

**Zárójelentés a „Sejtbeültetés a központi idegszövetbe: a bevitt sejtek differenciációs állapota és a befogadó szövet harmonizációja” c. OTKA-posztdoktori támogatás keretében nyert eredmények összefoglalása.**

Korábbi munkánkban (Demeter és mtsai. 2005) megmutattuk, hogy az idegi őssejtek sorsát alapvetően befolyásolja a szöveti környezet. Míg a fejlődő, embrionális idegrendszerben az embrionális idegi őssejtek idegsejt irányba differenciálódnak és bevándorolnak a befogadó szövet sejtjei közé, addig az idegsejt-képzés szakaszán túl lévő központi idegrendszer szövetében, beültetés után megőrzik differenciálatlan állapotukat, és nem keverednek a befogadó szövet sejtjeivel. A felnőttkori idegrendszerben a beültetett őssejtek differenciációjának elmaradását egyaránt okozhatja a differenciációt indukáló, illetve a differenciálódó sejtek túlélését biztosító faktorok hiánya. A posztdoktori pályázat keretében végzett munkám során kerestem azokat a tényezőket, amelyek elősegíthetik a beültetett idegi őssejtek és/vagy idegsejtek integrálódását/túlélését a kifejlett agyszövetben.

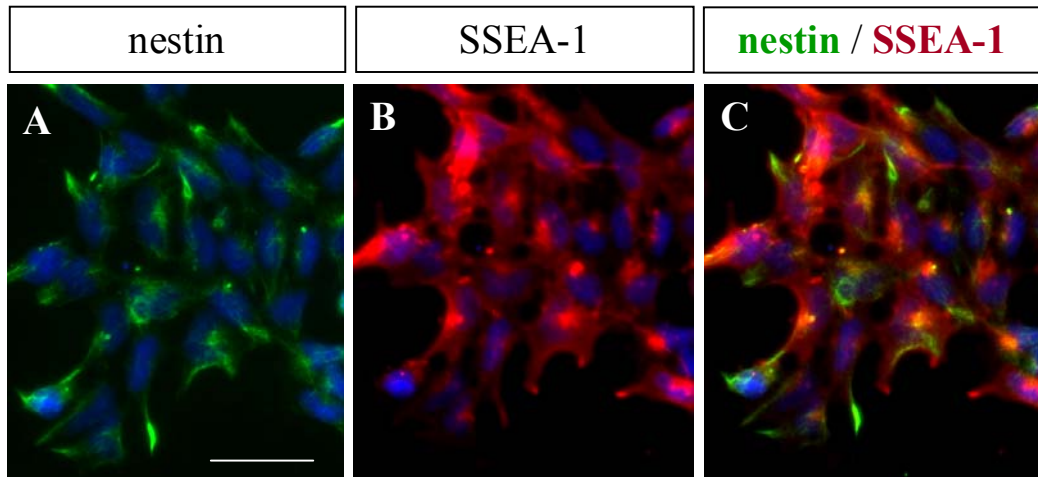
I. Differenciáltatott idegi őssejtek implantációja kifejlett központi idegrendszerbe

Mivel felnőttkori idegsejt képzés csak kis mértékben és csak néhány agyterületen történik, feltételezhető, hogy az idegsejt irányú differenciációt indukáló faktorok csak korlátozott mértékben és meghatározott területen fordulnak elő (Seaberg és van der Kooy 2002). Idegi irányba már elkötelezett sejtek beültetése megnövelheti az integrálódó sejtek arányát. A korábbi implantációs kísérletekben használt NE-4C idegi őssejtek sok tekintetben hasonlítanak az elkötelezetlen, embrionális idegi őssejtekhez (nestin és SSEA-1 immunreaktivitás (1. ábra), rövid sejtciklus).

Feltételezhető volt, hogy az NE-4C sejtek in vitro differenciáltatásával, amelynek során ideg- és asztrogliá sejtek jönnek létre (Schlett és Madarász 1997), olyan sejteket nyerünk, amelyek nagyobb arányban képesek integrálódni a felnőttkori idegrendszerbe.

Az érett idegsejtek nem vihetőek szuszpenzióba mivel kifejlett dendritjük és axonjuk olyan mértékben sérülne, hogy az idegsejtek pusztulásához vezetne, ezért a korábbi beültetéseknel használt neuroektodermális őssejtek helyett fiatal idegsejteket vagy

idegsejt irányba már elkötelezett, de még osztódó sejteket (progenitorok) lehet a beültetéshez használni. A közelmúlt kutatásai azt mutatták, hogy a fejlődő agykéregben az első idegsejtek megjelenésével együtt kialakuló radiális-glia sejtek szintén létrehozhatnak idegsejteket, azaz idegsejt-progenitorként is viselkednek (Hartfuss és mtsai 2001; Götz és mtsai. 1998).



**1. ábra**

A neuroektoderma marker nestin intermedier filamentum (A és C) és SSEA-1 sejt felszíni össejt antigén (B és C) egyaránt kimutatható immunocitokémiai festéssel az NE-4C sejtek indukátlan tenyészetében (1. stádium) Mércé: 25  $\mu$ m

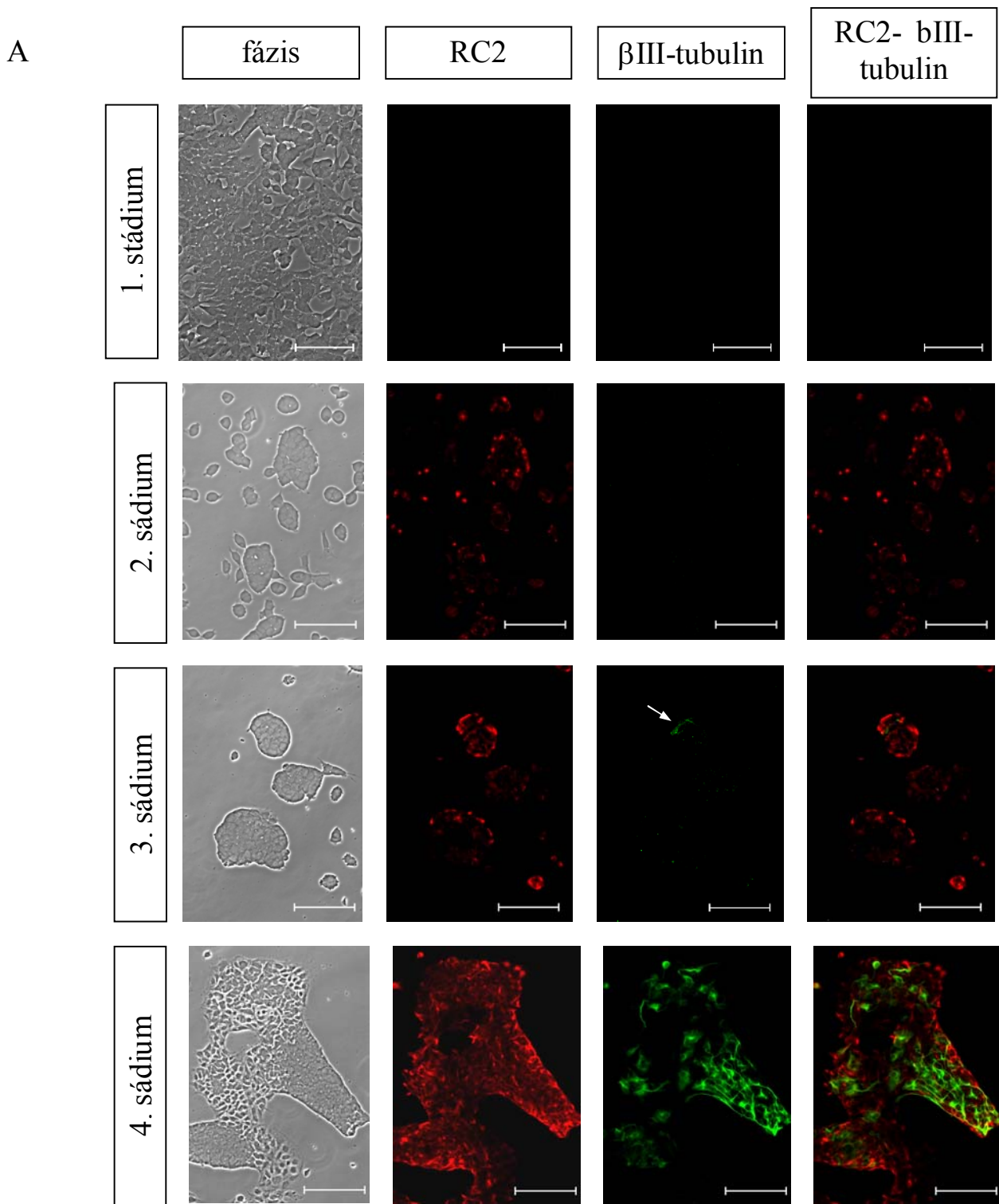
Első lépésként meghatároztuk, hogy az NE-4C sejt vonal in vitro differenciálódásának melyik stádiumaiban tartalmaznak a tenyészetek a legnagyobb számban fiatal ideg-, illetve radiális-glia sejteket. Az NE-4C sejt vonal retinsav (RA) indukálta in vitro idegi differenciációját jellemző stádiumokat az I. táblázat foglalja össze. A differenciáció 3-4. stádiumára jellemző az idegsejt előalakok kialakulása (Schlett és mtsai 1997 és 2/A-B ábra) amelyeket  $\beta$ III-tubulin kifejeződésük alapján azonosíthatunk. Az in vitro idegi sejt differenciálódás ezen stádiumában jelentősen megnő a kérgi radiális-glia sejtekre jellemző pax6 gén expressziója és a kérgi proneurális bHLH transzkripciós faktor, a neurogenin2 átíródása (2/C ábra) (Kageyama és Nakanishi, 1997). A radiális-glia sejtekre jellemző RC2-t fehérjét kifejező sejtek, a pax6 gén aktivációjával együtt már a differenciáció korai stádiumaiban (2-4. stádium) megjelennek, és nagy számban vannak jelen a retinsavval indukált NE-4C tenyészetekben az idegsejt képződés fő szakában (2/A-B ábra).

