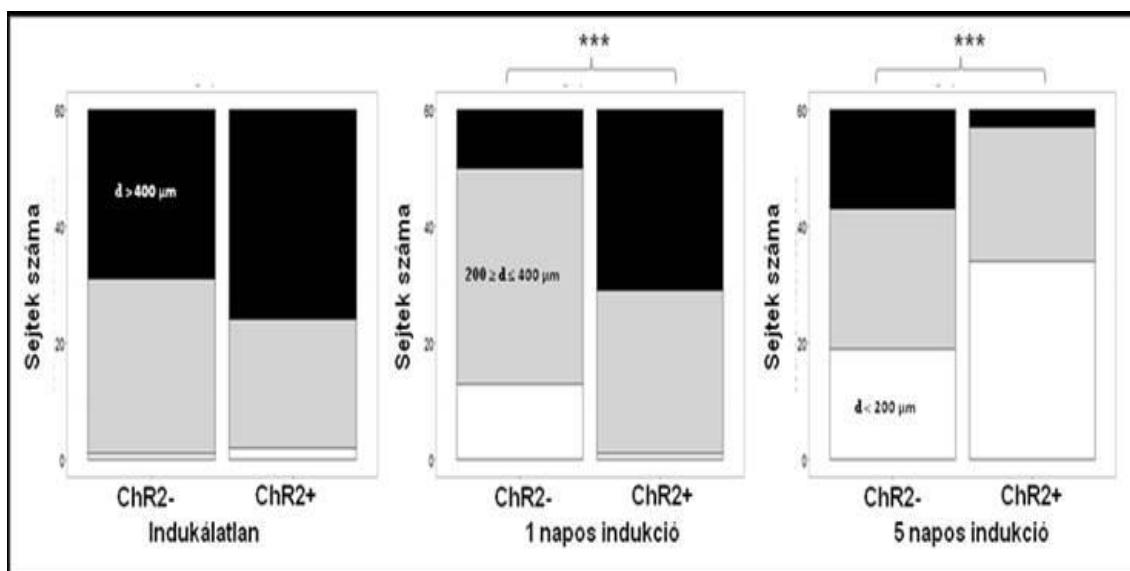
37. Ábra. Reprezentatív ábrák a *ChR2*-t nem expresszáló (*ChR2*⁻) és *ChR2*-t expresszáló (*ChR2*⁺) sejtek útvonaláról. A fázis-kontraszt felvételeken lévő színes pontok azoknak a sejtek középpontját jelölik, amelyeket nyomon követtünk a trajektogram-on. A téglalapok a fáziskontraszt képeken színes pontokkal jelölt sejtek útvonalait határolják.

A trajektoria görbékről szemmel leolvasható volt, hogy a sejtek által „bejárt” útvonal az idegsejté alakulás időszakában jelentősen csökken. Ez a mozgás-redukció az idegsejt-indukció 5. napján a *ChR2*⁺ sejtek esetén kifejezettebb volt, mint *ChR2*⁻ sejteknél. A kezdeti trajektogram elemzések azt is felvetették, hogy az indukció 1. napján a *ChR2*⁺ sejtek mozgása felgyorsul a *ChR2*⁻ sejtek mozgásához képest.

A megfigyelt sejtmozgásokat részletesebb adat- és eloszlás-vizsgálatokkal elemeztük tovább.

A sejtvándorlás elemzésénél figyelembe kellett venni, hogy az elnyújtott alakú radiális glia-jellegű sejtekben a sejtmag helyzete változhat a sejt tényleges elmozdulása nélkül

(intracelluláris magvándorlás), és ezzel az általunk sejt-középpontként kijelölt koordináták a nélkül is változhatnak, hogy a tényleges sejt-elmozdulás történne. Egy sejt mozgását akkor tekintettük migrációnak, ha a sejt középpontja kétszer akkor távolságra mozdult el a 12 óra alatt, mint a sejt legnagyobb hossza. Mivel a radiális glia-jellegű sejtek átlagos hossza nem haladja meg a 100 μm -t, ezért a 12 óra alatt 200 μm -nél nagyobb elmozdulást már helyváltoztató mozgásnak, migrációnak tekintettük. 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 (38. Ábra).

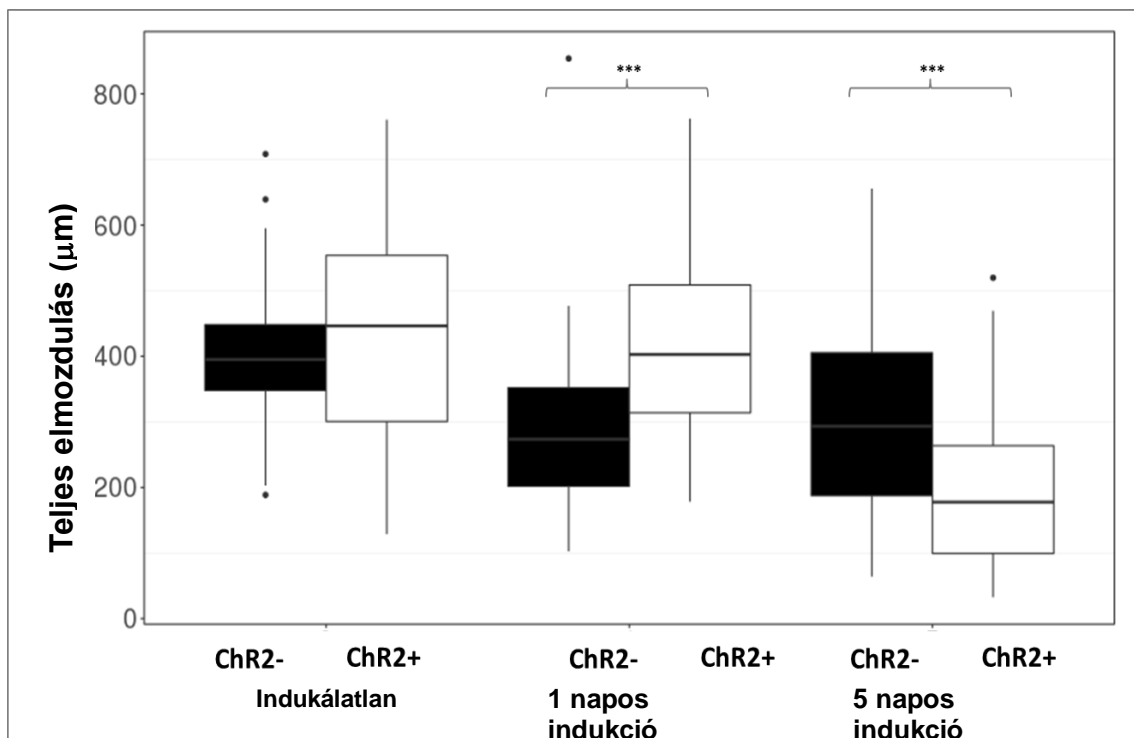


38. Ábra. A Chr2+ és a Chr2- sejtek mozgását indukálatlan (0 napos $n=60+60$) 1 napos indukált ($n=60+60$) és 5 napos indukált ($n=60+60$) tenyészeteken vizsgáltuk 3 független kísérletsorozatban. A 12 óra alatt különböző távolságokat megtett (fekete: $d > 400 \mu\text{m}$, szürke: $200 \mu\text{m} \leq d \leq 400 \mu\text{m}$; fehér: $d < 200 \mu\text{m}$) sejtek számát meghatároztuk. A szignifikanciát Pearson's Chi-squared teszttel és post-hoc Fisher teszttel számoltuk. A szignifikáns ($p < 0.001$) különbségeket *** -al jelöltük.

A migráció-elemzés azt mutatta, hogy indukálatlan radiális glia-jellegű sejtek tenyészetekben gyakorlatilag nincs „álló” sejt: az indukálatlan radiális glia-jellegű sejtek migráló sejtek, függetlenül az indukált kationáramok jelenlététől. Az indukció 1. napján a Chr2+ sejtek migrációs aktivitása megnőtt az indukálatlan sejtek aktivitásához képest, míg a Chr2- sejtek migrációs aktivitása csökkent. Az indukció 5. napján a

Chr2+ és Chr2- sejtek motilitása is jelentősen lecsökkent az indukátlan sejtek migrációs aktivitásához viszonyítva. A Chr2+ sejtek az idegsejtté történő differenciálódás 5. napján szignifikánsan kisebb migrációs aktivitást mutattak, mint a Chr2- sejtek (38. Ábra). Azoknak a sejteknek a száma, amelyek 12 óra alatt nagyobb távolságra migráltak, mint 400 μ m jelentősen csökkent az idegsejtté való differenciáció 5. napján (38. Ábra).

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 (39. Ábra).

