

OTKA K 68939

zárójelentés: 2008 július 1-2011. június 30.

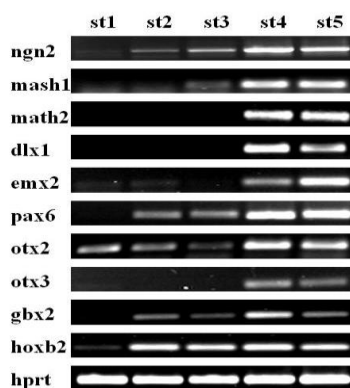
A projekt fő célkitűzéseként a fejlődő központi idegrendszerben időben és térben jellegzetes mintázat szerint aktiválódó ún. pozicionális gének szerepét vizsgáltuk a kifejlett agy regionális eltéréseinek kialakulásában. A cél eléréséhez

1. NE-4C embrionális idegi őssejtek *in vitro* differenciálódásának jól elkülönülő szakaszaiban elemeztük a régió-specifikus és proneurális gének aktiválódását, valamint a neurotranszmitter fenotípusok megjelenését.
2. az NE-4C embrionális neuroektodermális sejtvonal transzfekciójával 11 idegi őssejtklont alapítottunk, amelyek az *in vitro* fejlődés minden szakaszában expresszálták az *emx2* (az embrionális antero-dorzális telencephalonra jellemző regionális) gént; összehasonlítottuk az NE-4C és NE-4C^{*emx2+*} sejtek fenotipikus, adhéziós és differenciációs sajátosságait;
3. idegi őssejtvonalakat izoláltunk embrionális és kifejlett egéragyból a szelektív adhezivitás elvén, új, szintetikus adhezív peptidkonjugátumok felhasználásával;
4. vizsgáltuk a különböző agyi régiókból származó idegi őssejtvonalak és a belőlük *in vitro* fejlődő idegszöveti sejt típusok gén-expressziós mintázatát, különös tekintettel a pozicionális, valamint a glia- és neuron altípusokat meghatározó gének aktiválódására; meghatároztuk az egyes – különböző agyi régiókból származó – őssejt- vonalaktól kialakuló ideg- és gliasejt típusokat, valamint a kialakuló idegsejtek neurotranszmitter fenotípusát;
5. miután az egyes őssejt-klónok retinoid-érzékenységeben alapvető eltéréseket láttunk, vizsgáltuk az egyes sejtvonalak inherens retinsav metabolizmusát, és a retinsav jelenlétét az agy különböző régióiban, különös tekintettel az őssejt-zónákra;
6. az *in vitro* idegsejteket képző őssejteket felnőtt ép és sérült előagyi környezetbe implantáltuk; kerestük azokat a környezeti feltételeket, amelyek az idegsejt-képzést segítik.

A munka során sok új adatot, köztük sok olyan meglepő eredményt is nyertünk, amelyek azt mutatták, hogy az *in vitro* fenntartás során az őssejtek sok regionális eredetre utaló fenotipikus és fejlődési sajátosságot megőriznek, de a hagyományosan régió-specifikusnak tartott gének többsége (lásd a továbbiakban) az idegi fejlődés során az eredettől függetlenül aktiválódik.

1. régió-specifikus és proneurális gének aktiválódása az NE-4C embrionális (E9) neuroektodermális sejtvonal *in vitro* neuronképzése során

Az NE-4C idegi őssejtek rövid idejű (6-24 óra) *all-transz* retinsav (10^{-8} – 10^{-6} M) kezelés hatására, jól reprodukálható morfológiai lépéseken át, idegsejteket képeznek (Schlett, Madarász 1997). Az *in vitro* hosszú időn át fenntartott NE-4C sejtek, differenciálatlan állapotban, a vizsgált régió-specifikus gének közül csakis az embrionális epiblast elülső részére jellemző *Otx2* gént expresszálták. Az idegsejt fejlődés megindulásával azonban, igen különböző fejlődő agyterületekre jellemző, *in vivo* együtt nem expresszáló „pozicionális” gének aktiválódtak (1. ábra).