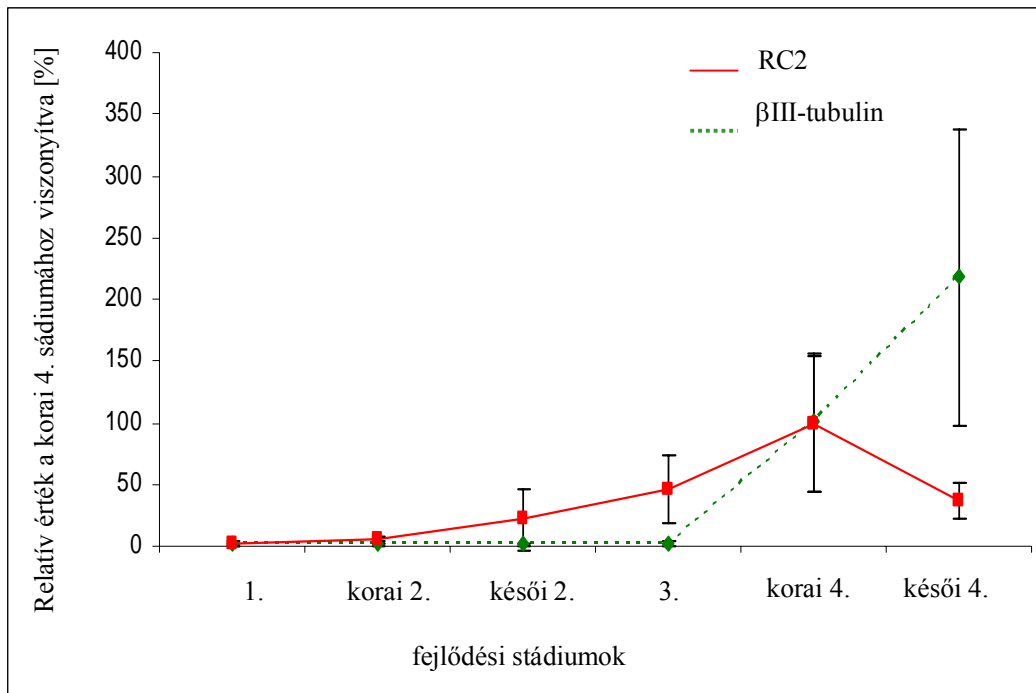
I. Táblázat Az NE-4C neuroektodermális idegi őssejt-vonal RA indukálta idegi irányú differenciációjának jellemző stádiumai

Stádium		Indukció napja	Sejtbiológiai események	Tenyészet mintázata	Jellemző sejtformák	
száma	neve				Sejtalakok	Fenotípus markerek
1.	Indukálatlan	0	folyamatos sejtosztódás	egy-sejt réteg	egyforma, építél alakú őssejtek	Nestin (Schlett K és Madarász E, 1997) <sup>5</sup> , SSEA1
2.	Kezdeti	1-2	osztódás és szelektív érzékenység a depolarizációra (Herberth et al 2002); változó sejtadhézió (Schlett et al 2000; Tárnok et al 2002)	egy-sejt réteg	egyforma, építél alakú őssejtek	Nestin (Schlett K és Madarász E, 1997) <sup>5</sup> , RC2, SSEA-1
3.	Aggregáció	2-4	csökkenő osztódás (Schlett and Madarász 1997) aggregáció; idegsejtképződés kezdete	aggregátumok	őssejtek; radiális glia sejtek; idegsejt előalakok	SSEA-1, Nestin, RC2 βIII-tubulin, neurofillamentum (Schlett K és mtsai., 1997)
4.	Kivándorlás	3-7	sejtkivándorlás az aggregátumokból; idegsejtképződés, nyúlványnövekedés	kivándorló sejtek egy-sejt rétege a fellazuló aggregátumok körül	radiális glia sejtek; őssejtek; idegsejt előalakok	RC2, Nestin SSEA-1 βIII-tubulin, MAP2, NeuN,
5.	Idegsejt érés	6-11	csökkenő idegsejtképződés; idegsejt érés (Herberth et al 2002; Jelitai et al 2002; 2006); idegsejtek hálózatának kialakulása; aljzatsejtek osztódása	idegsejtek hálózata az egy-sejt réteget alkotó aljzatsejteken	idegsejt előalakok ; differenciálódó idegsejtek; őssejtek	βIII-tubulin, MAP2, NeuN synaptophysyn , NMDA receptorok (Jelitai M és mtsai., 2002) Nestin, SSEA1
6.	Asztrogliasejt képzés	10-	idegsejtek aggregációja; neurit kötegek kialakulása; asztrogliasejtek képzése; aljzatsejtek osztódása	idegsejt kötegekkel összekötött idegsejt-aggregátumok az egy-sejt réteget alkotó aljzatsejteken	eltérően differenciált idegsejtek; asztrogliasejtek; őssejtek	βIII-tubulin, MAP2, NeuN, synaptophysyn, NMDA receptor (Jelitai M és mtsai., 2002) GFAP, S100β (Schlett K és Madarász E, 1997) <sup>5</sup> és nem publikált adatok Nestin, SSEA1

## 2. ábra

Az RC2 és  $\beta$ III-tubulin immunreaktív sejtek az NE-4C sejtvonal indukátlan (1. stádium) és RA indukált (2-4 stádium) tenyészetében.

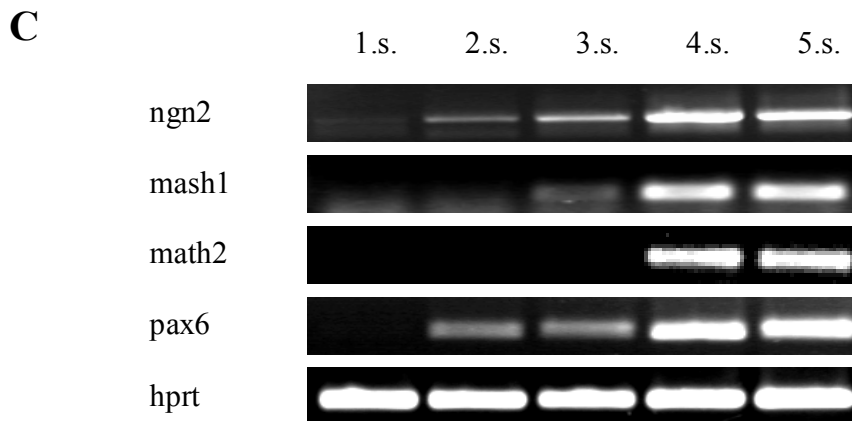


**B**

**A:** Reprezentatív fázis kontraszt (első oszlop) és RC2 (második oszlop; piros), βIII-tubulin (harmadik oszlop; zöld) valamint kettős (4. oszlop) immunfestett mikroszkópos képek az NE-4C sejtvonal korai differenciációs szakaszaiból (1-4 stádium). A RA kezelés hatására az 1. stádiumra jellemző egysejtréteg (első sor) felbomlik, és a sejtek aggregátumokat képeznek. Az alakuló aggregátumokban, a 2. stádium végétől jelennek meg az első differenciált, RC2 immunreaktív sejtek (második sor). Az első éretlen, βIII-tubulin immunreaktív idegsejt-előalakok ezt követően a kompakt aggregátumokban jelennek meg a differenciáció 3. stádiumában (harmadik sor). A differenciáció 4. stádiumában (4. sor) a túlnyomórészt RC2-t vagy βIII-tubulin-t kifejező sejtek kivándorolnak az aggregátumokból. A kettős immunfestés (4. oszlop) jól mutatja, hogy a két sejtmarker nem fejeződik ki azonos sejtben.

mérce: 100 μm

**B:** A különböző sejt típusok differenciációjának mértékét az immunreaktív területek meghatározásával állapítottuk meg. Négy független kísérlet során, egyenként 30 mikroszkópos területen (10x objektívvel) megmértük az RC2 és βIII-tubulin immunreaktív területeket. A grafikon egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatja. A két immunjelölés összevethetősége miatt a mért adatokat a korai 4. szakasz adataihoz, mint 100 %-hoz viszonyítottuk. Az adatok egyértelműen mutatják, hogy az RC2 immunreaktív sejtek az idegsejtek kialakulása előtt jelennek meg, és arányuk korai 4. szakaszban éri el a maximumot, majd csökken. Ugyanakkor az idegsejtekre jellemző immunreaktivitás a teljes 4. szakaszban növekszik.



**C:** Az idegsejt irányú elköteleződésre jellemző transzkripciós faktorok expressziójának RT-PCR vizsgálata a különböző differenciációs szakaszokban.

A differenciálatlan NE-4C tenyészetekben (1. stádium) (1.s.) nem fejeződnek ki proneurális (neurogenin-2 (ngn2), mash1), neuronális (math2) bHLH faktorok, vagy a korai előagy idegi irányú elköteleződését jelző pax6 transzkripciós faktor. Az idegsejtek kialakulása előtt (2. stádium) (2.s.) illetve az idegsejt-prekurzorok megjelenésével egy időben (3. stádium) (3.s.) jelentősen megnő a proneurális gének és a pax6 expressziója. A neuronális math2 mRNS-e csak az idegsejteket már nagy számban tartalmazó tenyészetekben (4-5. stádium) (4.s. és 5.s.) volt kimutatható. Az eredményeket a hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (hprt) gén mRNS-ének szintjéhez viszonyítottuk.

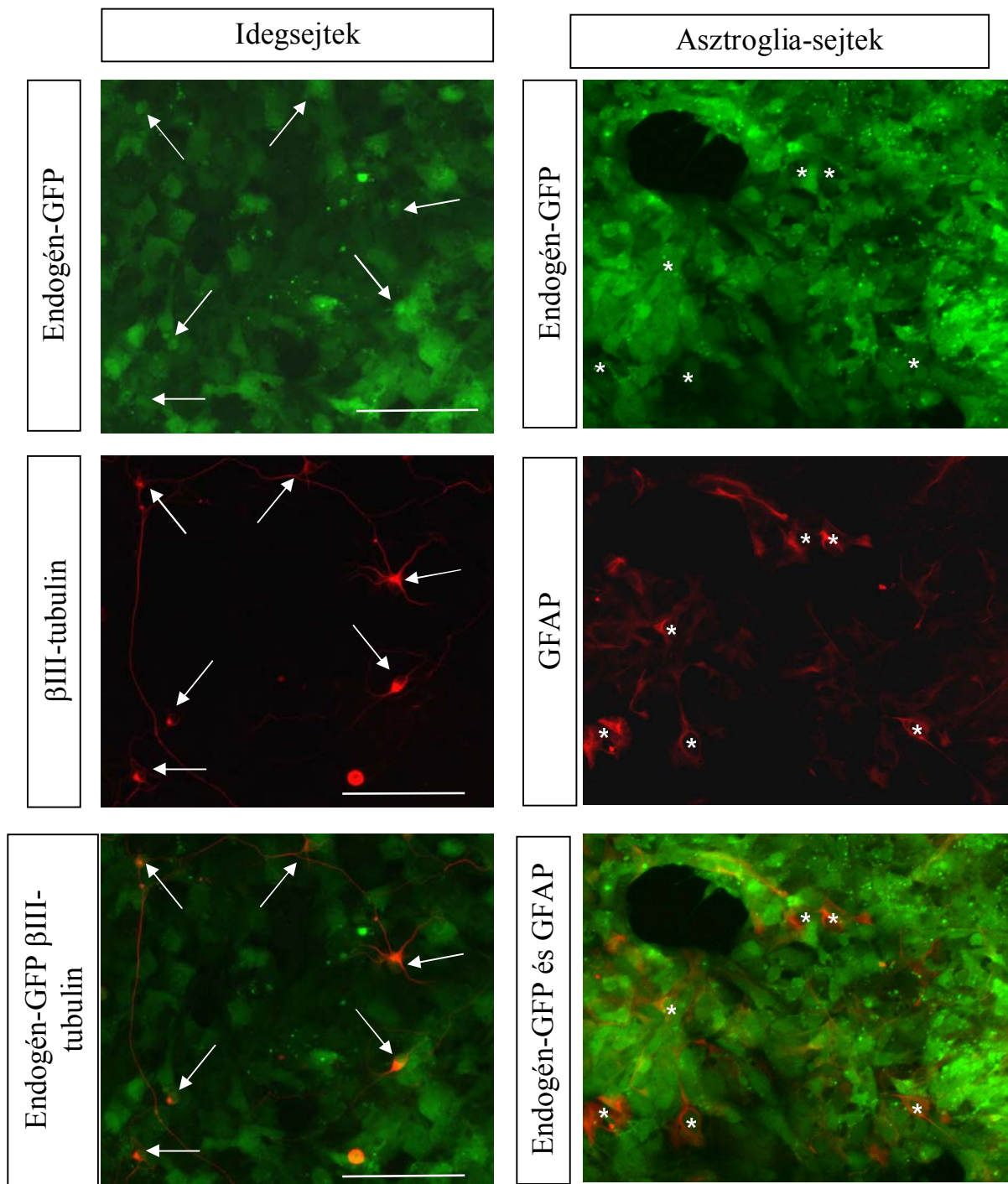
A fentiek alapján implqntációhoz a differenciáció 4. stádiumában lévő zöld fluoreszcens fehérjét kifejező NE-4C sejteket használtunk. A sejt-szuszpenzióból, mely főként radiális glia és fiatal idegsejteket tartalmaz, 10 000 sejtet ültettünk be kifejlett állatok agykérgébe és hippocampus-ába. A sejt-szuszpenzió egy részét tovább tenyésztettük. Minden esetben megállapítottuk, hogy az in vitro tovább-tenyésztett sejtek 10 nap alatt, nagy számban differenciálódtak ideg és asztroglia sejtekké, in vitro (3. ábra). Az implantált sejtek „sorsát” hisztológiai/immunhisztológiai módszerrel követtük. A befogadó-állatok agyát a beültetést követő 10. napon fixáltuk, és a beültetett területeket fagyasztott metszetek készítése után immuncitokémiai módszerrel vizsgáltuk. A zöld fluoreszcencia alapján azonosított beültetett sejtek között nagy számban azonosítottunk GFAP-t kifejező asztroglia sejteket (4. ábra), de idegsejtekké differenciált NE-4C sejteket nem találtunk.