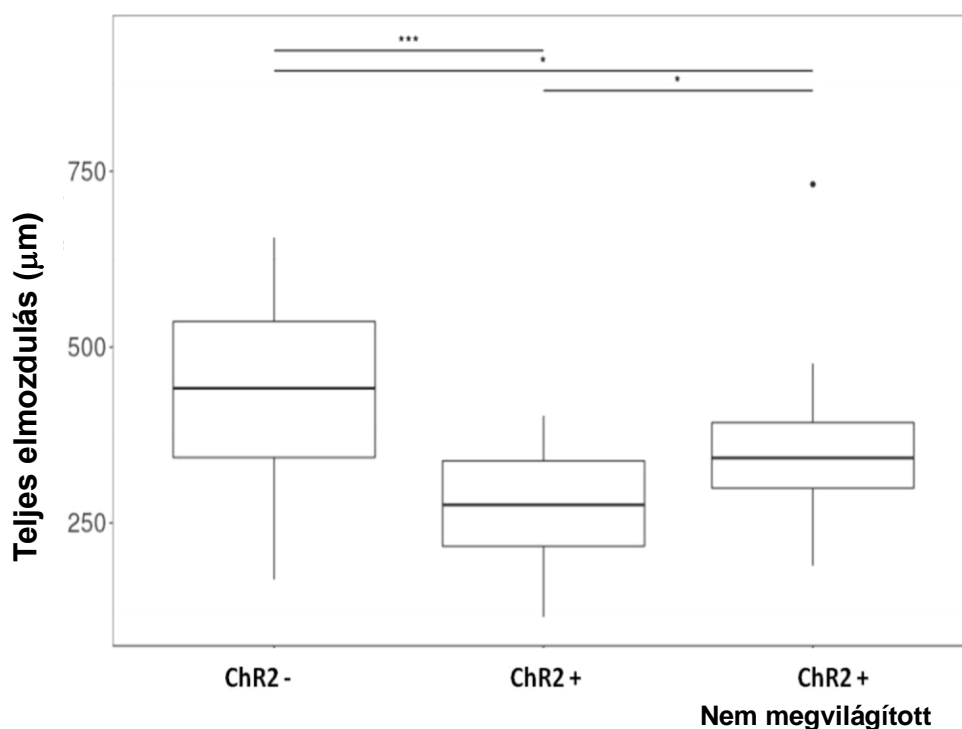


39. Ábra. A sejtek teljes elmozdulása 12 óra alatt, különböző differenciációs stádiumokban (indukátlan, 1 napos indukció, 5 napos indukció), ismétlődő megvilágítás mellett. A szignifikáns különbségeket Wilcoxon- Mann-Whitney teszttel határoztuk meg. $n=60$ minden kísérletcsoportban; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

A kontrol (Chr2-) sejtek motilitása az indukciót követő 1.napon enyhén, majd az 5. napon, amikor már megjelentek a nyúlványos, β III tubulin-pozitív idegsejtek, szignifikánsan csökkent (39. Ábra). A fényérzékeny (Chr2+) sejtek ettől eltérő módon reagáltak az ismételt fényimpulzusokra. Az indukátlan Chr2+ sejtek mozgási

aktivitása nagy szórást mutatott, (39. Ábra), jelezve, hogy egyes sejtek motilitás-növekedéssel válaszoltak a megvilágításra. Egy nappal az indukció után, az elmozdulások átlagos távolsága szignifikánsan nagyobb volt a kontroll (ChR2-) sejtekhez képest (39. Ábra). Az indukciót követő 5.napon ugyanakkor, a chanelrhodopszint expresszáló sejtek migrációs úthossza nagymértékben csökkent a chanelrhodopszint nem expresszáló (kontrol) sejtekhez képest.

Felvetődött az a kérdés, hogy vajon okozhat-e önmagában is, célzott megvilágítás nélkül, motilitás-változást a genomba beillesztett, majd fehérje formában expresszálódó ChR-eYFP konstrukció. Ezért olyan kísérletsorozatot végeztünk, amelyben a ChR2-t expresszáló (ChR2+) sejtek mozgásait célzott megvilágítás nélkül elemeztük. A ChR2-t expresszáló, 5 napon át indukált sejtek migrációs aktivitása közvetlen megvilágítás nélkül is csökkent a ChR2-t nem expresszáló sejtekhez képest (40.Ábra). A kék fényvel történő megvilágítás azonban fokozta az aktivitás csökkenést.



40. Ábra. ChR2+ és a ChR2- sejtek megvilágítás melletti, illetve ChR2+ sejtek megvilágítás nélküli elmozdulása az indukció 5. napján, 12 óra alatt. A szignifikanciát Kruskal-Wallis rank-sum tesztel és Dunn's tesztel számoltuk ki. $n=20$; * $p<0.05$, *** $p<0.001$.

Az adatokból az valószínűsíthető, hogy a ChR2⁺ sejtekbe kék fényel történő megvilágítás nélkül is, pusztán a kezelések során elkerülhetetlen „fehér” fény hatására, fiziológiásan hatékony mennyiségű ion áramolhat be a csatornán keresztül. A megfelelő hullámhosszúságú kék fényel történő stimuláció azonban jelentősen növelheti a beáramló kationok mennyiségét, és így szignifikánsan befolyásolja a sejtek mozgási aktivitását.

Bár a fehérje-konstrukció esetleges közvetlen hatását a citoskeletális eseményekre az adatok nem zárhatják ki, az eredmények alapján egyértelmű, hogy a fény-indukált befelé irányuló kation áramok a differenciációs állapottól függően módosítják a sejtek mozgékonyosságát.

5. Megbeszélés

Doktori munkám során arra próbáltam válaszokat kapni, hogy az idegi őssejtek fejlődési lehetőségeit és sejtbiológiai sajátosságait milyen mértékben befolyásolja az őssejtek regionális és időbeli eredete, illetve hogyan módosítják azok a környezeti hatások, amelyek a már „megszületett” őssejtet érik a fejlődés során.

Mindehhez különböző életkorú – embrionális és felnőtt - egerek különböző agyi régióiból kellett idegi őssejteket nyernem.

Szemben az agy kialakulásánál kulcsszerepet játszó korai neuroepiteliális őssejtekkel (Schlett, Madarász 1997), a már fejlődő agy ős- és progenitor sejtjei a kamrafalat alkotó radiális glia sejtek (Rakic 1971) leszármazottai. Munkám kezdetén az egeragy különböző régióiból és különböző életkorokból izoláltam őssejt és progenitor sejt sajátosságokkal jellemezhető radiális gliasejt jellegű sejtpopulációkat.

5.1 A radiális glia jellegű sejtek kinyerésére kidolgozott módszer

Az embrionális radiális glia sejtek izolálásánál ki tudtuk használni, hogy az embrionális (~E14-E15) egér előagyban asztrogliaképzés még nincs (Voigt 1989, Noctor és mtsai 2008). A *gfap* gént a radiális glia sejtek ugyan expresszálják, de a GFAP fehérje szinten nem jelenik meg, a *gfap* génről csak mRNS íródik át. Nolte és munkatársai létrehoztak egy olyan „knock-in” transzgenikus egértörzset, amely a humán *gfap* génhez kapcsolt zöld fluoreszcens fehérje (GFP) génjét hordozta (hGFAP-GFP), és a GFP az embrionális radiális glia sejtekben fehérje szinten is megjelent (Nolte és mtsai., 2001). A hGFAP-GFP konstrukciót hordozó egér embriókban a radiális glia sejtek *in vivo* könnyen azonosíthatók (Nolte és mtsai., 2001), és a mi munkánk során *in vitro* is jól követhetőek voltak.

A transzgenikus *hgfap-gfp* egerek felhasználásával és speciális tenyésztési körülmények létrehozásával sikerült kidolgozni azt az izolálási eljárást, amellyel a későbbiekben vad típusú felnőtt egerek agyából is tudunk radiális glia-jellegű sejteket kinyerni. A tenyésztő felszíneket egy speciális peptid-konjugátummal, az AK-cyclo(RGDfC)-vel vontuk be. A peptid konjugátum funkcionális motívuma, a ciklikus RGD-pentapeptid az $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ és $\alpha\beta6$ integrin receptorokhoz (köztük a fibronectin és a vitronektin receptoraihoz) kötődik nagy affinitással (Goodman és mtsai, 2002, Markó és mtsai, 2008). Az embrionális agyszövetben a radiális glia sejtek rendelkeznek olyan

receptorkészlettel (Campos 2005; Proctor és mtsai, 2005), hogy letapadjanak az AK-cyclo(RGDfC)-vel bevont tenyésztő aljzatra. A mechanikai kapcsolat biztosítása mellett az integrin ligandumok bekötődése a receptorokhoz változatos szignáltranszdukciós útvonalakat indíthat be (Giancotti és Ruoslahti, 1999; Juliano, 2002), amelyek alapvető sejtélettani folyamatokat szabályoznak (proliferáció, túlélés, migráció, differenciáció). Az embrionális agyból izolált sejteket AK-cyclo(RGDfC)-re ültetve és szérummentes tápban tartva jelentős kezdeti sejtpusztulást tapasztaltunk, de rövid idő (48-96 óra) alatt szelektálódtak stabilan túlélő és gyorsan szaporodó sejtek. Munkám során nem vizsgáltam azokat a mechanizmusokat, amelyeket az AK-cyclo(RGDfC) peptidhez való kötődés indít el, de kihasználtam azt a jelenséget, hogy a peptiddel bevont aljzaton, szérumot nem tartalmazó közegben, egy homogén sejtpopuláció gyors növekedése következett be. A populáció genetikai és sejtbiológiai vizsgálatai bizonyították, hogy az adott feltételek mellett az embrionális radiális glia sejtek szaporíthatók szelektíven.