1. ábra. Az indukálatlan NE-4C őssejtekben agyi régiókra jellemző gének nem aktívak. Az idegsejt fejlődés megindulásával (st4: idegsejt megjelenés stádiuma) - amit *math2* aktiváció is jelez - egyszerre aktiválódnak dorzális (*emx2*) és ventrális (*dlx1*) előagyi (*otx2*), középagyi (*gbx2*) és nyúltvelőre jellemző (*hoXB2*) „pozicionális” gének.

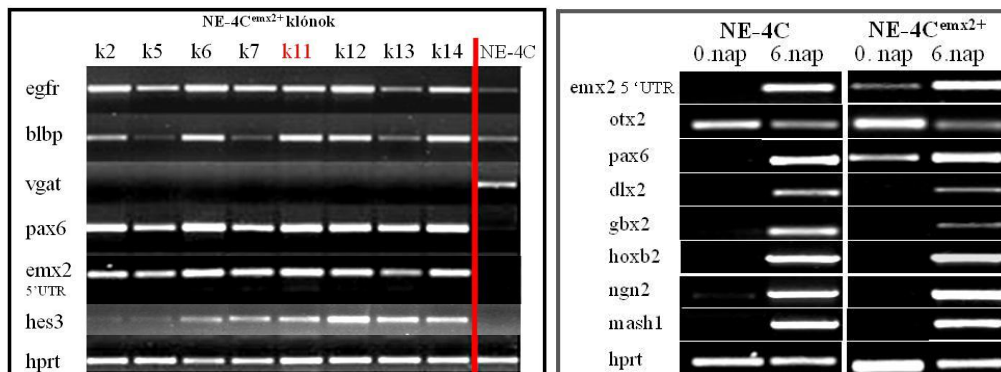
A NE-4C sejtekből GABAerg (GABA-akkumuláló, vezikuláris GABA-transzportert [vGAT] tartalmazó), glutamaterg (vezikuláris glutamát-transzportert [vGlut] tartalmazó) és szerotonin-termelő idegsejtek is fejlődtek. Az adatok azt mutatták, hogy a korai neuroepiteliális őssejtvonal sejtjei regionális elkötelezettséggel nem rendelkeztek. Az idegi differenciálódás megindulásával, az *in vitro* környezetben, a regionális és fenotipikus elköteleződés tág lehetőségei nyílnak meg (Varga et al., 2008).

2. Régió-specifikus *Emx2* gént túlexpresszálok (NE-4C^{emx2+}) és riporter sejtvonalak létrehozása és jellemzése

Előállítottuk az NE-4C embrionális neuroektodermális őssejtvonalt olyan alklónjait (k2-k14), amelyek az *Emx2* (elülső dorzális agyrégióra jellemző) gént konstitutívan túl-termelik (NE-4C^{emx2+}), illetve egy *Emx2*-érzékeny promóter vezérlete alatt β -galaktozidáz enzimet termelnek (*Emx2*-riporter vonal). A k11 jelű klón zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) expresszálok al-klónját is létrehoztuk.