Összefoglalás:

A kifejlett idegrendszer nem indukálta idegsejtek kialakulását már elkötelezett idegi progenitorokból sem. Nem támogatta sem a fiatal idegsejtek életbemaradását, sem integrációját a befogadó szövetbe.

Következtetés:

Miután az NE-4C sejtek rendelkeznek a neuron-képzés lehetőségével, az adatok azt mutatják, hogy az intracerebrális neuron-fejlődés elmaradását a kifejlett előagy szöveti környezete akadályozta



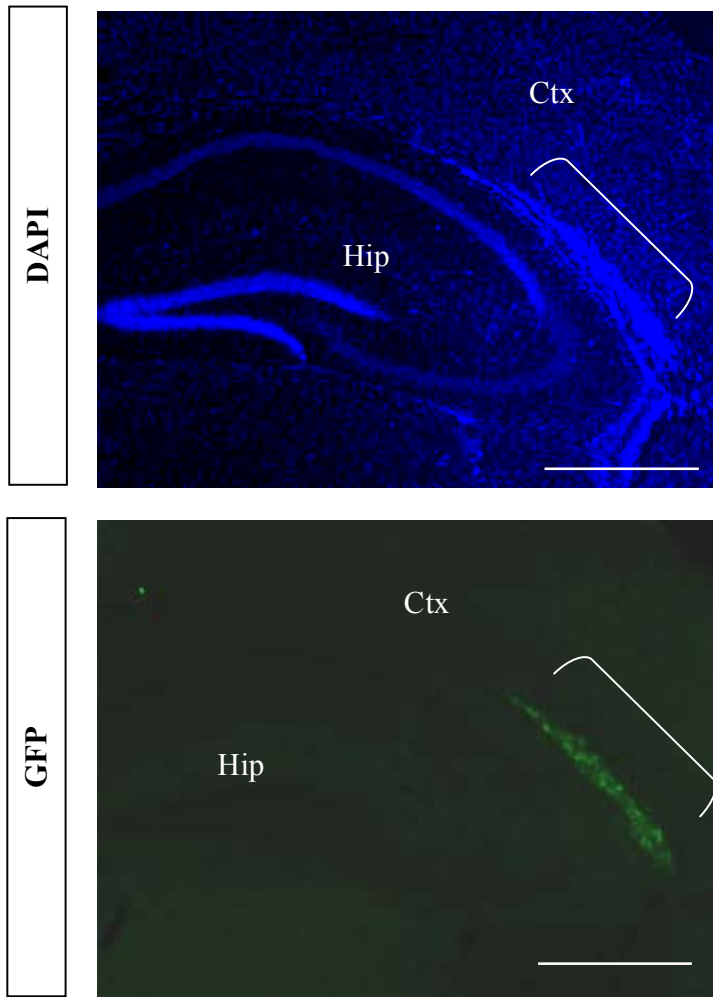
### 3. ábra

A differenciáció 4. stádiumában az implantációhoz használt sejtuszpenzióból az eredeti sejtszámnak megfelelő sejtsűrűségben visszaültetett sejtek további 10 napos in vitro tenyésztés után jelentős számban tartalmaztak ideg (jobb oszlop) és asztroglia sejteket. Mind az ideg ( $\beta$ III-tubulin) mind az asztroglia (GFAP) irányba differenciált sejtek megőrizték zöld flureszceins fehérje (GFP) expressziójukat.

Mérete: 100  $\mu$ m



**A**



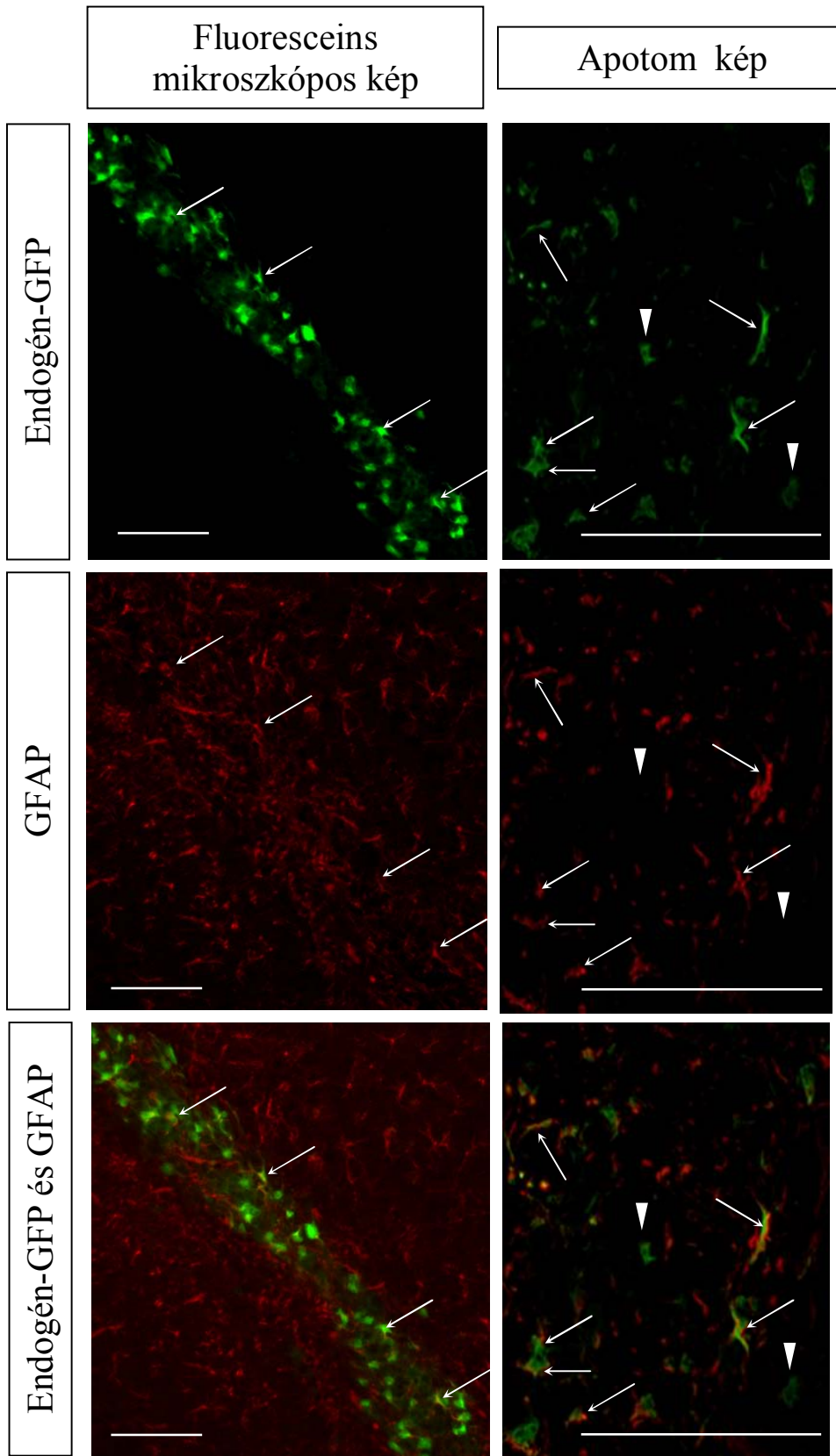
**4. ábra** (9. és 10. oldal)

**A:** Az előagy kéregbe ültetett sejteket GFP expressziójuk alapján azonosítottuk. Hip: hippocampus, Ctx: cortex

**B:** A GFP-t kifejező sejtek jelentős része GFAP-t tartalmaz (fehér nyíl). A GFAP immunreaktivitást (piros) optikai szeletelés (Zeiss apotom rendszer) segítségével azonosítottuk a vizsgált sejtekben. Az így elkészített képeken egyértelműen láthatók voltak a GFP-jelölt (zöld) sejtek között az asztroglia irányba differenciált és nem differenciált (GFAP immunnegatív) sejtek is (fehér háromszög).

mérce: A: 500  $\mu\text{m}$ , B: 50  $\mu\text{m}$

**B**



## II. Az NE-4C sejt vonal regionális elkötelezettsége és a regionális elkötelezettség kialakulásának vizsgálata

Az idegrendszer tagolódása már az idegsejtek képzése előtt megkezdődik majd az egyedfejlődés folyamán fokozatosan növekedve alakul ki az idegsejtek fenotípusában is megjelenő igen nagyfokú változékonyság. Az idegsejtek végső fenotípusa nagymértékben függ kialakulásuk helyétől. Így, ha az NE-4C sejtek hordoznak pozíció (testtengelyek) szerinti elkötelezettséget, feltételezhető, hogy az általuk létrehozott idegsejtek nem képesek integrálódni az elkötelezettségüktől eltérő területeken.

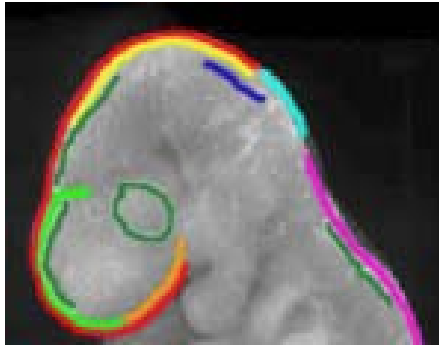
Az idegi differenciáció és az idegi őssejtek vizsgálata kapcsán felvetődő kérdés, hogy az idegi őssejtek milyen mértékben hordozzák az eredetüknek megfelelő regionális elköteleződés jegyeit, illetve ezek milyen mértékben változtathatóak (Nakagawa és mtsai. 1996; Hitoshi és mtsai. 2002; Santa-Olalla és mtsai. 2003; Hack és mtsai 2004). Az elmúlt években publikált adatok részben egymásnak ellentmondó eredményekről számoltak be. A vizsgálatok során az idegi őssejteket „*neurosphere*” kultúrában tartották fenn in vitro. Az ilyen körülmények között tenyésztett sejtek között ugyan nagy számban vannak jelen idegi őssejtek, de azok mellett jelentős a különféle irányban és mértékben differenciálódott sejtek aránya is (Campos és mtsai 2004). Ha a regionális elköteleződés függ a sejt differenciáltsági fokától, akkor az eredményeket nagymértékben befolyásolhatja, hogy az adott *neurosphere* milyen mértékben tartalmazott őssejteket illetve differenciált sejteket.