A radiális glia-sajátságokat a dolgozat Eredmények fejezetében bemutattam, itt csak a legfontosabbakat foglalom össze. A sejtek elongált, egymáshoz hosszukban tapadó sejtalakkal jellemezhetők; egyöntetűen expresszálják a radiális gliára jellemző *pax6*, *emx2* pozícionális géneket és az idegszöveti elköteleződést mutató proneurális gének (*ngn* vagy *mash2*) valamelyikét, valamint a radiális glia anyagcserére jellemző *glast*, *blbp* géneket. Nem fejeznek ki ugyanakkor a korábbi őssejtekre jellemző (esetleg tumoros transzformációra utaló) *nanog* vagy *oct4* géneket (Markó és mtsi., 2011).

A speciális tenyésztési körülményeknek (hatékony letapadás és szérum mentes környezet) köszönhetően a felnőtt agyban kis mennyiségben jelen lévő radiális glia-jellegű idegi őssejteket is sikerült izolálnunk. A felnőtt agyból izolált sejteket AK-cyclo(RGDfC)-re ültetve és szérummentes tápban tartva jelentős sejthalált tapasztaltunk. A sejtpusztulás igen nagy mértékű volt a felnőtt agyból kiültetett sejtek esetében, ami érthető, ha figyelembe vesszük a kevés idegi őssejt/progenitorsejt arányát az összes sejthez viszonyítva. Az idegsejtek ugyanis nem képesek ilyen körülmények között az aljzatra letapadni (Markó és mtsai 2008), a letapadó asztrogliá sejtek pedig szérum mentes környezetben elpusztulnak (Wolfes és Dean 2018). Az elpusztult sejtek rendszeres eltávolításával, és az osztódó sejtek sorozatos átültetésével azonban kisselektálható egy radiális glia-jellegű homogén idegi őssejt populáció bármilyen korú egeragy bármely neurogén (vagy nem neurogén) régiójából. Kidolgoztunk tehát egy

univerzális módszert radiális glia sejtek agyszövetből történő kinyerésére. Ez nagyrészt annak köszönhető, hogy a radiális glia sejtek és azok *in vivo* mikrokozonyezete nagyfokú hasonlóságot mutat életkortól és agyi régiótól függetlenül (Kriegstein és Alvarez-Buylla 2009).

A módszer nagy előnye, hogy hosszútávú stabil, őssejt-sajátságokat megtartó és homogén (klónozott) őssejteket tartalmazó tenyészetek hozhatók létre, amelyek alkalmasak egyedi őssejt-sajátságok elemzésére. Jelenleg a legelterjedtebb *in vitro* idegi őssejtmodell, az ún. neurosphere-tenyészet (Reynolds és Weiss, 1992). A neurosphere-ek az idegi őssejtek és származékaik, amelyek számos hátránnyal is rendelkeznek (Jensen és Parmar, 2006). Legnagyobb hiányosság, hogy az úszó aggregátumok az idegi őssejteken kívül nagyarányban tartalmaznak differenciáltabb sejtípusokat (neuronokat, asztrocitákat) (Garcion és mtsai, 2004), ami az alapkutatásokban való alkalmazásuk mellett megnehezíti klinikai felhasználásukat is. A neurosphere-ek nem tekinthetők homogén sejtegyütteseknek (Singec és mtsai, 2006; Coles-Takabe és mtsai, 2008).. Ugyanakkor, a szuszpenziós neurosphere kultúrákban az őssejtek hosszú időn keresztül fenntarthatók, mert az aggregátumban biztosított a stabil letapadási felszín az őssejtek számára és a környezet nem kedvez a nagy mértékű sejt differenciálódásnak. Az őssejt-sajátságokat fenntartó hatások egyelőre ismeretlenek, és jelentősen nem befolyásolhatók

Ma már léteznek olyan adherens sejt kultúrák, amelyekben definiált körülmények között sikerült fenntartani egér eredetű embrionális őssejteket (Schlett, Madarász 1997, Ying és mtsai, 2003), főtális-, (Conti és mtsai, 2005), valamint felnőtt előagyból izolált őssejteket (Pollard és mtsai, 2006) és emberi főtális előagyból izolált őssejteket (Sun és mtsai, 2008). Azonban ezeknek az *in vitro* modelleknek a leggyakoribb hátránya, hogy az NS-sejtek hajlamosak leválni az aljzatról, és neurosphere-szerű aggregátumokat létrehozni (Conti és mtsai, 2005, Pollard és mtsai, 2006).

Az általunk alkalmazott szintetikus adhezív peptid-konjugátum előnye, hogy egyszerű lehetőséget biztosít a NS-sejtek adhézió alapú izolálására embrionális és felnőtt agyszövetből egyaránt. Mindemellett, az izolált ős/progenitor sejtek teljesen definiált körülmények között vizsgálhatók, a letapadt sejtek monolayer alkotnak és

folyamatosan osztódnak egyetlen hozzáadott növekedési faktor, az EGF jelenlétében. Ehhez a DMEM/F12/B27 összetevőjű definiált médiumban további faktorok vagy szérum hozzáadására nincs szükség.

5.2 Különböző életkorból és agyi régiókból izolált egér radiális glia-jellegű sejtek sajátosságai

Bár a különböző életkorból és agyi régiókból izolált egér radiális glia-jellegű sejtek letapadási és proliferációs „igényei” nagyfokú hasonlóságot mutattak, ismert, hogy *in vivo* jelentős különbségek vannak az egyes radiális glia sejt-populációk között (Shen és mtsai 2006, Kriegstein és Alvarez-Buylla 2009). A továbbiakban doktori munkám során ezeket a különbségeket és hasonlóságokat vizsgáltam *in vitro*, a különböző korú egerek eltérő agyterületeiről izolált, egysejt-eredetű (klónozott) radiális glia-jellegű sejtek között.

Mind az embrionális, mind a felnőtt radiális glia-jellegű sejtek számos gliális tulajdonsággal rendelkeznek (Kriegstein és Alvarez-Buylla 2009). Az embrionális radiális glia fenotípus fokozatosan alakul ki a neuroepiteliális sejtekből úgy, hogy egyre több gliális tulajdonság, köztük gliális transzporter fehérjék (GLAST, GLT-1), intracelluláris effektor molekulák (BLBP) és vázfehérjék jelennek meg, illetve változnak a sejtekben. Egérben a GFAP fehérje nem, csak az mRNS expresszálódik a radiális glia sejtekben *in vivo*. A születés környékén a radiális glia sejtek ependyma vagy asztroglia sejtekké alakulnak, amely asztroglia sejtek bizonyos speciális mikrokönyezettel rendelkező agyterületeken (SVZ, SGZ) megőrzik osztódó- és idegsejtképző képességüket (Doetsch és mtsai, 1999; Eriksson és mtsai 1998). A felnőtt radiális glia-jellegű sejtek (SVZ: B sejtek, SGZ: radiális asztrociták) egyik jellegzetes tulajdonsága a GFAP expresszió (Doetsch és mtsai 1999, Seri és mtsai 2004).

Az *in vivo* adatokkal egyezően, a klónozott radiális glia-jellegű sejtekben is fontos különbség mutatkozott az embrionális és a felnőtt eredetű radiális glia sejtek GFAP expressziójában. Azonos izolálási és tenyésztési körülmények mellett az embrionális klónok egyike sem expresszált GFAP fehérjét, míg a felnőtt klónok mindegyikében kimutatható volt a GFAP fehérje immuncitokémiai festéssel.

Különbséget találtunk az embrionális és a felnőtt klónok osztódási kapacitásában is. Míg a felnőtt klónok proliferációja nagyjából a 40. átültetés környékén észrevehetően csökkent és a sejteknél beindult egy ellaposodási folyamat (az addigi orsó-szerű, elongált morfológia helyett), addig az embrionális klónoknál még a 60. utódpopuláció is folyamatosan osztódott és a sejtek megtartották orsó-szerű alakjukat.

A felnőtt SVZ és SGZ eredetű klónok osztódási üteme alapvetően lassabb volt az embrionális klónok osztódási üteménél. A lassabb proliferáció a klónozás során nagy nehézséget jelentett, amikor is egyetlen sejtől kellett felnöveszteni egy sejtpopulációt. Adataink azt mutatták, hogy a felnőtt eredetű radiális glia sejtek nagy mértékben függenek általunk nem azonosított humorális faktoroktól. Felszaporításuk akkor vált hatékonyá, ha egy már „telenőt” sejtűs tenyészetéről vett, baktériumszűrőn átszűrt ún. kondicionált médiumot adtunk a klónokhoz. Csak így tudtuk biztosítani azokat a faktorokat, amelyek a klónozáshoz kiültetett egyedüli sejtek életben maradásához és proliferációjához szükségesek voltak.