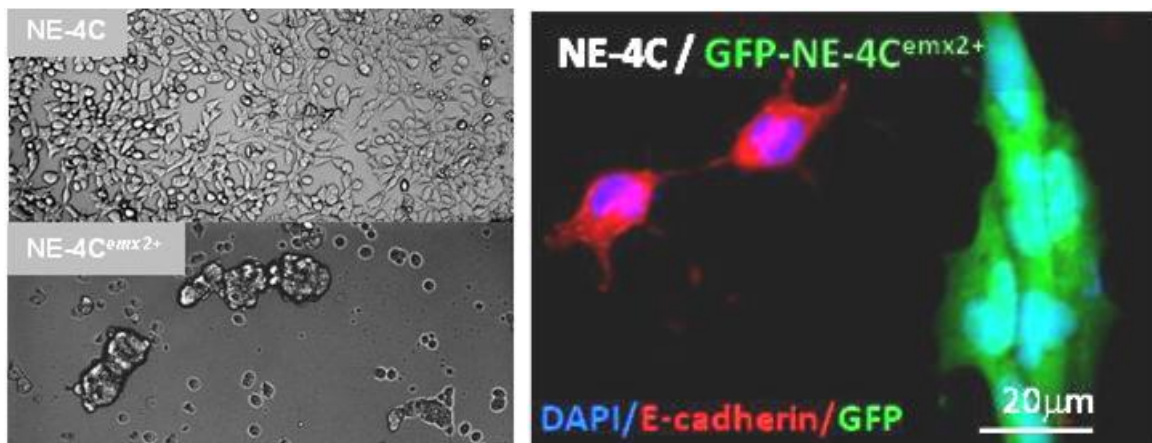
Az endogén *emx2* UTR régió és a csak transzgénben jelen levő V5-epitóp szekvencia RT-PCR analízise azt mutatta, hogy a transzgén a differenciálatlan sejtekben és az idegi differenciálódás minden stádiumában aktív.

Az indukálatlan sejtekben az exogén *Emx2* aktiválta a *Pax6* és az endogén *Emx2*, valamint a *Hes* gének átíródását, és gátolta a *vgat* expressziót. (2. ábra)



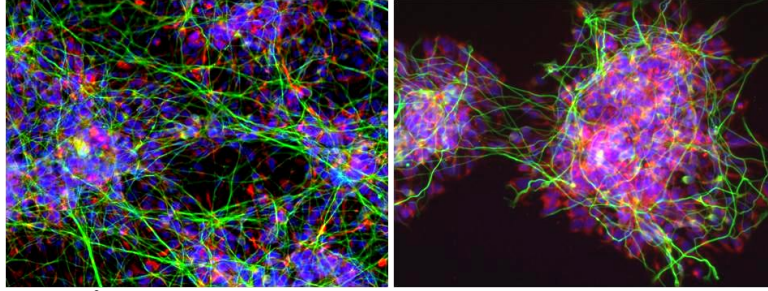
2. ábra. Az *Emx2* expresszió hatására változott az indukálatlan NE-4C sejtek gén-aktivációs mintázata; az indukált neuron-dús tenyészetek (indukció 6. napján) gén-profiljában azonban eltérések már nem mutatkoztak

Az indukálatlan NE-4C^{emx2+} sejtek adhezivitásában jelentős eltérések mutatkoztak. Míg az NE-4C sejtek aggregációja és E-cadherin repressziója csak a retinsav-indukált differenciáció 2. („elköteleződési”) fázisában következik be (Tárnok et al., 2002), az NE-4C^{emx2+} sejtek indukálatlan állapotban sem hordoztak E-cadherint a felszínükön, viszont nagy aggregátumokat képeztek (3. ábra). Közös tenyészetekben a két sejtféleség élesen elkülönült egymástól, ami a sejtfelszíni adhéziós molekula-készlet jelentős különbségeire utal.



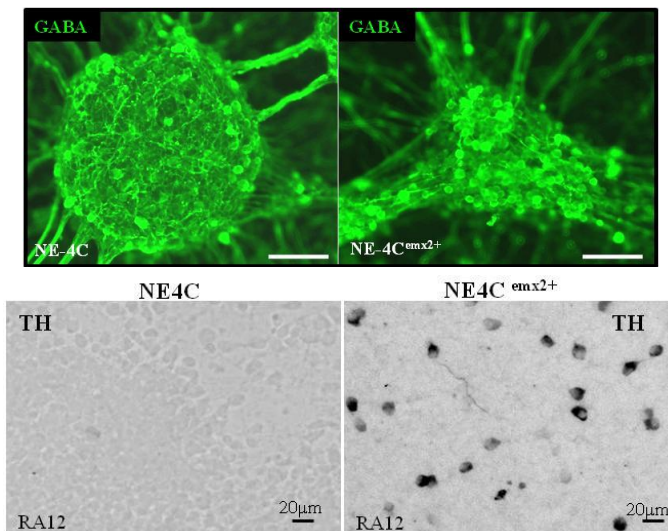
3. ábra. Az indukálatlan állapotú NE-4C sejtek monolayer-, míg az NE-4C^{emx2+} sejtek aggregátumformában növekednek polilizin aljzaton (bal panel). Ko-kulturában az E-cadherin-tartalmú NE-4C sejtek (piros) élesen elkülönülnek a GFP-jelölt (zöld), E-cadherint nem hordozó NE-4C^{emx2+} sejtektől.