Az idegsejt-képzés és a pozicionális elköteleződés összefüggésének tanulmányozására az NE-4C sejt vonal differenciálatlan és differenciált tenyészetében vizsgáltuk egyes in vivo régió-specifikusan kifejeződő gének aktiválódását. A proneurális neurogenin2 és a mash1 bHLH gének mellett olyan „homeo-gének expresszióját vizsgáltuk, amelyek in vivo kifejeződése „lefed” a központi idegrendszer teljes anterior-posterior tengelyét, és sok dorso-ventrálisan tagolt területét, és amelyek többsége in vivo egymással nem átfedő területeken fejeződik ki (5/A ábra).

Az idegsejtek kialakulásában kulcsszerepet játszó proneurális bHLH gének közül a neurogenin2 és a mash1 egymással nem átfedő területeken fejeződnek ki (Fode és mtsai

2000). Az NE-4C sejt vonal differenciációja során mindkét bHLH transzkripciós faktor expressziója jelentősen megnő az idegsejtképződés szakaszában (2/C ábra).

A fejlődő idegrendszer regionális tagolódásában fontos szerepük van a különböző homeo-box transzkripciós faktoroknak is. A vizsgált „homeo”-gének közül csak az Otx2 aktivitása volt jelentős a differenciálatlan sejtekben (1. stádium). Az összes többi gén mRNS-e nem, vagy csak igen kis mértékben volt kimutatható (5/B ábra és Herberth és mtsai. 2005). Az otx2 azonban a korai, neuruláció előtti embrió-pajzsban is expresszálódik: az epiblast sejtek és az embrionális (ES) őssejtek mindegyikének jellemzője (Perea-Gomez és mtsai., 2004). Az adatok tehát azt mutatják, hogy az NE-4C sejt vonal testtengely szerinti elkötelezettséggel nem rendelkezik. A differenciált, idegsejtekben gazdag NE-4C tenyészetekben ugyanakkor, az összes vizsgált regionálisan kifejeződő gén aktiválódott. A megfigyelés azt jelezte, hogy az NE-4C idegi őssejtekből kialakuló idegsejtek képesek lehetnek igen különböző agyi régióknak megfelelő differenciációs programok szerint fejlődni.



- Dlx2 (Distal-Less homeobox 2) ventrális előagy
- Emx2 (Empty spiracles homológ 2) dorzális előagy
- Pax6 (Paired box gene 6) dorzális előagy Otx2
- (Orthodenticle homolog 2) elő-középagy
- Otx3 (orthodenticle homolog 3) (Dmbx1) középagy
- En1 (Engrailed1) középagy
- Gbx2 (Gastrulation Brain homeobox 2) Isthmus
- Hoxb2 (Homeo box B2) 2. rombomérától caudalisan

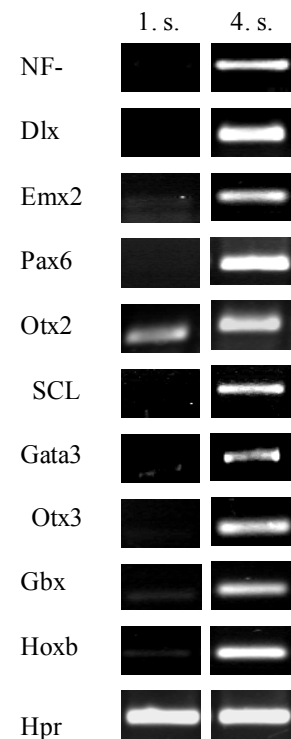
A

**5. ábra**  
Régió-specifikus gének expressziója

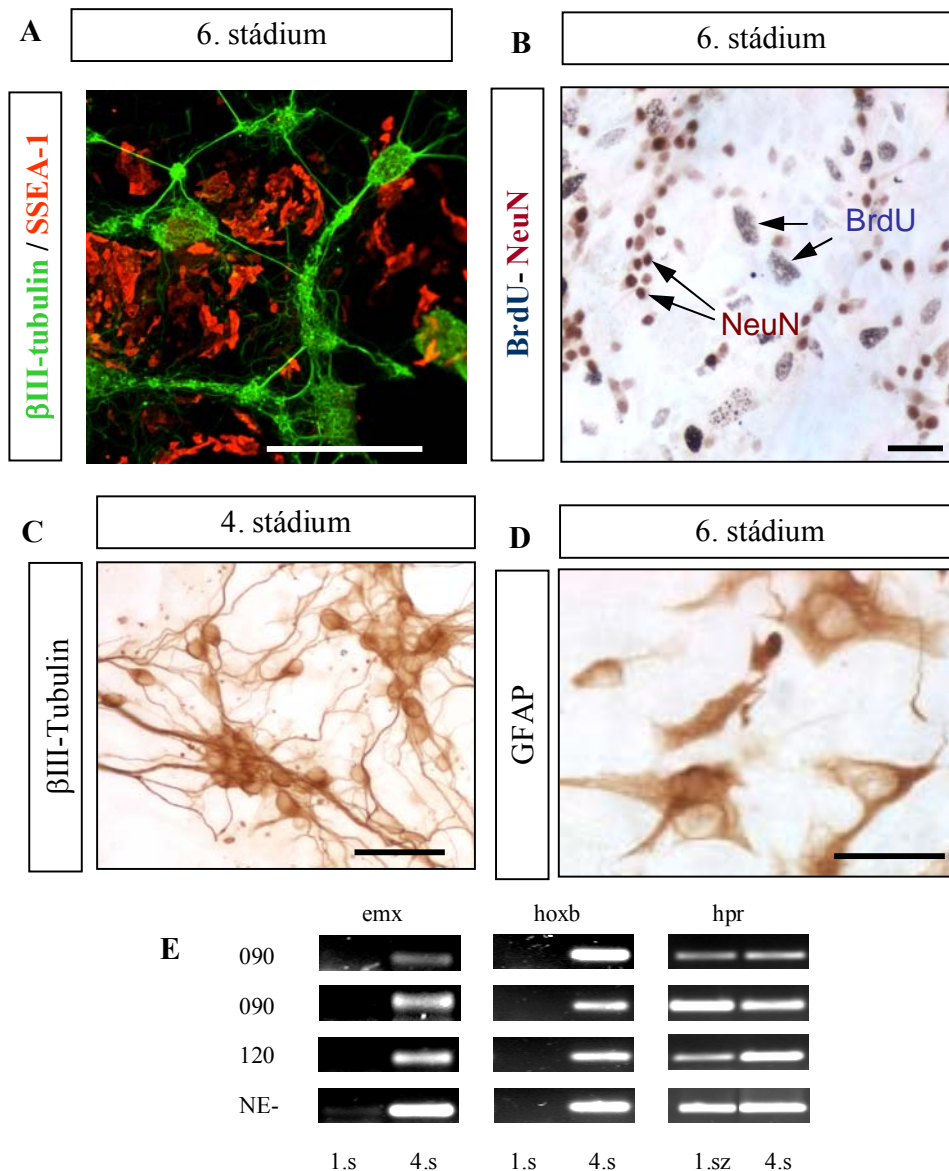
**A:** A vizsgált Regionálisan eltérő területeken kifejeződő (régió-specifikus) transzkripciós faktorok expressziós mintázatának sematikus képe 9,5 napos egér embrióban.

**B:** Régió-specifikus transzkripciós faktorok expressziója az NE-4C sejt vonal differenciálatlan (1. stádium) (1.s.) és differenciált (4. stádium) (4.s.) tenyésztésében. Az idegsejt differenciáció mértékét az idegsejtekben kifejeződő intermedier filamentum-fehérje, a neurofilamentum nehéz láncának (nfh) aktivációja mutatja. A differenciáció 1. stádiumában csak az otx2 transzkripciós faktor aktivitása jelentős, míg a differenciált tenyésztetben (4. stádium) az összes vizsgált „régió-specifikus” gén mRNS-e kimutatható. Az eredményeket a hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (hprt) gén mRNS-ének szintjéhez viszonyítottuk

B



Differenciálódó – különböző régió-specifikus géneket expresszáló - tenyészetekből izoláltuk a fennmaradó NE-4C őssejteket. A differenciáció 4. és 6. stádiumából izolált őssejtek (6/A-B), elkötelezetlen őssejt-állapotukban regionális elköteleződést nem mutattak (6/E). Indukció után (6/C-D) azonban, a differenciált tenyészetekben azonosítható volt mind az elő- (emx2) mind az utóagyi (hox2b) területekre jellemző homeo-box gén aktivitása (6/E).



**6. ábra** Az NE-4C differenciált tenyészetekben fennmaradnak differenciálatlan idegi őssejtek **A:** A differenciáció 6. stádiumában jelen lévő differenciálatlan őssejtek SSEA-1 immunreaktivitásuk alapján azonosíthatóak. **B:** A differenciált tenyészetekben fixálása előtt alkalmazott 20 perces BrdU kezeléssel számos osztódó sejtet azonosítottunk a NeuN immunreaktív idegsejtek mellett. **C-D:** Differenciált tenyészetekből osztódási potenciáljuk alapján szelektált klón (0905) újbóli RA kezelés hatására az eredeti NE-4C sejtvonallal megegyező időrendben ideg (**C**) és asztroglia (**D**) sejteket hoz létre. **E:** Sejtosztódási kapacitásuk alapján szelektált, differenciációs képességüket megőrző klónok (0901; 0905; 1204) regionális elköteleződésének RT-PCR vizsgálata. A differenciálatlan (1. stádium) (1.s.) állapotban lévő sejtek az eredeti NE-4C sejtvonalhoz hasonlóan sem az előagyra jellemző emx2-t, sem az utóagyban kifejeződő hox2b-t nem expresszálják, míg a differenciált tenyészetekben (4. stádium) (4.s.) mindkét gén mRNS-e kimutatható. Az eredményeket a hypoxanthine guanine phosphoribol transferase (hprt) gén mRNS-ének szintjéhez viszonyítottuk. mércé: 500  $\mu$ m az A és 50  $\mu$ m a B-D képeken

A fentiek alapján, a regionális elköteleződés az idegszöveti differenciáció előrehaladott stádiumaiban megjelenő sejttípus(ok)hoz köthető. A részletesebb időbeli vizsgálataink megmutatták, hogy a proneurális gének aktiválódásával párhuzamosan megjelentek a poszterior területekre jellemző (gbx2, hox2b) régiós-pecifikus gének mRNS-ei is, míg más elsősorban elő- és középagyi területekre jellemző transzkripciósfaktorok (emx2, dlx2, otx3) aktivitása csak a differenciáció 4. szakaszában vált jelentőssé (7/A ábra). Az anterior és poszterior területekre jellemző gének expressziós mintázatában talált különbséget okozhatja az idegi differenciációt indító RA jelenléte, amely ismertén „poszteriorizáló” hatást gyakorol a korai idegszövetre (Avantaggiato és mtsai. 1996). A poszteriorizáló hatás és a regionális gének aktivitása közötti összefüggés vizsgálatához a tenyészeteket folyamatos (168 órás) és standard (72 órás) RA kezelésnek tettük ki. A 4. stádiumban vett mintákban a RA poszteriorizáló hatása az otx2 gén - amelyről ismert, hogy expresszióját a RA befolyásolja (Avantaggiato és mtsai 1996) - mRNS-ének szintjében volt tetten érhető. Ugyanakkor, a RA-kezelés hosszától függően nem találtunk különbséget sem az anterior emx2, sem a poszterior gbx2, vagy hoxb2 gének aktivitása között (7/B ábra).