Az idegi fejlődést megszabó, agyi régióként különböző pozicionális gének (Rubenstein 1998, Shuurmans 2004) ismeretében azt vártuk, hogy az agy különböző régióiból nyert és klónozott radiális glia sejtek regionális génextpressziós mintázata jelentős eltéréseket mutat. Az eredet-függő sajátosságok megőrzésének azonban csak egyes jelei mutatkoztak. Az *ngn2* proneurális gén, *in vivo*, az embrionális fejlődés során a dorzális előagyi progenitorsejtekben aktiválódik (Guillemot 2007). Ennek megfelelően, az *in vitro* tenyésztés során is csak a dorzális eredetű embrionális klónokban fejeződött ki. Meglepő eredmény volt azonban, hogy a pozicionális gének aktivitása alapján, az indukálatlan radiális glia sejtek nem mutattak regionális elköteleződést, legalábbis a több hetes, *in vitro* fenntartás után. Az embrionális és a felnőtt klónok mindegyikében expresszáldott a vizsgált régióspecifikus gének többsége (*pax6*, *emx2*, *dlx2*, *olig2*, *mash1*). Egyes klónokban együttesen aktiválódtak a *gbx2*, *pax6* és *emx2* gének, amelyek *in vivo* más-más agyi régiókra jellemzőek. Ugyanakkor, a ventrális „sorsot” jelző *nkx2.1* egyetlen klónban sem volt aktív. Az adatok azt jelezték, hogy az alkalmazott módszerekkel szelektálható radiális glia jellegű sejtek regionális elköteleződése még flexibilis. Feltételezhető, hogy a pozicionális elkötelezettség rögzítéséhez az adott régióban ható ágensek folyamatos jelenlétére van szükség. A regionális hatások alól

kivont, *in vitro* fenntartott sejtekben a pozícionális elköteleződés „nyitott”, és ezáltal a fejlődés során kialakítható érett sejtfenotípusok választéka is nagyobb.

5.3 Különböző radiális glia jellegű sejtek *in vitro* fejlődési lehetőségei

A klónozott, indukátlan radiális glia sejtekből – más-más hatásra – asztrociták, oligodendroglia sejtek és idegsejtek is kialakultak. Ez a megfigyelés igazolta, hogy az izolált radiális glia jellegű sejtek idegi őssejteknek tekinthetők, amelyek széles fejlődési lehetőségekkel rendelkeznek, és az idegszövet minden neuroektodermális fő sejtípusává képesek fejlődni.

Csupán 3 nap elég volt, hogy 10% főtális borjú szérum hozzáadásával GFAP pozitív, asztroglia morfológiájú sejtek alakuljanak ki az indukátlan radiális glia- jellegű sejtekből. Az asztroglia-képzés további vizsgálata azonban nehézségekbe ütközött, hiszen mRNS szinten az embrionális és a felnőtt klónok is, fehérje szinten pedig a felnőtt klónok mindegyike expresszálta az asztroglia sejtek azonosítására használt *gfap* gént.

Oligodendroglia irányú differenciációt egy több lépéses protokoll (Glaser és mtsai. 2007) segítségével minden klónban ki lehetett váltani. Először az oligodendroglia irányba elkötelezett progenitorokat szaporítottuk fel FGF2, PDGF és forskolin hozzáadásával. Majd 5 nappal később megvontuk a növekedési faktorokat a tenyészetektől, és trijodtironinnal (T3) valamint aszkorbinsavval indukáltuk az oligodendroglia sejtek kialakulását. Ezt követően, 3 nap elteltével megjelentek a tenyészetekben a hálózatos, oligodendroglia morfológiájú, O4 pozitív sejtek. A tenyészetek az indukció után azonban nem csak oligodendroglia sejteket tartalmaztak, hanem megjelentek bennük asztrociták és idegsejtek is. A jellegzetesen kis sejttesttel és rúdszerű, elágazó nyúlványokkal rendelkező GFAP immunpozitív sejtek jelenléte magyarázható azzal, hogy az első differenciációs lépés során (FGF2, PDGF, forskolin hozzáadása) az O₂A progenitorok (M. Raff 1983) szaporodtak fel a tenyészetekben, amelyek képesek érett oligodendroglia sejtek, valamint érett 2-es típusú asztroglia sejtek létrehozására is (Espinosa de los Monteros és mtsai 1993). Mivel az oligodendroglia markerként nyilvántartott O4 a fiatal idegsejtekben is expresszálódik, ezért összehasonlító vizsgálataink során csak azokat az O4 pozitív sejteket tekintettük

oligodendrocitának, amelyek a neuron-specifikus β III-tubulint nem expresszálták. Az egyes radiális glia-jellegű klónok eltérő mértékben képeztek oligodendroglia sejteket. Ennek magyarázatára ma csak feltevéseket lehet tenni. A felnőtt agykérgi eredetű klónból (CTX_H) sokkal több (~23%) oligodendroglia sejt keletkezett, mint a többi felnőtt klónból (HC_A: 16%, MES_D, SVZ_I, SVZ_K, SVZ_T, SVZ_M: 1-2%). Ez talán magyarázható azzal, hogy a felnőtt agykéregben található vándorló progenitorok, amelyek között vannak oligodendroglia irányba elkötelezett sejtek is (Ninkovic és Götz 2013). Az embrionális klónok közül a ventrális eredetű RGl-GFP-A2 klón tenyésztésében majdnem kétszer annyi oligodendroglia sejt keletkezett, mint a dorzális eredetű RGl-GFP-C4 klón tenyésztésében. Mindez összhangban van az *in vivo* eredményekkel, melyek szerint embrionális korban (~E14) az oligodendroglia sejtek főként a ventrális területeken, a mediális gangliondomb ventrikuláris zónájában keletkeznek (Pringle és Richardson 1993, Spassky és mtsai 1998, Tekki-Kessaris és mtsai 2001).

Az idegsejtek kialakulását a konfluens radiális glia tenyésztésekben könnyen ki tudtuk váltani, mindössze az EGF (epidermális növekedési faktor) megvonásával. A növekedési faktor elvonásakor tömeges sejtpusztulás volt megfigyelhető, majd 5-7 nap után megjelentek az idegsejt morfológiájú sejtek. Ezek a sejtek β III-tubulin immunpozitivitást mutattak, és elektrofiziológiai módszerekkel detektálható volt a neuron-specifikus feszültség-függő Na-áram megjelenése.

Az idegsejtek morfológiája különbözött aszerint, hogy melyik agyterületről izoláltuk az őssejteket, amelyekből differenciálódtak. Az alakilag legfejlettebb idegsejtek a dorzális középpagy radiális glia-jellegű sejtekből (MES_D) alakultak. Feltételezhető, hogy a középpagyból izolált radiális glia-jellegű sejtek, már az idegsejt irányú elköteleződés egy magasabb fokán állnak. Ezt alátámasztja az is, hogy oligodendroglia sejté a középpagyból származó tenyésztésekben csak a sejtek 1-2%-a differenciálódott. Ennek megfelelően az idegsejtek száma is a középpagy területéről izolált tenyésztésekben volt a legmagasabb (~20%), és az előagykéreg területéről izolált tenyésztésekben pedig a legalacsonyabb (~5%).

A neurotranszmitter fenotípus tekintetében az egyes radiális glia klónok eltérő fejlődési potenciált mutattak. A GABA-erg idegsejtekre jellemzőnek tartott *vgat* expresszáldott

minden vizsgált klón neuronális fejlődésre indukált sejtjeiben függetlenül attól, hogy melyik agyterületről származtak. Immuncitokémiai módszerrel a fejlődő idegsejtek GABA tartalmát is ki tudtuk mutatni. Ez a megfigyelés összhangban áll azzal a ténnyel, hogy a GABA fontos parakrin hatóanyagként működik az idegsejtfejlődésben már jóval a szinaptogenezis időszaka előtt (Jelitai, Madarász 2006).

A GABA-tartalomtól eltekintve, az egyes neurotranszmitter-fenotípusokra jellemző komponensek nagyon eltérően jelentek meg az egyes klónok idegsejtté differenciálódó sejtjeiben. Az embrionális eredetű RGI klón látszólag szélesebb neurotranszmitter potenciállal rendelkezett, mint a felnőtt klónok. Az RGI klónban a GABA anyagcserére jellemző *vpat* mellett expresszáldott két glutamát transzporter (*vglut1* és *vglut2*) is, valamint a katekolaminerg idegsejtekre jellemző tirozin hidroxiláz (TH) génje is.

A felnőtt klónokban a *vpat* mellett csak a hippocampális területről származó radiális gliasejtek idegsejt-leszármazottai expresszálták a glutamaterg anyagcserére jellemző *vglut1*-et. Ez megfelel az *in vivo* expresszióknak, a hippocampus gyrus dentatus-ának szemcsesejtjei ugyanis glutamaterg szinapszisaiban az egyes típusú vezikuláris glutamát transzporter (VGlut-1) van jelen (Gutiérrez 2016). A szubventrikuláris zóna területéről származó radiális gliasejtekből fejlődő idegsejtek a *vpat* mellett a tirozin hidroxiláz (TH) génjét is expresszálták. Ez szintén összhangban van, az *in vivo* adatokkal, ugyanis a szaglógumó idegsejtjeiben is kimutatható a tirozin hidroxiláz génjének és a *vpat*-nak az expressziója is (Banerjee és mtsai, 2013).

Eredményeink azt mutatják, hogy a radiális glia jellegű ősz/progenitor sejtek fejlődési lehetőségeit csak részben szabja meg eredetük helye és ideje. A jelentős részében „nyitottnak” tekinthető fejlődési program lefutása a környezet szabályozó tényezőinek hatására alakul. Mind az elméleti kérdések tisztázása, mind a lehetséges klinikai sejterápiák kifejlesztése miatt létfontosságú a sejtek fejlődését alapvetően befolyásoló környezeti tényezők megismerése.