Az NE-4C^{emx2+} sejtek, az NE-4C sejtekhez hasonlóan neuronokat és asztrogliá sejtet képeztek retinsavas kezelés hatására, de ezekben a sejtekben az idegi differenciálódást retinsavas kezelés nélkül, szérum-megvonás hatására is megindult (4. ábra).



4. ábra. NE-4C^{emx2+} sejtekből retinsavas kezelés nélkül, szérum-megvonás (bal panel), illetve retinsav hatására differenciálódó ideg-(III β -tubulin; zöld) és asztroglia sejtek (GFAP; piros). Az összes sejtet a kék (DAPI) festés jelzi.

A differenciált NE-4C^{emx2+} sejtek, az NE-4C sejtekhez hasonlóan, az összes általunk vizsgált – in vivo igen eltérő régiókban aktív – pozicionális gént expresszáltak (2. ábra, jobb panel). Látszólag tehát, az Emx2 túl-termelés ellenére, az idegi differenciálódás megindulásával, széles regionális meghatározódás válik lehetségessé. Ugyanakkor, az Emx2 túl-termelő idegi összejtekből olyan neurotranszmitter fenotípusú idegsejtek is alakultak, amelyeket az NE-4C sejtek nem generáltak (5. ábra). A mindkét sejtvonalon megjelenő GABA-akkumuláló, vGAT- és vGlut-tartalmú (GABAerg és glutamaterg) idegsejtek mellett, az NE-4C^{emx2+} sejtek differenciált tenyészeiben tirozinhidroxilázt tartalmazó neuronok nagy gyakorisággal fordultak elő.



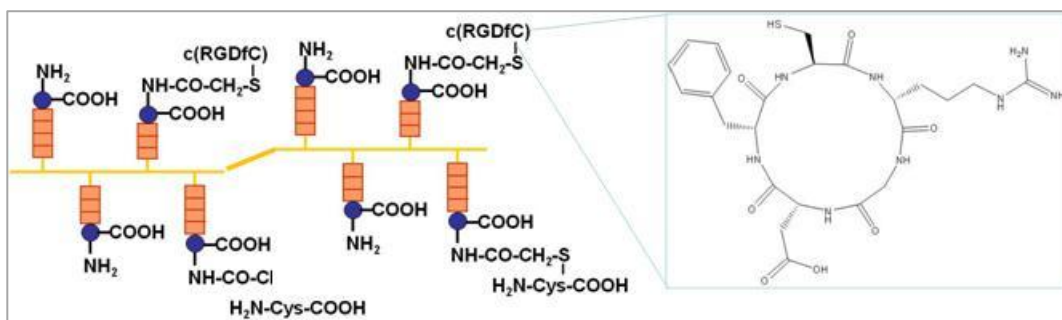
5. ábra. GABA- (felső panel; az indukció 6. napja), illetve tirozinhidroxiláz (alsó panel; az indukció 12. napja) tartalmú idegsejtek NE-4C és NE-4C^{emx2+} sejtek differenciált tenyészeiben. Immuncitokémiai festés: GABA: Alexa-488 (zöld); TH: HRP (fekete)

Az adatok azt mutatták, hogy a kezdeti regionális génexpresszió maradandó fejlődés-beli változásokat okoz, de a kiválasztott „pozicionális” gének expressziója ezt az elköteleződést nem jelzi (Varga, Hádinger et al., *kézirat készűl*). Fel kellett tételeznünk, hogy az idegsejt-differenciálódás során, a pozicionális gének sokasága aktiválódik, és a közvetlen környezet hatására szelektálódik a régióra jellemző expressziós mintázat.