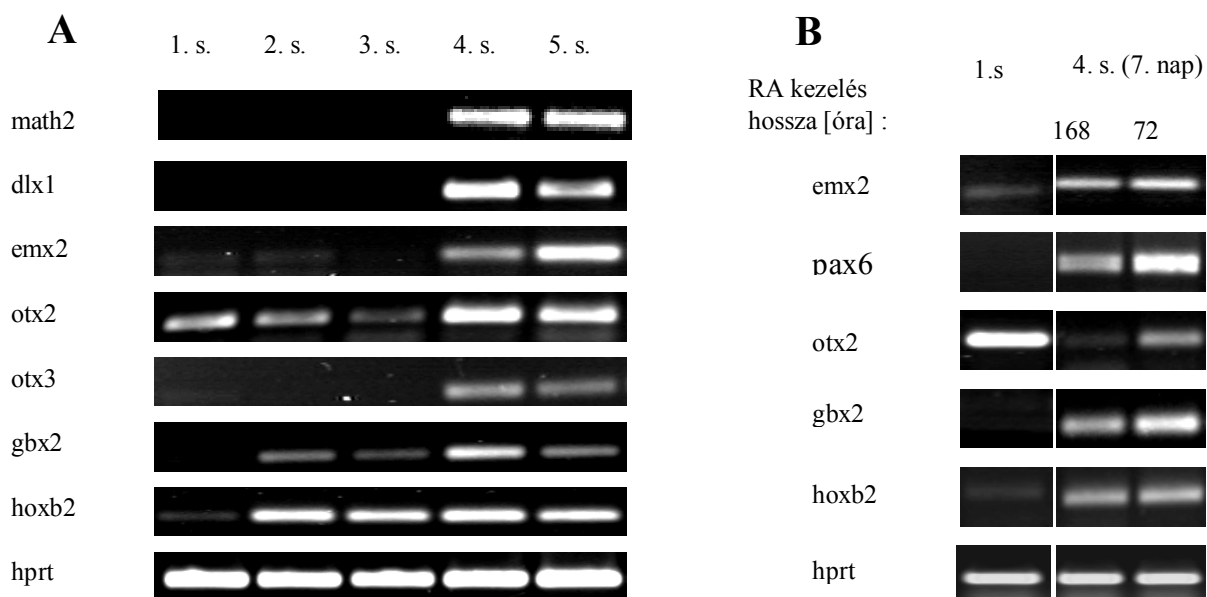
### **7. ábra** (17. oldal)

Régióspecifikus gének RT-PCR vizsgálata az NE-4C sejtvonal a differenciációja során

**A:** Az elő- (emx2, dlx2) és középagyi (otx3) területeken kifejeződő homeobox transzkripciósfaktorok mRNS-e csak a math2-t is kifejező, differenciált tenyészetekben (4-5. stádium) (4.s.) (5.s.) van jelen jelentős mennyiségben. A posterior területekre jellemző gének (gbx2, hox2b) mRNS-e már a differenciáció 2. stádiumában (2.s.) is kimutatható. Az otx2 gén folyamatosan aktív, de a RA kezelés idején a az expresszió mértéke csökken.

**B:** A folyamatos RA kezelés hatására sem változott jelentősen, sem az előagyi (emx2, pax6), sem az utóagyi (gbx2, hoxb2) gének expressziójának mértéke. A RA poszteriorizáló hatását ugyanakkor jól mutatja az otx2 kifejeződésének jelentős csökkenése folyamatos RA kezelés hatására. Az első oszlopban az 1. stádium (1.s.), a 2-3. oszlopban a differenciáció 4. stádium (4.s.) a RA kezelés kezdetét követő 7. napon rövid (72 óra) és folyamatos (168 óra) RA kezelt mintákat hasonlítottunk össze.

Az eredményeket a hypoxanthine guanine phosphoribol transferase (hprt) gén mRNS-ének szintjéhez viszonyítottuk.



A párhuzamosan aktiválódó differenciációs útvonalak alapján feltételezhető volt, hogy az NE-4C sejtekből különböző típusú idegsejtek fejlődhetnek. A regionális sokféleséget mutató mintákban megvizsgáltuk a glutamaterg és a GABAerg transzmitter fenotípusra jellemző gének kifejeződését valamint néhány olyan régióspecifikus gén aktivitását, amelyek jellemzően a monoaminerg idegsejtekben illetve az azok keletkezésének helyén fejeződnek ki, *in vivo*. Az RT-PCR vizsgálatok azt mutatták, hogy a differenciált tenyészetekben aktiválódnak a különböző transzmitter fenotípushoz köthető gének – azaz az NE-4C differenciált tenyészeiben többféle idegsejt fenotípus kialakulására is van lehetőség (8. ábra). Az eltérő neurotranszmitter fenotípusú idegsejtek kialakulását immuncitokémiai módszerrel is ellenőriztük. A differenciáció 6. stádiumában fixált tenyészetekben nagy számban találtunk GABAerg és glutamaterg (GABA és VGAT illetve Vglut2 immunreaktív) idegsejteket. Elvértve (<1%) azonosítottunk szerotonin tartalmú neuronokat, de egyáltalán nem találtunk tirozin-hydroxiláz immunpozitív sejteket (8. ábra és II táblázat).



II. Táblázat A különböző transzmitterfenotípusok előfordulási gyakorisága  
 \*100 %=NeuN immunreaktív sejtek száma

Transzmitter fenotípus	Vizsgált marker	Idegsejtek aránya
GABA-erg	GABA, VGAT	57,7±8,2*
Glutamaterg	VGlut2	44.2±1,6*
Cathecolaminerg	TH	Nem volt azonosítható
Serotonerg	5HT	< 1

### 8. ábra (19. oldal)

Különböző transzmitter fenotípusú idegsejtek megjelenése az NE-4C sejt vonal differenciációja során gén aktivitás vizsgálata RT-PCR módszerrel a differenciáció 1-5. stádiumaiban (A) és immuncitokémiai festés a differenciáció 6. szakaszában lévő stádiumában (B-E).

**A:** Az éret idegsejteket tartalmazó (neurofillament nehéz lánc mRNSt kifejező tenyészetekben) egyaránt kimutatható volt a GABAerg fenotípusra jellemző glutaminsav-dekarboxiláz 65 és 67 (gad65 és gad67), a vezikuláris GABA transzporter (vgat) és glutamaterg idegsejtekre jellemző vezikuláris glutamát transzporter 2 (vglut2). A monoaminerg idegsejtekre jellemző illetve azok keletkezésének helyén kifejeződő réióspezifikus transzkripciós faktorok (phox2b, GATA3, nkx2.2 és lmx1b) expressziója szintén jelentősen megnőtt az érett idegsejteket tartalmazó tenyészetekben. Az eredményeket a hypoxanthine guanine phosphoribol transferase (hpert) gén mRNS-ének szintjéhez viszonyítottuk.

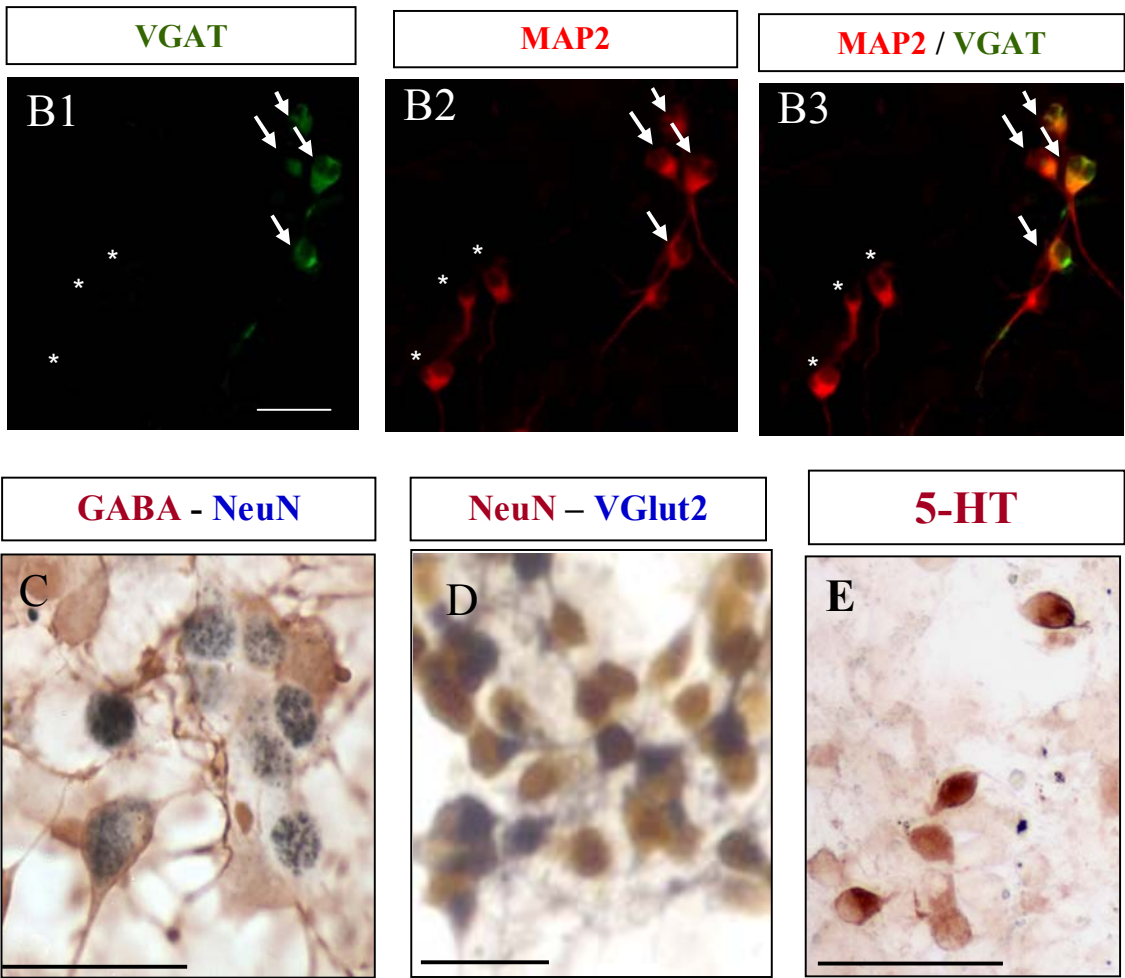
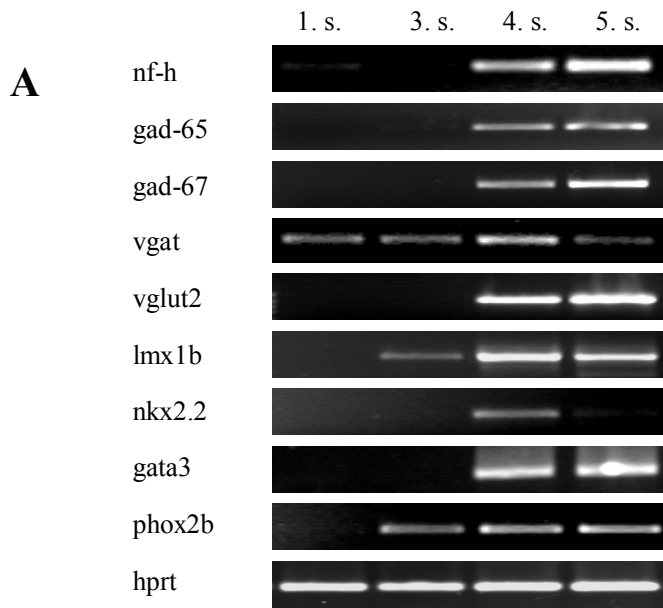
**B:** A MAP2 (piros) immunreaktív idegsejtek egy része VGAT (vezikuláris GABA transzporter) (zöld) immunpozitív (nyilak), míg más részük nem mutat VGAT immunreaktivitást (csillagok).