Ezen tényezők egyik fontos eleme a fejlődő sejtek intracelluláris Ca-szintjét befolyásoló bioelektromos stimuláció. Munkám további részében a bioelektromos stimuláció hatásait vizsgáltam a radiális glia jellegű sejtek és a belőlük fejlődő idegsejt-előalakok vándorlásának, motilitásának alakulásában.

5.4 Az ionos stimuláció hatásai radiális glia jellegű sejtek motilitására

Az agyszövetben vándorló ős/progenitor sejteket rengeteg hatás éri mind az embrionális mind a felnőtt agyban (Tan és Shi 2013, Kaneko és mtsai 2017). Ennek köszönhetően „találják meg” a sejtek célterületüket, rendeltetési helyüket a szövetben. Köztudott, hogy míg a progenitor sejtek jelentős távolság megtételére képesek az agyszövetben, addig az elágazó nyúlványrendszerrel rendelkező, szinapszisokat kialakító érett idegsejtek nem képesek vándorlásra. Doktori munkám második részében *in vitro* hasonlítottam össze az indukátlan radiális glia-jellegű sejteket, a neuronális indukció első napján lévő sejteket (EGF megvonást követő 1. nap) és a neuronális indukció 5. napján lévő (EGF megvonást követő 5. nap) sejtek migrációs képességét. Az általunk kifejlesztett *in vitro* modellrendszer lehetőséget biztosított arra, hogy a sejtek migrációját teljesen definiált környezetben vizsgáljam, és egyetlen változó hatásként alkalmazzuk az ionos stimulálást. Ezt *in vitro* úgy értük el, hogy expresszáztattuk a sejteinkben a fényre nyíló, kation áteresztő channelrhodopszin2(H134) ioncsatornát. Az első próbálkozások az ioncsatorna transzfektálására a már meglévő klónjainkban (SVZ_I, SVZ_K, SVZ_T, SVZ_M, HC_A, CTX_H, MES_D) mind sikertelenek voltak. A Chr2-t a transzfektálás után 3 nappal csak 1-2 sejt expresszálta a tenyészetekben. Valamint, ha ebből az 1-2 sejtből sikerült is klónozással új sejtpopulációt felnevelnünk, a Chr2 expressziója elenyésző volt, a GFP fúziós fehérje csak maximális expozíciós idővel volt detektálható. Voltak olyan kezdetben GFP-t nagyobb mennyiségben expresszáló sejtek is, amelyekből hosszabb *in vitro* tenyésztés után a GFP expresszió teljesen eltűnt. Ez azzal magyarázható, hogy a chr2 gén nem épült be a genomba, hanem csak a citoplazmában volt jelen, így az utódsejtekben előbb-utóbb kihígult. Ezeknek problémáknak a megoldására egy olyan transzgenikus egértörzs 17,5 napos embrióiból izoláltunk a radiális glia sejteket, amelyek minden sejtje hordozta a *loxP* helyek közé iktatott Chr2(H134)-GFP fúziós fehérjét kódoló génkonstrukciót (Madisen és mtsai. 2012). Ezekből az egerekből izolált sejtekbe elegendő volt a Cre-rekombináz kódoló plazmidot - akár csak a sejtek citoplazmájába – bejuttatni, amely ha egyszer átíródott, aktiválta a genomban lévő *loxPStoploxPChr2(H134)-eYFP* konstrukcióban a Chr2 expressziót. Ezek a sejtek stabilan és elektrofiziológiai módszerrel is jól detektálható módon expresszálták a Chr2-YFP fúziós fehérjét.

Amennyiben a megfelelő hullámhosszúsággal (480nm) megvilágítottuk a sejteket detektálható kation áramokat mértünk bennük.

Az összejt-állapottól a nyúlványosodó idegsejt-előalak állapotig a fejlődő sejtek *in vivo*, jelentős távolságra vándorolnak. A sejt vándorlás sebessége, a sejtek által megtett út hossza az idegsejtté fejlődés során fokozatosan csökken. Az intracelluláris Ca-oszcilláció minden sejtfejlődési állapotban alapvető szabályozója a sejt motilitásának: a sejtet érő *in vivo* bioelektromos hatások alapvetően befolyásolják a sejtek mozgékonyágát. Ezt a folyamatot kívántuk *in vitro* vizsgálni a fényérzékeny ioncsatornákon át időről-időre bejuttatott ionok segítségével.

A ChR2(H134) ioncsatorna 470-480 nm hullámhosszú fény hatására nyílik, és jelentős mennyiségű Ca^{2+} iont enged át az ugyancsak átjutó Na^+ és H^+ ionok mellett (Zahn 2008). A sejtekbe beáramló kationok depolarizációt okoznak, Ca-szint lokális megnövekedése pedig fontos sejt válaszokat vált ki. A beáramló Ca-ionok hatása nemcsak a Ca-áram nagyságától, hanem sejt citoplazmájának méretétől és Ca-kezelő kapacitásától is függ. A sokszoros réskapcsolatokkal kialakított szincicium jellegű sejtegyüttesekben a beáramló ionok egy megnövekedett citoplazmatikus térben oszlanak el, így hatásuk mérséklődik. A differenciálatlan idegi összejt sejt réskapcsolatokkal gazdagon ellátott sejtegyütteseket képeznek. Ezzel az „összejt-állapot” fenntartását kevésbé befolyásolják a sejtegyüttest érő ionsitmuláns hatások. A sejtfejlődés során egymástól elkülönülő, kevesebb réskapcsolattal rendelkező fejlődő sejtalakok bioelektromos stimuláció iránti érzékenysége nő (Markó és mtsi., 2011; Orsolits és mtsi., 2014).

Miután munkám során össze kívántam hasonlítani az összejt-, illetve az idegsejt-fejlődés későbbi állapotaiban lévő radiális glia jellegű sejtek ionos stimulációra adott mozgás-válaszait, olyan ingerlési paramétereket kellett találnunk, amelyek a különböző fejlődési állapotú sejtekben válaszokat kiváltanak, de sejtpusztulást nem okoznak egy hosszabb, 12 órás vizsgálati időszak alatt sem. Patch-clamp és sejttoxicitás mérések adatai alapján, a sejteket 0.13 mW/mm^2 intenzitású kék fényvel, 12 órán keresztül minden 5. percben, 300ms hosszan stimuláltuk. Elemeztük a különböző fejlődési állapotú (indulálatlan összejt sejt, 1 napos indukcióval idegsejt-fejlődésre készített és 5 napos indukció után

idegsejt-előalak) sejtek migrációs aktivitását: a 12 óra megtett út hosszát és a vándorlás sebességét.

A sejt motilitás vizsgálatánál el kellett különítenünk a sejtek helyzetváltoztató (lokális alakváltoztató) mozgását a tényleges vándorlástól. Ez különösen fontos kérdés volt a mi módszerünk esetén, amikor a sejt középpontjának elmozdulását követtük. Az elongált őssejtek jól követhető „középpontját” a kidudorodó sejt mag adja. A sejt mag azonban az elnyúlt sejtekben intracellulárisan vándorol (Környei és mtsi 201..); az intracelluláris magvándorlást el kellett különíteni a sejt teljes elmozdulásától. A kérdést úgy oldottuk meg, hogy sejt vándorlásként azt fogadtuk el, ha a sejt középpontja olyan távolságra került 12 óra alatt, amely a sejt legnagyobb kiterjedésének (100 μm) legalább a kétszerese.

Az indukátlan radiális glia-jellegű őssejtek nagy migrációs aktivitást mutattak. Ugyanakkor, az őssejtek mozgékonyágát a megvilágítás, az ionos stimulálás nem befolyásolta. Ebből arra következtethettünk, hogy az őssejt-motilitáshoz szükséges intracelluláris Ca-készlet a sejtekben rendelkezésre áll, a „mesterséges” ioncsatorna nyitása nélkül is. Feltehetőleg, a réskapcsolatokkal gazdagon csatolt sejtekben a fény hatására beáramló kationok jelentős ion-eltolódást nem okoztak.

Az idegsejtté való differenciálódás első napján a ChR2-t expresszáló sejtek mozgékonyága szignifikánsan megnőtt a ChR2-t nem expresszáló sejtekéhez képest. Előzetes laboratóriumi adataink szerint (Jelítai és mtsi., 2007), az idegsejt-fejlődés korai lépése a réskapcsolatok gyengülése, a sejtek élettani „egyediségének” kialakulása. Ebben a stádiumban az egyedi sejtekbe beáramló kationok már mérhető depolarizációt és megváltozott intracelluláris Ca-szintet eredményezhetnek. Nem meglepő, ha a korai progenitor sejtek a kation-beáramlásra motilitás-növekedéssel válaszoltak.

Az idegsejtté való differenciálódás 5. napján a sejtek nyúlványosodni kezdenek, neuron-specifikus fehérjéket expresszálnak. Ebben a fejlődési stádiumban a fény hatására beáramló kationok jelentősen csökkentették a sejtek vándorlását. Ennek eldöntésére, hogy okozhatta-e ezt a lassulást maga a ChR2-expresszió, a motilitás-vizsgálatokat elvégeztük ChR2-t expresszáló, de nem megvilágított sejt populációkon is. Az adatok egyértelműen bizonyították, hogy a sejtek motilitásának csökkenését a megvilágítás, azaz a kation-beáramlás okozta.