Az eredmények alapján – további regionális gént túl-expresszázó összejtvonalak előállítására előtt – azt kívántuk megvizsgálni, hogy a fejlődés különböző időszakaiból és a fejlődő agy különböző régióiból izolált idegi összejt-vonalak rendelkeznek-e eredetükre jellemző regionális gén-expressziós mintázattal, régióra jellemző fenotípusos sajátosságokkal, illetve változnak-e ezek a jellemzők a környezetből kiemelés következtében, az in vitro fenntartás folyamán.

3. Idegi őssejtvonalak izolálása és szérum-mentes fenntartása szintetikus adhezív peptid-konjugátumok alkalmazásával

Különböző eredetű idegi őssejtvonalak izolálására és fenntartására újonnan kifejlesztett, szintetikus adhezív peptideket alkalmaztunk. Az AK-c(RGDfC) és SAK-c(RGDfC) adhezív peptid-konjugátumok poli-lizin peptidvázra konjugált D/L-alanin, illetve D/L-alanin-serin (6. ábra) távtartó oldalláncok végein „hordozzák” a kimerevített (gyűrűbe kötött) RGD (Arg-Gly-Asp) (Hersel et al., 2003) integrin-ligandumot (Marko et al., 2008).



6. ábra. A SAK-c(RGDfC) adhezív peptid-konjugátum szerkezeti vázlata. —: poli-lizin váz; ■: D/L alanin; ●: Serin; Insert: ciklikus RGDfC peptid motívum (Mező Gábor; ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoport rajza)

A 0,0025 – 0,25 µg/ml peptidoldattal kezelt polisztirol, üveg vagy fém-oxid felületeken igen sokféle – többnyire nem differenciált, ősz/progenitor állapotú vagy tumorosan transzformált - sejt képes letapadni (1. táblázat) és növekedni szérum-mentes, definiált tenyésztő környezetben.

1. Táblázat. AK-c(RGDfC) felületen szérum nélkül tapadó sejtek

Name	Cell type	Origin	Adhesion on Cytotrix-1
ES (R1)	embryonic stem cell	mouse	***
HuES9	embryonic stem cell	human	***
NE-4C	Neuroepithelial stem cell	mouse	**
RGl	radial glia (neural stem)	mouse	***
Bone marrow mesenchyme	Mesenchymal stem cell	mouse	**
Adipose mesenchyme	Mesenchymal stem cell	human	**
MDCK	Kidney epithel	canine	***
GENC	Glomerular endothel	mouse	***
A431	Epidermal epithel	human	***
HSG	Salivary gland epithel	human	***
A7r5	Aorta smooth muscle	rat	**
NE-4C	Neuroepithelial stem cell	mouse	**
MC3T3-E1 sc4	3T3	mouse	*
HUVEC	Umbilical endothel	human	*
Primary neurons	Neuron	mouse	-
Primary astrocytes	Astrocyte	mouse	**

* : a tapadás erősségét (a felület-borításhoz szükséges minimális peptid-koncentrációt) jelzi:

*: 0,25 µg/ml; **: 0,025 µg/ml; ***: 0,0025 µg/ml; - : a felületen nincs sejt-letapadás

Az AK-c(RGDfC) peptid és az azonos adhezív sajátosságokkal rendelkező, de jobb oldhatósággal és stabilitással jellemezhető SAK-c(RGDfC) (6. ábra) peptid-konjugátum szintézise és sejt-letapasztásra való alkalmazása szabadalommal védett (PCT/IB2011/052207).