**C:** Idegsejt specifikus sejtmag marker (NeuN) (kék) és GABA (barna) kettős immuncitokémiai festés.

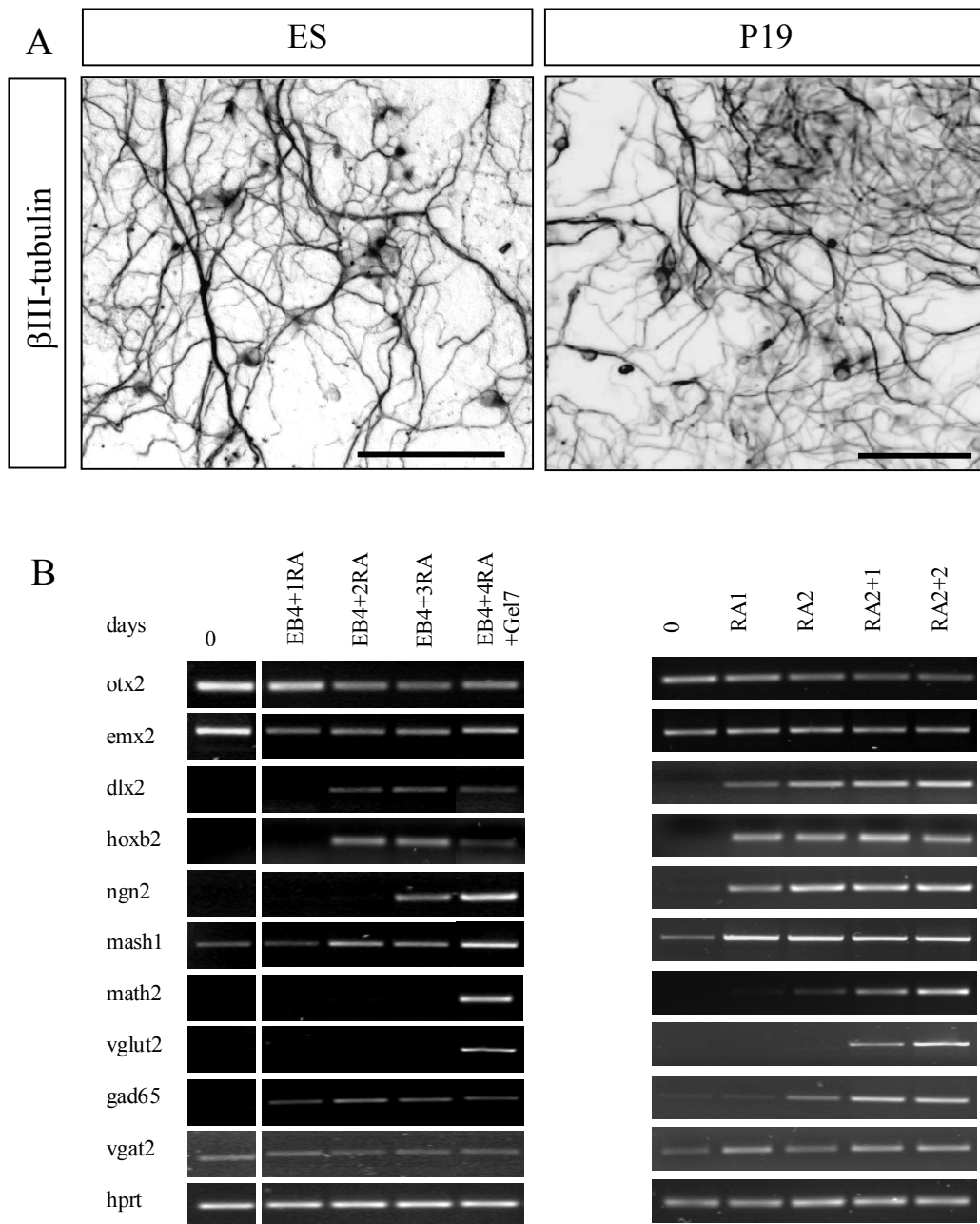
**D:** Idegsejt specifikus sejtmag marker (NeuN) (barna) és Vglut2 (kék) kettős immuncitokémiai festés.

**E:** Serotonin (5HT) immunreaktív idegsejtek

**B-E** mércse: 50 µm



Az NE-4C sejtvonallal végzett génexpressziós vizsgálatok egy részét megismételtük az embrionális őssejt (ES) R1 (Nagy és mtsai. 1993) és embrionális carcinoma (EC) P19 (Edwards és McBurney, 1983) sejtvonalakon is. Mindkét sejtvonal RA hatására jelentős mértékben idegi irányba differenciálódik (8/A ábra). A RA kezeléssel differenciáltatott ES és EC sejtek, hasonlóan az NE-4C sejtvonalhoz, mRNS szinten mutatták a regionális és transzmitter fenotípusban megjelenő sokféleséget (8/B ábra).



### 9. ábra (20. oldal)

Egér embrionális (ES) őssejtek és embrionális carcinoma (EC; P19) sejtvonalak RA-indukált in vitro differenciációja.

**A:**  $\beta$ III-tubulin immuncitokémiai festés az ES sejtek in vitro differenciációjának 15. és a P19 EC sejtek fejlődésének 4. napján. mérce: 50  $\mu$ m

**B:** RT-PCR génexpressziós vizsgálat a RA indukált differenciáció során. A differenciáció alatt mindkét sejtvonaltban megjelennek a különböző agyterületekre jellemző proneurális (ngn2, mash1) és homeobox (emx2, dlx2, hoxb2) transzkripciós faktorok mRNS-ei. A differenciált, math2-t kifejező tenyészetekben (ES 15. napon; P19 3. naptól) mind a GABAerg (gad65, vgat), mind a glutamaterg (vglut2) idegsejtfenotípusokra jellemző gének aktivitása jelentőssé válik.

Az ES mintákat differenciálatlan sejtek tenyészetéből (0), valamint 4 napos aggregáció után („embryonic body” (EB4) állapotban kezdett) 1 (EB4+1RA), 2 (EB4+2RA) és 3 (EB4+3RA) napos RA kezelés után, illetve a 4 napos RA kezelést követően 7 napos gelatinon történt tenyésztés után, a teljes differenciáció 15. napján (EB4+4RA+Gel7) gyűjtöttük. A P19 sejtek tenyészetéből a RA kezelés kezdetét követő 1. (RA1), 2. (RA2), 3. (RA2+1) és 4. (RA2+2) napján vettünk mintát. Az eredményeket a hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (hpert) gén mRNS-ének szintjéhez viszonyítottuk.

#### Összefoglalás:

1. Az in vitro kísérletek azt mutatják, hogy az éretlen idegi őssejtek nem hordoznak regionális elkötelezettséget, a regionális elköteleződést jelző gének a differenciáció meghatározott szakaszaiban aktiválódnak:

- A proneurális bHLH gének expressziója az idegsejtképződés előtt, a radiális-glia sejtek differenciációjának kezdeti szakaszában nő.
- A proneurális géneket időben követi számos régióspecifikus gén aktiválódása. Az otx3, emx2, dlx2, nkx2.2 gének az NE-4C sejtek in vitro neuronképzésének 4. stádiumában fejeződtek ki a legnagyobb mértékben. Ebben az időszakban tapasztaltuk az idegsejtképződés legnagyobb mértékét és a radiális-glia sejtek legnagyobb arányú jelenlétét.

2. Egyszeri, rövid RA kezelés hatására - további külső hatások nélkül is - több differenciációs útvonal indukálódik. Mindezek eredményeként a kezdeti homogén sejtpopuláció heterogénné válik. Egyémás mellett jelen vannak

- Radiális-glia sejtek
- Különböző mértékben differenciálódott idegsejtek
- Különböző transzmitter fenotípusú neuronok
- Asztroglia sejtek
- Eredeti fejlődési képességüket megőrző őssejtek,

valamint a különböző régiókra jellemző:

- Proneurális és
- homeo-box transzkripciós faktorok

3. A különböző catecholaminerg idegsejtek kialakulásának hiánya arra utal, hogy bizonyos sejttípusok kialakulásához további differenciációt szabályozó hatások szükségesek.

Következtetés: Az implantációhoz használt sejtek egymás mellett létező regionális sokfélesége miatt, az integrálódás hiánya nem magyarázható „regionális összeférhetetlenséggel”.

### III. A RA idegi irányú differenciációt segítő hatásának vizsgálata, in vitro

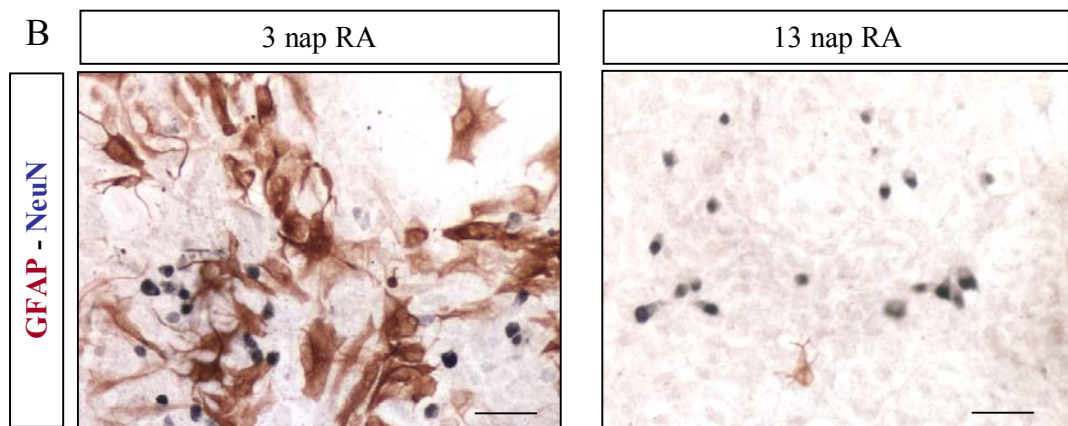
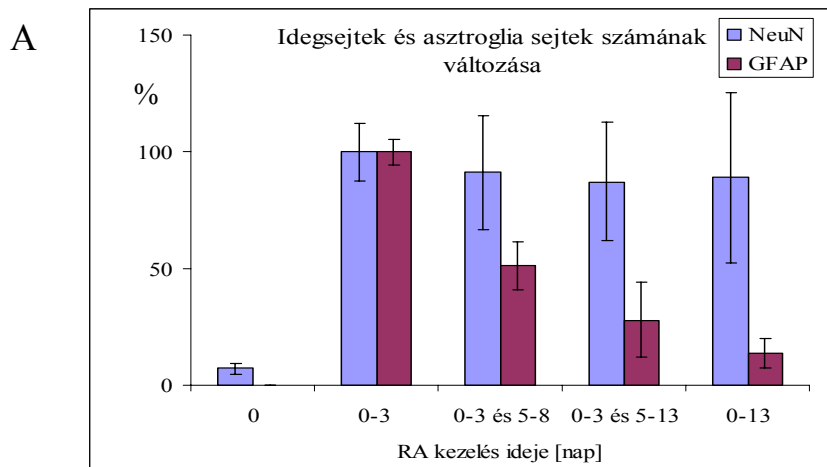
Laboratóriumunk munkatársai által végzett kísérletek szerint, fagyasztással sértett agyszövetbe implantált NE-4C idegi őssejtek kitöltik a sérülés következtében elhalt szöveti teret, de jelentős idegi irányú differenciációt nem mutatnak. A beültetett sejtek megőrzik korábbi tulajdonságaikat: in vitro visszatenyésztés után, sejtosztódási paramétereik, kromoszóma számuk és differenciációs potenciáljuk megegyezik az eredeti NE-4C sejtvonallal (Ágoston és mtsai. 2006). Kooperációban végzett implantációs kísérletek ugyanakkor arra utalnak, hogy hidrogélbe beágyazott NE-4C sejtek jelentős mértékben differenciálódtak idegsejteké, foto lézióval sértett előagyi területeken (Anderova és mtsai. 2006).