Miután a sejtmotilitás csökkenése az idegsejtté fejlődés szükségszerű lépése, azt is megállapíthattuk, hogy a 12 órán át tartó ismételt fényimpulzusok lerövidítették azt a folyamatot, amely az idegsejt-fejlődés egyik velejárója. Az eredményt úgy értelmezzük, hogy az ismételt kation-beáramlás gyorsítja az idegsejtté érés -legalábbis egyes - folyamatait.

Motilitás vizsgálataink azt mutatták, hogy az ionos stimuláció más-más válaszokat vált ki az idegi sejtfejlődés különböző stádiumaiban. Az idegi őssejtek „védettnek” bizonyultak, ami – *in vivo* környezetre extrapolálva - segíti az őssejtpopulációk fennmaradását az „őssejt-niche”-ekben. Az őssejt-telepekből kivándorló progenitor-sejtek motilitását, migrációját az ionos stimuláció fokozza, ami segítheti a megfelelő helyre történő vándorlásukat. Az idegsejtté érő előalakok motilitását az ionos stimuláció jelentősen csökkenti, ami – *in vivo* környezetre vetítve - segítheti a végső differenciálódás és hálózatba való beilleszkedés lehetőségeit.

6. 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. Kialakítottunk 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 gének fejeződnek ki, tekintet nélkül azok származására.
- 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 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.

7. Összefoglalás

A radiális glia-jellegű idegi őssejtek hozzájárulnak létrehozásához az agyszövet sejtjeinek legnagyobb részét az embrionális és a felnőtt agyban is. Megnehezíti ezeknek a sejteknek a vizsgálatát, hogy izolálásuk a szövetből nehéz és körülményes, különösen a felnőtt agyszövet esetében nagyon kis mennyiségben megtalálható radiális glia sejtéké. Laboratóriumunkban egy peptid konjugátum (AKciklo(RGDfC)) segítségével korábban kidolgoztunk egy izolálási eljárást, amellyel nagy hatékonysággal kinyerhetők a radiális glia jellegű idegi őssejtek bármilyen korú agyszövetből. Ezek a sejtek az izolálás után kémiaiailag definiált körülmények között tenyésztethetők és hosszú távon vizsgálhatók *in vitro*.

Doktori munkám során különböző életkorú egerek különböző agyterületeiről számos radiális glia-jellegű sejtet izoláltam, klónoztam és *in vitro* elemeztem az őssejt-állapotú sejteket, illetve differenciált idegszöveti sejt-leszármazottaik sajátosságait. Megállapítottam, hogy radiális glia jellegű, neuronképzésre is képes idegi őssejtek a felnőtt egeragy bármely területéről kinyerhetők. Az *in vitro* fenntartott radiális glia sejtek pozicionális génextpressziós mintázata csak részben tükrözte az agyrégióból való eredetüket. Fejlődési potenciáljuk – a belőlük képződő glia- és idegsejttípusok aránya, az idegsejtek neurotranszmitter fenotípusa - viszont eltért attól függően, hogy melyik agyterületről származtak.

Doktori munkám második részében jól karakterizált embrionális radiális glia sejtek migrációs tulajdonságait vizsgáltam. Létrehoztam channelrhodopszin expresszáló radiális glia jellegű sejtpopulációkat, és az *in vitro* indukált idegsejt-fejlődés különböző fejlődési állapotaiban (0 napos indukálatlan, az idegsejtté való differenciáció 1.napján, az idegsejtté való differenciáció 5.napján) vizsgáltam a fényel indukált kation áramok hatását a sejtek motilitására. Az indukálatlan radiális glia sejtek motilitása fény hatására szignifikánsan nem változott. Az idegsejt-fejlődés megindulása után a migráló progenitor sejtek mozgékonyasága jelentősen nőtt, míg az idegsejtté való differenciálódás késői fázisában a sejtek motilitása szignifikánsan csökkent a kationáramok hatására. Adataim azt mutatják, hogy a channelrhodopszin csatorna nyitásával létrejövő kation áramok a sejt fejlődési állapotától függően, de fejlődés minden stádiumában szabályozzák az idegsejtté való differenciáció folyamatát.

8. Summary

Radial glial-like neural stem cells produce most of the cells in the embryonic and adult brain. In the complex environment of brain, the characteristics of these cells can not be investigated, especially in adult brain tissue where the rare radial glial cells are scattered throughout the brain parenchyme. Using a special peptide conjugate (AKciklo-(RGDfC)), our laboratory developed procedures to extract radial glia-like neural stem cells from any region of mouse brain tissue of any age. The procedures allow cloning, long-term cultivating and testing radial glia-like neural stem cells in fully defined conditions.

In my PhD work, I established several one-cell derived radial glial cell clones from different regions and ages of the mouse brain. I compared the in vitro stem cell characteristics, as well as the developmental potential of the different clones. I concluded that radial glial-like neural stem cell populations can be found in and isolated from any region even of the adult brain. After long-term in vitro maintenance, the region-specific gene expression pattern of radial glial cells only partially reflected the site of origin. The developmental potential including the proportion of descending glia *versus* neurons and the neurotransmitter phenotype of neurons, depended on the brain area of origination.

In the second part of my PhD work, I examined the effects of ionic stimulation on the in vitro migratory activity of well-characterized embryonic radial glia-like cells. I established channelrhodopsin expressing radial glia cell populations. In different stages of neuronal differentiation (stem cell state, migratory state and neuronal precursor state), I studied the effect of light-induced inward cation currents on cell motility. Non-induced radial glial like stem cells did not change motility in response to light. Motility of 1 day induced progenitors was enhanced, while the motility of neuronal precursors was significantly reduced by ionic stimulation. We concluded that inward cation currents generated by the opening of the channelrhodopsin channel promote neuronal differentiation in a developmental stage-dependent way.

9. Irodalomjegyzék

Aaku-Saraste E, Oback B, Hellwig A, Huttner WB. (1997) Neuroepithelial cells downregulate their plasma membrane polarity prior to neural tube closure and neurogenesis. *Mech Dev.* Volume 69, Issues 1–2 71-81.

Aguilar-Arredondo A, Arias C, Zepeda A. (2015) Evaluating the functional state of adult-born neurons in the adult dentate gyrus of the hippocampus: from birth to functional integration. *Rev Neurosci.* Volume 26, Issue 3 269-279

Ahlfeld J, Filser S, Schmidt F, Wefers AK, Merk DJ, Glaß R, Herms J, Schüller U (2017) Neurogenesis from Sox2 expressing cells in the adult cerebellar cortex. *Sci Rep.* 7(1):6137 1-7

Altman J, Das GD. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124:319–335

Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Mateo AS, Merchant-Larios H. (1998) Primary neural precursors and intermitotic nuclear migration in the ventricular zone of adult canaries. *J Neurosci.* 18(3):1020-1037.

Alvarez-Buylla A, Kohwi M, Nguyen TM, Merkle FT. (2008) The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* Volume 73 357-365.

Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N. (2004) Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* Volume 41, Issue 6 881-890

Banerjee K, Akiba Y, Baker H, Cave JW (2013) Epigenetic control of neurotransmitter expression in olfactory bulb interneurons. *Int J Dev Neurosci.* Volume 31, Issue 6 415-423.

Barry D, McDermott K. (2005) Differentiation of radial glia from radial precursor cells and transformation into astrocytes in the developing rat spinal cord. *Glia.* 50:187-197.

Bartlett PF, Reid HH, Bailey KA, Bernard O. (1988) Immortalization of mouse neural precursor cells by the c-myc oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Volume 85 3255-3259

Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, Lo Turco JJ. (2003) Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J. Neurosci.* 23(32):10411–10418

Bertrand N., Castro D.S., Guillemot F. (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* 3:517-530

Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, Ming GL, Song H. (2011) In vivo clonal analysis reveals selfrenewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell.* 145, 1142-1155.

Campbell K. (2003) Dorsal-ventral patterning in the mammalian telencephalon. *Curr Opin Neurobiol.* Volume 13, Issue 1, 50-56

Campos LS (2005) Beta1 integrins and neural stem cells: making sense of the extracellular environment. *Bioessays* 27:698-707.

Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM. (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat. Neurosci.* 6, 507–518

Casarosa S, Bozzi Y, Conti L. (2014) Neural stem cells: ready for therapeutic applications? *Mol Cell Ther.* 2:31 1-17

Casper KB, McCarthy KD (2006) GFAP-positive progenitor cells produce neurons and oligodendrocytes throughout the CNS. *Mol Cell Neurosci.* 31:676-684.

Cheung LY, Davis SW, Brinkmeier ML, Camper SA, Pérez-Millán MI (2017) Regulation of pituitary stem cells by epithelial to mesenchymal transition events and signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol.* Volume 445, 14-26

Choi, B.H. (1981) Radial glia of developing human fetal spinal cord: Golgi, immunohistochemical and electron microscopic study. *Brain Res.* 227(2): 249–267

Conti L, Cattaneo E. (2010) Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nat Rev Neurosci.* 11,176-187.

Conti L, Pollard SM, Gorba T, Reitano E, Toselli M, Biella G, Sun Y, Sanzone S, Ying QL, Cattaneo E, Smith A. (2005) Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS biology* Volume 3 Issue 9: 1594-1606

Coles-Takabe BL, Brain I, Purpura KA, Karpowicz P, Zandstra PW, Morshead CM, van der Kooy D (2008) Don't Look: Growing clonal versus non-clonal neural stem cell colonies. *Stem Cells.* 26:2938-2944

Costa MR, Kessar N, Richardson WD, Gotz M, Hedin-Pereira C. (2007) The marginal zone/layer I as a novel niche for neurogenesis and gliogenesis in developing cerebral cortex. *J.Neurosci.* 27(42): 11376–11388

Desai AR, McConnell SK. (2000) Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development. *Development.* 127:2863-2872.

Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 17(13):5046-5061.

Doetsch F, Caille I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* Volume 97, Issue 6 703-716.

Doetsch F, Petreanu L, Caille I, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* Volume 36:1021–1034

Dulken BW, Leeman DS, Boutet SC, Hebestreit K, Brunet A. (2017) Single-Cell Transcriptomic Analysis Defines Heterogeneity and Transcriptional Dynamics in the Adult Neural Stem Cell Lineage. *Cell Rep.* Volume 18, Issue 3 777-790

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4,1313–1317

Espinosa de los Monteros A, Zhang M, De Vellis (1993) O2A progenitor cells transplanted into the neonatal rat brain develop into oligodendrocytes but not astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Volume 90 50-54

Farzanehfar P, Lu SS, Dey A, Musiienko D, Baagil H, Horne MK, Aumann TD (2017) Evidence of functional duplicity of Nestin expression in the adult mouse midbrain. *Stem Cell Res*. 19:82-93.

Faissner A, Reinhard J (2015) The extracellular matrix compartment of neural stem and glial progenitor cells. *Glia*. 63:1330-1349.

Feng L, Hatten ME, Heintz N. (1994) Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12(4): 895–908

Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B. (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol. Cell Neurosci*. Volume 23, Issue 3 373–382

Fogarty M, Richardson WD, Kessaris N (2005) A subset of oligodendrocytes generated from radial glia in the dorsal spinal cord. *Development*. 132(8):1951-1959.

Flames N, Pla R, Gelman DM, Rubenstein JL, Puelles L, Marín O. (2007) Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J Neurosci*. 27(36): 9682-9695.

François Guillemot (2007) Cell fate specification in the mammalian telencephalon *Prog Neurobiol*. 83(1):37-52.

Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T (2003) Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J.Neurosci*. 23(28):9357–9366

Gage FH (2002) Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci*. 22(3):612-613.

Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat. Neurosci.* 7(11):1233–1241

Garcion E, Halilagic A, Faissner A, French-Constant C (2004) Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* 131(14):3423-3432

Giancotti FG, Ruoslahti E. (1999) Integrin signaling. *Science* 285(5430):1028-1032.

Goodman SL, Holzemann G, Sulyok GA, Kessler H (2002) Nanomolar small molecule inhibitors for α (β)6, α (β)5, and α (β)3 integrins. *J Med Chem* 45,1045-1051.

Gould E, Cameron HA. (1996) Regulation of neuronal birth, migration and death in the rat dentate gyrus. *Dev Neurosci.* 18(1-2):22-35.

Goldman SA, Zukhar A, Barami K, Mikawa T, Niedzwiecki D. (1996) Ependymal/subependymal zone cells of postnatal and adult songbird brain generate both neurons and nonneuronal siblings in vitro and in vivo. *J Neurobiol.* 30(4):505-520.

Götz M, Stoykova A, Gruss P (1998) Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* Volume 21, Issue 5 1031-1044.

Grubb MS, Nissant A, Murray K, Lledo PM. (2008) Functional maturation of the first synapse in olfaction: development and adult neurogenesis. *J Neurosci.* 28(11):2919-2932

Guillemot F. (2005) Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon. *Curr Opin Cell Biol.* Volume 17, Issue 6 639-647.

Gutiérrez R. (2016) The plastic neurotransmitter phenotype of the hippocampal granule cells and of the mossy fibers. *J Chem Neuroanat.* Volume 73 9-20.

Hand R. , Bortone D. , Mattar P. , Nguyen L. , Heng I.T.K., Guerrier S. , Boutte E. , Peters E. , Barnes A.P. , Parras C. (2005) Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the

migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* Volume 48, Issue 1 45-62

Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB. (2004) Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Volume 101 3196–3201

Helms A.W, Johnson J.E. (2003) Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* Volume 13, Issue 1 42-49

Hosseini SM, Sharafkhah A, Ziaee SM. (2018) Spinal Cord-derived Neural Precursor Cells as a Preventive Therapy for Spinal Cord Injury. *Asian J Neurosurg.* 13(4): 1101-1107

Huang H, Qian K, Han X, Li X, Zheng Y, Chen Z, Huang X, Chen H. (2018) Intraparenchymal Neural Stem/Progenitor Cell Transplantation for Ischemic Stroke Animals: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Stem Cells Int.* Volume 2018 1-10

Huang Z. (2009) Molecular regulation of neuronal migration during neocortical development. *Mol Cell Neurosci.* Volume 42, Issue 1 11-22

Huangfu D, Anderson KV. (2005) Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Volume 102 11325–11330

Huttner WB, Brand M. (1997) Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Curr Opin Neurobiol.* Volume 7, Issue 1 29-39.

Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R. (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci.* 11, 1153-1161.

Imura T, Kornblum HI, Sofroniew MV (2003) The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *J. Neurosci.* 23(7): 2824–2832

Jensen JB, Parmar M (2006) Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Mol Neurobiol* Volume 34, Issue 3 153-161.

Juliano RL (2002) Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:283-323.

Kaneko N, Sawada M, Sawamoto K. (2017) Mechanisms of neuronal migration in the adult brain. *J Neurochem.* 141,835-847.

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* Volume 27, Issue 8 447–452

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386,493-495.

Kerever A, Schnack J, Vellinga D, Ichikawa N, Moon C. (2007) Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu. *Stem Cells* 25:2146–2157

Kohwi M, Osumi N, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A. (2005) Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci.* 25(30): 6997-7003.

Kyrousi C, Lygerou Z, Taraviras S (2017) How a radial glial cell decides to become a multiciliated ependymal cell. *Glia.* 65:1032-1042.

Latasa MJ, Cisneros E, Frade JM. (2009) Cell cycle control of Notch signaling and the functional regionalization of the neuroepithelium during vertebrate neurogenesis. *Int J Dev Biol.* 53(7):895-908.

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD, (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60(4):585-595.

Levitt, P. and Rakic, P. (1980) Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J. Comp. Neurol.* 193(3):815–840

Liu H, Belz T, Bock D, Takacs A, Wu H. (2008) The nuclear receptor *tailless* is required for neurogenesis in the adult subventricular zone. *Genes Dev.* 22(18):2473–2478

Licht T, Keshet E. (2015) The vascular niche in adult neurogenesis. *Mech Dev.* Volume 138, Part 1 56-62.

Lindvall O, Kokaia Z (2010) Stem cells in human neurodegenerative disorders—time for clinical translation? *J Clin Invest* 120(1):29–40

Lledo PM, Merkle FT, Alvarez-Buylla A. (2008) Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci.* Volume 31, Issue 8 392-400.

Lois C, Alvarez-Buylla A. (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science.* 264(5162):1145-1148

Long JE, Swan C, Liang WS, Cobos I, Potter GB, Rubenstein JL. (2009) *Dlx1&2* and *Mash1* transcription factors control striatal patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways. *J Comp Neurol.* 512: 556-572

Luskin MB (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron.* Volume 11, Issue 1 173-189

Luskin MB, Parnavelas JG, Barfield JA. (1993) Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells. *J Neurosci.* 13(4):1730-1750

Malatesta P, Götz M. (2013) Radial glia - from boring cables to stem cell stars. *Development.* 140(3): 483-486

Maggi R, Zasso J, Conti L. (2015) Neurodevelopmental origin and adult neurogenesis of the neuroendocrine hypothalamus. *Front Cell Neurosci.* 8:440 1-7

McCarthy M, Turnbull DH, Walsh CA, Fishell G. (2001) Telencephalic neural progenitors appear to be restricted to regional and glial fates before the onset of neurogenesis. *J Neurosci.* 21(17):6772-6781

Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* Volume 13, Issue 5 1071–1082

Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(50):17528–17532

Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci.* 7(2):136-144

Miyata T, Kawaguchi A, Saito K, Kawano M, Muto T, Ogawa M. (2004) Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131(13): 3133–3145

Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (2008) Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* Volume 3, Issue 3 265–278

Mori T, Buffo A, Götz M. (2005) The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 69:67-99.

Morshead CM, Garcia AD, Sofroniew MV, van der Kooy D (2003) The ablation of glial fibrillary acidic protein-positive cells from the adult central nervous system results in the loss of forebrain neural stem cells but not retinal stem cells. *Eur. J. Neurosci.* 76–84

Nakahira, E., and Yuasa, S. (2005) Neuronal generation, migration, and differentiation in the mouse hippocampal primordium as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation. *J. Comp. Neurol.* 483:329–340

Ninkovic J, Götz M. (2013) Fate specification in the adult brain--lessons for eliciting neurogenesis from glial cells. *Bioessays*. 35:242-252

Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* 136–144

Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Kriegstein AR. (2007) Contribution of intermediate progenitor cells to cortical histogenesis. *Arch. Neurol.* 64(5):639–642

Noctor S C, Martínez-Cerdeño V, Kriegstein AR. (2008) Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 508(1): 28–44

Nomura T, Takahashi M, Hara Y, Osumi N. (2008) Patterns of neurogenesis and amplitude of Reelin expression are essential for making a mammalian-type cortex. *PLoS One*. 2008 3(1):1-11

Okazaki T, Gotoh Y. (2018) An Unexpected Calm: Mfge8 Controls Stem Cell Quiescence and Maintenance. *Cell Stem Cell*. 23(3): 311-312.

Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 425(4):479–494

Pollard SM, Conti L, Sun Y, Goffredo D, Smith A (2006) Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain. *Cereb Cortex* Volume 16 Suppl 1:i 112-120.

Ponti G, Crociara P, Armentano M, Bonfanti L (2010) Adult neurogenesis without germinal layers: the “atypical” cerebellum of rabbits. *Arch Ital Biol* 148(2):147–158.

Pringle NP, Richardson WD (1993) A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development* 117(2):525–533

Proctor JM, Zang K, Wang D, Wang R, Reichardt LF (2005) Vascular development of the brain requires beta8 integrin expression in the neuroepithelium. *J Neurosci* 25(43):9940-9948.

Platel JC, Gordon V, Heintz T, Bordey A. (2008) GFAP-GFP neural progenitors are antigenically homogeneous and anchored in their enclosed mosaic niche. *Glia* 57(1):66–78

Puelles L, Rubenstein JL. (2003) Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* 26(9):469-476.

Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, Temple S. (2000) Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron.* 28(1):69-80.

Quinones-Hinajosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z (2006) Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J. Comp. Neurol.* 494: 415–434

Rakic P. (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol.* 145(1):61-83.

Reynolds BA, Weiss S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* Volume 255, Issue 5052 1707-1710.

Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinajosa A, Barbaro NM, Gupta N (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427:740–744

Schlett K, Madarasz E. (1997) Retinoic acid induced neural differentiation in a neuroectodermal cell line immortalized by p53 deficiency. *Journal of neuroscience research* 405-415

Schmechel DE, Rakic P (1979) Arrested proliferation of radial glial cells during midgestation in rhesus monkey. *Nature* 277(5694): 303-305

Schuermans C, Armant O, Nieto M, Stenman, J.M, Britz O, Klenin N, Seibt J, Brown C, Tang H, Cunningham J.M. (2004) Sequential phases of neocortical fate specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 2892-2902

Seki T, Arai Y. (1993) Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J. Neurosci.* 13(6): 2351–2358

Seki, T., Sato, T., Toda, K., Osumi, N., Imura, T., Shioda, S. (2014) Distinctive population of Gfap-expressing neural progenitors arising around the dentate notch migrate and form the granule cell layer in the developing hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 522(2):261–283.

Selden NR, Al-Uzri A, Huhn SL, Koch TK, Sikora DM, Nguyen-Driver MD, Guillaume DJ, Koh JL, Gultekin SH, Anderson JC, Vogel H, Sutcliffe TL, Jacobs Y, Steiner RD (2013) Central nervous system stem cell transplantation for children with neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Neurosurg Pediatr* 11:643–652

Seri B, Garc'ia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 478(4):359–378

Shen Q, Wang Y, Dimos JT, Fasano CA, Phoenix TN, Lemischka IR, Ivanova NB, Stifani S, Morrisey EE, Temple S. (2006) The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci.* 9(6): 743-751

Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM (2008) Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* Volume 3, Issue 3 289–300

Shibata T, Yamada K, Watanabe M, Ikenaka K, Wada K, Tanaka K, Inoue Y (1997) Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J. Neurosci.* 17(23): 9212–9219

Singec I, Knoth R, Meyer RP, Maciaczyk J, Volk B, Nikkhah G, Frotscher M, Snyder EY (2006) Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nat Methods* 3(10):801-806

Singla V, Reiter JF. (2006) The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* 313:629–633

Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, James D, Mayer S, Chang J, Auguste KI, Chang EF, Gutierrez AJ, Kriegstein AR, Mathern GW, Oldham MC, Huang EJ, Garcia-Verdugo JM, Yang Z, Alvarez-Buylla A. (2018) Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*. 555(7696):377-381

Spassky N, Goujet-Zalc C, Parmantier E, Olivier C, Martinez S. (1998) Multiple restricted origin of oligodendrocytes. *J. Neurosci*. 18(20):8331–8343

Sun Y, Pollard S, Conti L, Toselli M, Biella G, Parkin G, Willatt L, Falk A, Cattaneo E, Smith A (2008) Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture. *Mol Cell Neurosci* Volume 38, Issue 2 245-258

Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G (2004) Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46(1):41–52

Steiner B, Klempin F, Wang L, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G. (2006) Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia* 54(8):805–814

Stenman J, Toresson H, Campbell K. (2003) Identification of two distinct progenitor populations in the lateral ganglionic eminence: implications for striatal and olfactory bulb neurogenesis. *J Neurosci*. 23(1):167-174.

Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH (2007) In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2(+) neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 1(5):515–528

Tamaki S, Eckert K, He D, Sutton R, Doshe M, Jain G, Tushinski R, Reitsma M, Harris B, Tsukamoto A, Gage F, Weissman I, Uchida N (2002) Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. *J Neurosci Res* 69(6):976–986

Tan X, Shi SH (2013) Neocortical neurogenesis and neuronal migration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2(4):443-459.

Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L (2008) A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3(3):279–288

Taverna E, Götz M, Huttner WB. (2014) The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 30:465-502.

Te Boekhorst V, Preziosi L, Friedl P (2016) Plasticity of Cell Migration In Vivo and In Silico. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 32:491-526.

Tekki-Kessarlis N, Woodruff R, Hall AC, Gaffield W, Kimura (2001) Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development* 128(13):2545–2554

Voigt T. (1989) Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol.* 289(1):74-88

Waclaw RR, Allen ZJ 2nd, Bell SM, Erdélyi F, Szabó G, Potter SS, Campbell K. (2006) The zinc finger transcription factor Sp8 regulates the generation and diversity of olfactory bulb interneurons. *Neuron.* 49(4):503-516.

Weiss S, Reynolds BA, Vescovi AL, Morshead C, Craig CG, van der Kooy D (1996) Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci.* 19(9):387–393

Wolfes AC, Dean C. (2018) Culturing In Vivo-like Murine Astrocytes Using the Fast, Simple, and Inexpensive AWESAM Protocol. *J Vis Exp.* 131.

Wu S, Wu Y, Capecchi MR. (2006) Motoneurons and oligodendrocyte are sequentially generated from neural stem cells but do not appear to share common lineage-restricted progenitors in vivo. *Development* 581– 590

Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A (2003) Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* 21(2):183-186.

Yuan TF, Liang YX, Tay D, So KF, Ellis-Behnke R. (2015) Specialized vasculature in the rostral migratory stream as a neurogenic niche and scaffold for neuroblast migration. *Cell Transplant.* 24(3):377-390.

Young KM, Fogarty M, Kessar N, Richardson WD. (2007) Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. *J Neurosci.* 27(31):8286-8296.

Youngblood JL, Coleman TF, Davis SW (2018) Regulation of Pituitary Progenitor Differentiation by β -Catenin. *Endocrinology.* 159(9):3287-3305

Zádori A, Agoston VA, Demeter K, Hádinger N, Várady L, Köhídi T, Göbl A, Nagy Z, Madarász E. (2011) Survival and differentiation of neuroectodermal cells with stem cell properties at different oxygen levels. *Exp Neurol.* 227(1):136-148.

Zhang J, Jiao J. (2015) Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *Biomed Res Int.* 2015:727542. 1-14

10. Saját publikációk

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

Kohidi T, Jady AG, Marko K, Papp N, Andrasi 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)

Folyóiratcikk/ Szakcikk (Folyóiratcikk)/ Tudományos

IF: 4,300

Markó K, **Kóhidi T**, Hádinger N, Jelitai M, Mezo G, Madarász 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)

Folyóiratcikk/ Szakcikk (Folyóiratcikk)/ Tudományos

IF: 4,092

Egyéb -nem az értekezés témájában megjelent- eredeti közlemények:

Zs Berces, J Pomothy, ÁCs Horváth, **T Kóhidi**, É Benyei, Z Fekete, E Madarász, A
Pongrácz
Effect of nanostructures on anchoring stem cell-derived neural tissue to artificial
surfaces.

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

Folyóiratcikk/ Szakcikk (Folyóiratcikk)/ Tudományos

IF: 3,920

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)

Folyóiratcikk/ Szakcikk (Folyóiratcikk)/ Tudományos

IF: 3,562

Orsolits B, Borsy A, Madarasz E, Meszaros Z, **Kohidi T**, Marko K, Jelitai 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)

Folyóiratcikk/ Szakcikk (Folyóiratcikk)/ Tudományos

IF: 4,202

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)

Folyóiratcikk/ Szakcikk (Folyóiratcikk)/ Tudományos

IF: 4,699

11. 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.

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

Köszönettel tartozom Dr. Hádinger Nórának a biopsziás tüvel való sejtzölálás során, Dr. Jelítai 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 segítségre 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 megvitatnom az aktuális tudományos kérdéseket és a munkát kísérő jó hangulatot:

Barabás Kornélia, Demeter Kornél, Fekete Rebeka, Gaál Katalin, Hádinger Nóra, Jády Attila, Jelítai 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 Suzan, 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.