A fenti eredmények arra utalnak, hogy bizonyos szöveti környezeti változások elősegíthetik az implantált sejtek integrációját. A befogadó szöveti környezet módosítható olyan szolubilis faktorról vagy több faktor megfelelő kombinációjával, amely megváltoztatja a kifejlett idegrendszer sejtjeinek viselkedését és/vagy segíti a beültetett sejtek túlélését.

Az NE-4C sejt vonal in vitro vizsgálatával elemezhető az egyes faktorok idegi differenciációra gyakorolt hatása. Eddigi vizsgálatainkban, az idegi irányú differenciációt indukáló RA hatását tanulmányoztuk számos in vitro – NE-4C, EC, ES sejtek idegsejtképzése - rendszerben. Adataink szerint az idegi irányú differenciációhoz elégséges rövid idejű (2-3 napos) RA kezelés melynek hatására az NE-4C sejtek ideg majd asztrogliá sejteket hoznak létre (Schlett és Madarász 1997 és II. táblázat). Egy második, az asztrogliá sejtek képződése idején alkalmazott RA kezelés ( $10^{-6}$  M), ugyanakkor, jelentős mértékben csökkentette az asztrogliá sejtek kialakulását (10. ábra). Az alkalmazott RA kezelés a már differenciálódott asztrogliá sejtek túlélését, fennmaradását nem befolyásolta.

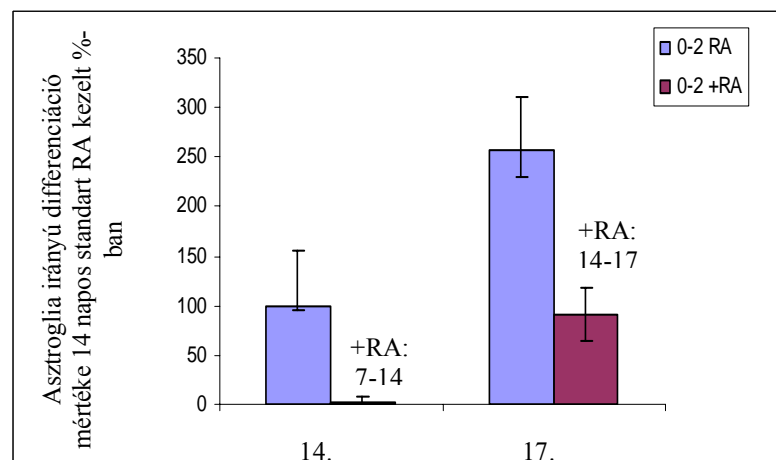
**10. ábra** A RA kezelés gátolja az asztroglia sejtek keletkezését.

**A:** Az ideg- és asztroglia sejtek számának változása különböző idejű RA kezelés hatására, a differenciáció 6. stádiumában (13. nap). A NeuN immunreaktív idegsejteket és a GFAP immunpozitív asztroglia sejteket három párhuzamos tenyészetből, 60 mikroszkópos látótéren (20x objektívvel) számoltuk és átlagoltuk. A differenciáció 5-6. stádiumában alkalmazott, illetve a folyamatos RA kezelés jelentős mértékben csökkentette a GFAP pozitív asztroglia sejtek számát, míg az idegsejtek számát nem befolyásolta.



**B:** Reprezentatív mikroszkópos felvétel egy kettősen immunfestett – GFAP (barna) és NeuN (kék) - tenyészetnek a differenciáció 13. napján (6. stádium) 3 napos és folyamatos RA kezelés után. mércé: 50 µm

**C:** A gliagenezis különböző szakaszaiban alkalmazott RA kezelés hatása. Az 5-6. szakaszban alkalmazott (7-14. nap) RA kezelés meggátolta a GFAP immunreaktív asztroglia sejtek kialakulását, míg a gliagenezis kezdete után adott RA hatására a GFAP immunreaktivitás nem változik. A RA gátolja a GFAP immunreaktív gliasejtek megjelenését, de a meglévő gliasejtek számát nem csökkentette



Összefoglalás: A RA - magreceptorhoz kötött transzkripciós faktorként - képes olyan génexpressziós változásokat előidézni, amelynek hatására a differenciálatlan neuroektodermális őssejtekben elindul az idegi irányú differenciáció, míg a későbbi differenciációs szakaszban gátolja az asztroglia képződést.

Következtetések: A RA, vagy ahhoz hasonló hatású szolubilis faktorok, az idegszöveti fejlődés meghatározott szakaszaiban képesek elősegíteni az idegi őssejtek idegsejt irányú differenciációját, ugyanakkor gátolhatják az alternatív irányú sejtársok, pl. az asztroglia sejtek létrejöttét.



#### IV. ALKAMAZOTT MÓDSZEREK, ESZKÖZÖK ÉS ANYAGOK

##### Az NE-4C és a P19 sejtek fenntartása és in vitro RA kezelése

Az NE-4C sejteket Poly-L-lizin-nel (Sigma) borított tenyésztőfelületen, 5 % FCS (fötális borjú savó, Gibco BRL) tartalmú MEM (Sigma) tápoldatban, 100% páratartalommal, 37 C°-os 5% CO<sub>2</sub> tartalmú termosztátban neveltük. A tápoldatot 5mM glutaminnal (Sigma), 40µg/ml gentamicinnel (Sigma és Chinoin) és 2.5 µg/ml amphotericin B-vel (Sigma) egészítettük ki. A tenyészeteket 2-3 naponta a teljes tenyésztőfelület benövése (konfluens állapot) előtt, szemikonfluens állapotban Ca<sup>2+</sup> mentes PBS oldattal történő mosás után 0.5 mg/ml tripszin-oldattal vittük szuszpenzióba és ültettük át új tenyésztőedénybe 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> sejtsűrűségben.

A sejtvonal sejteit hosszú távú tároláshoz 1-2x10<sup>6</sup> sejt/ml koncentrációban, 10% DMSO-t (Sigma) tartalmazó 10%-os MEM-FCS-ben, folyamatos hűtéssel fagyasztottuk le, majd a lefagyasztott sejteket folyékony N<sub>2</sub>-ben tároltuk.

A RA-as differenciációhoz a 3-5x10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> sejtsűrűségű tenyészeteket, a sejtek ajszatra való letapadása után 10<sup>-6</sup> M végkoncentrációjú all-transz retinsav (RA, Sigma) tartalmú tápfolyadékkal indukáltuk a 2-3 napig. A tenyészeteken 2 naponta cseréltük a tápfolyadékot.

##### RT-PCR

A tenyészetek RNS tartalmát Trizol (Gibco) reagenssel izoláltuk, majd azt az esetleges DNS szennyeződéstől DNase I (Promega) kezeléssel tisztítottuk meg. A tisztított RNS-ből reverz-transzkriptázzal (Promega) cDNS-t készítettünk. A cDNS-ből PCR (Taq PCR Core Kit Qiagen) reakcióval mutattuk ki a különböző gének jelenlétét, illetve hiányát. Az egyes gének kimutatásához használt primereket az III. táblázat tartalmazza.

III. táblázat Az RT-PCR során használt primerek

Gén neve	Forward	Reverse
dlx2	5'cagggccttggtctcttca3'	5'ctgctgaggcactgctacg3'
otx3	5'gcagctccagaaacagaa3'	5'gagtcctcttcacggtccag3'
emx2	5'gtccagctttaagctaga3'	5'cttttgccctttgaattcgttc3'
gad65	5'ggtctgcttttggtccttc3'	5'tgccaattccaattatactcttga3'
gad67	5'gctggaaggcatggaaggttta3'	5'tgagcccatcaccgtagca3'
gata3	5'acgtctcactccgaggcagcatg3'	5'gaagtctccagcggcctcatgcac3'
gbx2	5'ttcaagtcaacaccagcag3'	5'ccctttaagccgtctaat3'
hoxb2	5'gctggagaaggagttccact3'	5'tagggaaactgcaagtcgat3'
hprt	5'cacaggactagaacacctgc3'	5'gctggtgaaaaggacctct3'
lmx1b	5'tggagtagagccggtaaatg3'	5'ctgatcggagtaaacgagtc3'
mash1	5'ttagtcagaggaacaagagctgc3'	5'aagatgcaggatctgctgccatcc3'
math2	5'tgagaatggctgtccagaagg3'	5'tggtaggggtggtagaatgtgg3'
nfh	5'catgaaggaaggagcaaac3'	5'gcttctgactctgtggtc3'
ngn2	5'aagaggactatggcgtgtgg3'	5'atgaagcaatcctccctct3'
nkx2.2	5'ggtccagaaccatcgtac3'	5'caccgaaacaacgacaaa3'
otx2	5'ggaacagcgaaggagagga3'	5'ctgctgctgttgccggcactt3'
pax6	5'acgaaagagagatgcctc3'	5'ccaagcaaatggaag3'
phox2b	5'ctcctaccctttctcacc3'	5'cagctcgatcactcaatca3'
vgat	5'acgagagaaacgaagcgg3'	5'acgatgatccaatggagat3'
vglut2	5'tggaaaatccctcggacaga3'	5'tagacgggatgatgtgaa3'

## **Implantáció:**

### *Sejtek előkészítése*

Az implantációhoz NE-4C sejt vonal GFP-t kifejező alklonját használtuk (Demeter és mtsai. 2005), amely megőrizte az eredeti NE-4C sejt vonal differenciációs tulajdonságait. A differenciációs protokoll szerint differenciált sejtet a RA kezelést követő 4. napon, a differenciáció 4. stádiumában 1mM EDTA-PBS-sel szuszpenzióba vittük majd centrifugálás után 10000 sejt/μl koncentrációban MEM tenyésztőfolyadékba vettük fel. Az implantáció elvégzése után a maradék sejt szuszpenzióból 100000 sejtet (ami megfelelő sejtszám az indukció állapotának) 12 mm átmérőjű PLL-el fedett üveglemezen tovább tenyésztettük.

### *Altatás*

A műtendő egerek testsúlyát lemértük. Ketamin-t (SBH-Ketamin injekció, 100mg/ml SelBruHa Kft.) és Xylazin-t (ROMETAR 2% injekció, 20mg/ml SPOFA a.s., Praha) PBS-ben 10x-re hígítottunk, 2:1 arányban összekevertük, és 300μl-t injektáltunk a 10-15g-os egerekbe. (125mg/testsúlykg ketamin és 25mg/testsúlykg xylazin.) Néhány perc múlva ellenőriztük, hogy az állat mélyen alszik-e, majd a sztereotaxis (Kopf, Stoelting) készülékbe helyeztük.

### *Implantáció felnőtt egér előagyba*

Az alvó egeret sztereotaxis készülékben rögzítettük. A fejtetőn az implantáció helye mellett, mediánszagittálisan egy körülbelül 10mm-es metszést ejtettünk. A bőrt finoman széthúzva a koponyát megtisztítottuk a kötőszövetől és az izmoktól, és a csontot hidrogénperoxiddal letöröltük. Sztereotaxissal bemértük a szúrás helyét (Hippocampus: Bergman ponttól.: 1,1 mm előre; jobbra: 0,8 mm; ventrálisan: 2,0mm; Agykéreg: Bergman ponttól 1,1 mm előre, balra: 3,0 mm ventrálisan: 1,2mm), majd fűróval óvatosan átlukasztottuk a koponyacsontot. Így egy körülbelül 1mm átmérőjű nyílást vágtunk, figyelve arra, hogy az agyat ne sértjük meg. Ezután a sztereotaxis-készülékbe előre behelyezett Hemmilton fecskendőbe felszívtuk a beültetendő sejtet, majd a megfelelő mélységbe lassan leeresztve elkezdtük az injektálást. 10 ezer sejtet ültettünk be, 1 μl térfogatban, MEM tápoldatba. Ezt a műveletet nagyon lassan, 1-2 perc alatt, kb. 0.5μl/perc perfúziós sebességgel végeztük. Az infúzió végén még legalább 1 percet vártunk, és csak ezután húztuk ki lassan a kapillárist. A fejbőrt összevarrtuk, majd gentamicinnel (1μg/ml) átitatott papírvattával fedtük, így csökkentve a seb bakteriális elfertőződését. A még alvó állatokat testmeleg helyen tartottuk ébredésig. A teljes ébredés után visszahelyeztük a dobozaikba. Az állatházban a műtött állatokat napi megfigyelés alatt, szokásos körülmények között tartottuk.

### *Transzkardiális perfúzió*

A műtétek után 10 nappal az állatokat elaltattuk. Feltártuk a mellüregét, és a szív bal kamrájába perfundáló folyadékkal feltöltött kanült vezetünk. A jobb pitvaron ejtett metszés után először 20-30 ml PBS-t folyattunk át, amíg a jobb pitvaron át már csak tiszta perfúziós folyadék távozik. Ezután 30-40 ml 4% paraformaldehid oldatot áramoltattunk át teljes fixálódásig. A foramen magnumon át bevezetett ollóval mindkét

oldalán felvágtuk a koponyát, majd csipesszel óvatosan felhajtva a koponyacsontot, az agyat kiemeltük, és 4%-os PFA oldatba helyeztük 24 órára.

### **Hisztológiai vizsgálatok**

Az utófixálás után, az agyat 15% glükózt és 0.1% nátrium-azidot tartalmazó oldatba helyeztük, és +4°C-on inkubáltuk 2 napig. A blokkokat folyékony, -40 - -60 °C-ra hűtött izopentánba (Merck) merítve fagyasztottuk le. A lefagyasztott preparátumokból kriosztáttal 10 és 20 µm-es metszeteket készítettünk, melyeket 7 lemezre folyamatosan vettünk fel, így egy-egy lemezre egymás után kerülő metszetek egymástól 70 illetve 140 µm-re lévő szövetrészeket tartalmaznak és 7 közel azonos metszetsorozatot kaptunk.

### **Immuncitokémia és immunhisztokémia**

A kriosztáttal készített metszeteken immunhisztokémia festéseket felolvasztás után végeztük és PBS-es mosás után a metszeteket 10 percig 0,1%-os Triton-X100-PBS-ben inkubáltuk, amit háromszoros PBS-es mosás követett.

Az in vitro tenyészeteket 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, a fixálót háromszoros PBS-es mosással távolítottuk el, amit 5 perces Triton-X100 (0,1% PBS-ben) kezelés és újbóli háromszoros PBS mosás követett.

Az egyes kezelések között a preparátumokat háromszor PBS-sel (az in vitro tenyészeteken 5 perces, a metszeteken 15 perces inkubálásokkal) mostuk.

A nem specifikus fehérjekötő helyek blokkolása után (1-1,5 órás inkubálás 5-10%-os FCS tartalmú PBS-sel) a metszeteket és a fixált tenyészeteket első réteg ellenanyagokkal [SSEA-1 (DSHB), RC2 (DSHB), βIII-tubulin (ExBio Praha), GFAP (Sigma), VGlut2 (Synaptic Systems) GABA és NeuN (Chemichon) 1:1000 valamint MAP2 (Chemichon), VGAT2 (Synaptic Systems), Serotonin 1:100 koncentrációban] blokkoló oldatban egész éjszakán át +4 °C-on inkubáltuk.

MAP2 és βIII-tubulin és GFAP kimutatásához Alexa488 és Alexa 594 konjugált másodlagos ellenanyagokat (Molecular Probes) használtunk. A biotin konjugált másodlagos ellenanyagokat (Vector) követően a preparátumokat avidin-Alexa488 és avidin-Alexa594 (Molecular Probes) valamint avidin-peroxidase (ABC kittel Vector) harmadlagos ellenanyagokkal inkubáltuk. A másodlagos és harmadlagos ellenanyagokat 1/1000 hígításban és 1—1,5 1 órás szobahőn való inkubálással használtuk.

A peroxidáz reakciót PBS-ben oldott 0.55 mg/ml koncentrációjú DAB (3-3'-diamino benzamidin, Sigma) és 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldatban 5-25 perces szobahőmérsékletű inkubálással hívtuk elő. A reakciót 0.1%-os Na-azid (Sigma) PBS mosással állítottuk le.

Kettős peroxidáz festés során (NeuN és Vglut illetve GABA) az első immunreakció előhívása során az előhívást 0.1 M Cu<sup>2+</sup>-t is tartalmazó oldatban végeztük, melynek eredményeként a reakció terméke sötétkék, fekete színű csapadék. A második reakció előtt újabb blokkolással fedtük az újonnan kialakult nem specifikus fehérjekötő helyeket. A második immunreakciót a korábban leírtakkal azonos módon végeztük el.

Az egyszeri immunfestések és a fluoreszceins jelölések után a preparátumokat Mowiolal (Calbiochem) a peroxidáz kettős festés után felszálló alkoholsorral és xilollal történő dehidratálás után Depex-szel (Serva) fedtük le.

Az RC2, βIII-tubulin és GFAP immunreaktivitás mértékét Axiovision 4.5 szoftver segítségével határoztuk meg. Minden vizsgált differenciációs állapot (RC2, βIII-tubulin) és RA kezelési variáció (GFAP) esetén legalább 30 mikroszkópos látóteret mértünk meg

3 különböző kísérletben. Az RC2 és  $\beta$ III-tubulin immunreaktivitás összehasonlíthatóságáért a korai negyedik stádium értékének (100%) százalékában ábrázoltuk az adatokat. A GFAP mérések esetén a RA kezelés sejtszámra gyakorolt esetleges hatásának kivédésére az értékeket a sejtmagok által elfoglalt területhez (ami jól egybevágott a sejtszám változásával) viszonyítottunk és a standard (2-3 napos) kezeléssel a 14. napon fixált tenyészetekhez (100%) viszonyítottunk.

**Az idegsejtek számának és a különböző transzmitter fenotípusú idegsejtek arányának meghatározása**

A teljes idegset számot idegsejt specifikus sejtmag marker (NeuN) segítségével határoztuk meg (100%), az egyes transzmitterfenotípusú kettősen immunpozitív (GABA+NeuN és Vglut+NeuN) idegsejtek arányát ehhez viszonyítottuk. A számolásokhoz 10 mikroszkópos látótér (20x nagyítás) sejteit számoltuk meg, és 3 párhuzamos tenyészetből kapott értékeket átlagoltuk.

## Hivatkozások

- Ágoston V.A, Zádori A., Demeter K., Nagy Z., Madarász E. 2006, Different behaviour of implanted stem cells in intact and lesioned forebrain cortices. *Neuropath., Appl.Neurobiol.*, in press
- Anderova M, Kubinova S, Jelitai M, Neprasova H, Glogarova K, Prajerova I, Urdzikova L, Chvatal A, Sykova E. (2006) Transplantation of embryonic neuroectodermal progenitor cells into the site of a photochemical lesion: immunohistochemical and electrophysiological analysis. *J Neurobiol.* Sep 1;66(10):1084-100.
- Avantaggiato, V., Acampora, D., Tuorto, F., and Simeone, A. (1996). Retinoic acid induces stage-specific repatterning of the rostral central nervous system. *Developmental Biology* **175**, 347-357.
- Campos, L. S., Leone, D. P., Relvas, J. B., Brakebusch, C., Fassler, R., Suter, U., and French-Constant, C. (2004).  $\beta$ 1 integrins activate a MAPK signalling pathway in neural stem cells that contributes to their maintenance. *Development* **131**, 3433-3444.
- Demeter, K., Herberth, B., Duda, E., Domonkos, A., Jaffredo, T., Herman, J. P., and Madarasz, E. (2004). Fate of cloned embryonic neuroectodermal cells implanted into the adult, newborn and embryonic forebrain. *Experimental Neurology* **188**, 254-267.
- Edwards, M. K. S., and McBurney, M. W. (1983). The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell types formed by a teratocarcinoma cell line. *Developmental Biology* **98**, 187-191.
- Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S.-L., Anderson, D. J., and Guillemot, F. (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev.* **14**, 67-80.
- Götz, M., Stoykova, A., and Gruss, P. (1998). Pax6 Controls Radial Glia Differentiation in the Cerebral Cortex. *Neuron* **21**, 1031-1044.
- Hack, M. A., Sugimori, M., Lundberg, C., Nakafuku, M., and Gotz, M. (2004). Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6. *Molecular and Cellular Neuroscience* **25**, 664-678.
- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., and Gotz, M. (2001). Characterization of CNS Precursor Subtypes and Radial Glia. *Developmental Biology* **229**, 15-30.
- Herberth, B., Minko, K., Csillag, A., Jaffredo, T., and Madarasz, E. (2005). SCL, GATA-2 and Lmo2 expression in neurogenesis. *International Journal of Developmental Neuroscience* **23**, 449-463.
- Hitoshi, S., Tropepe, V., Ekker, M., and van der Kooy, D. (2002). Neural stem cell lineages are regionally specified, but not committed, within distinct compartments of the developing brain. *Development* **129**, 233-244.
- Jelitai M, Schlett K, Varju P, Eisel U, and E, M. (2002). Regulated appearance of NMDA receptor subunits and channel functions during in vitro neuronal differentiation. *Journal of Neurobiology* **51**, 54-65.
- Kageyama, R., and Nakanishi, S. (1997). Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Current Opinion in Genetics & Development* **7**, 659-665.

- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J. (1993). Derivation of Completely Cell Culture-Derived Mice from Early-Passage Embryonic Stem Cells. *PNAS* **90**, 8424-8428.
- Nakagawa, Y., Kaneko, T., Ogura, T., Suzuki, T., Torii, M., Kaibuchi, K., Arai, K., Nakamura, S., and Nakafuku, M. (1996). Roles of cell-autonomous mechanisms for differential expression of region-specific transcription factors in neuroepithelial cells. *Development* **122**, 2449-2464.
- Perea-Gomez, A., Camus, A., Moreau, A., Grieve, K., Moneron, G., Dubois, A., Cibert, C., and Collignon, J. (2004). Initiation of Gastrulation in the Mouse Embryo Is Preceded by an Apparent Shift in the Orientation of the Anterior-Posterior Axis. *Current Biology* **14**, 197-207.
- Santa-Olalla, J., Baizabal, J.-M., Fregoso, M., del Carmen Cardenas, M., and Covarrubias, L. (2003). The in vivo positional identity gene expression code is not preserved in neural stem cells grown in culture. *European Journal of Neuroscience* **18**, 1073-1084.
- Schlett K, and Madarász E. (1997). Retinoic acid induced neural differentiation in a neuroectodermal cell line immortalized by p53 deficiency. *Journal of Neuroscience Research* **47**, 405-415.
- Schlett K, Herberth B., and Madarasz, E. (1997). In Vitro pattern formation during neurogenesis in neuroectodermal progenitor cells immortalized by p53-deficiency. *International Journal of Developmental Neuroscience* **15**, 795-804.
- Seaberg RM, van der Kooy D. (2002) Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci.* Mar 1;22(5):1784-93.