4. Különböző agyi régiókból származó idegi őssejtvonalak és a belőlük *in vitro* fejlődő idegszöveti sejtípusok jellemzői

Miután az AK- vagy SAK-c(RGDfC) peptiddel bevont felületen az idegsejtek nem tapadnak (1. táblázat), a gliasejtek viszont csak szérumban jelenlétében növekednek, a felületre telepített agyszöveti sejtuszorításból, szérumban-mentes tápközegben, az idegszövet differenciálatlan ősz/progenitor sejtjei szelektíven felszaporíthatóak voltak. A szelektált ősz/progenitor sejtek túléléséhez és szaporodásához a szérumban-mentes tápközeghez epidermális növekedési faktort (EGF; 20ng/ml), inzulint és transferrint (B27 supplementum; Invitrogen) adtunk. Ilyen – kémiaiilag definiált – környezetben a sejtek gyorsan szaporodnak; belőlük egy-sejt eredetű, fenotípus- és genotípusukat tekintve homogén populációkat klónoztunk (Marko et al., 2011a) egér embrionális előagyból és a kifejlett agy különböző régióiból (2. táblázat) (Marko et al., 2011b).

2. Táblázat. Adhéziós módszerrel izolált idegi ősz/progenitor sejt klónok

Klón	Embrionális (E14.5)			Felnőtt (P 50-75)						
	A2	C4	RGI-1	HC_A	CTX_H	MES_D	SVZ_I	SVZ_K	SVZ_T	SVZ_M
Eredet	ventral előagy	dorsal előagy	teljes előagy	hippocampus	cortex	collic. sup.	SVZ	SVZ	SVZ	SVZ
RC2 /Nestin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GFAP	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Gén expresszió										
Sox2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Olig2	+	+	ni	+	+	+	+	+	+	+
Pax6	+	+	+	+	+	+	+	+	ni	ni
blbp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glast	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oct4			-	+?	-	-				
Emx2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gbx2	ni	ni	+	+	+	+	+	+	+	+
Dlx2	+	+	+	+	+	+	+	+	ni	ni
Hoxb2	ni	ni	-	-	-	-	-	-	ni	ni
Ngn2	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Mash1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GFAP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Math2	-	-	ni	-	-	+	-	-	-	-

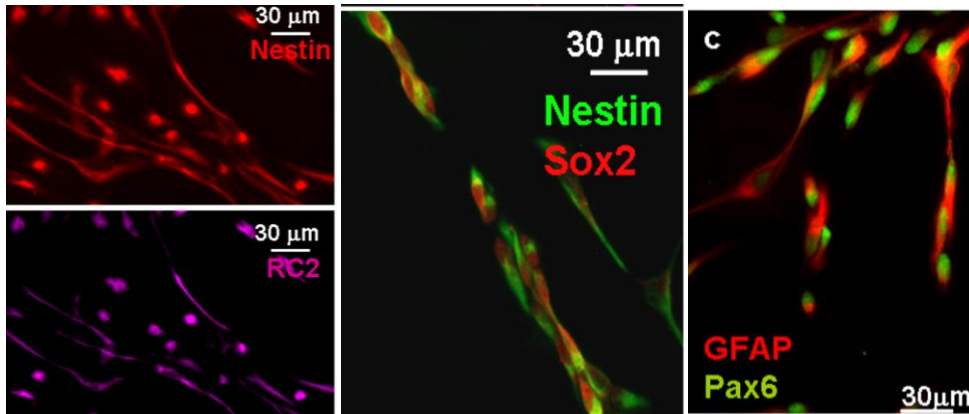
2. A szelektív adhézióval izolált idegi ősz/progenitor sejt vonalak jellemzése

Az sejt vonalak mindegyike a központi idegrendszer őssejtjeire jellemző radiális glia tulajdonságokat mutatott: eredettől függetlenül, a sejtek jellegzetes elongált, bipoláris sejtalakkal rendelkeztek, nestin, RC2, Sox2 és Pax6 fehérjéket tartalmaztak (7. ábra), expresszálták a *Sox2*, *Pax6*, *Blbp*, *Glast* géneket, de nem termeltek *Oct4* vagy *Nanog* mRNS-t (2. táblázat). Bár minden vonalban kimutatható volt *GFAP* mRNS, az embrionális eredetű vonalakban *GFAP* fehérjét nem sikerült kimutatni, míg a felnőtt szövetekből izolált sejt vonalak mindegyike jelentős *GFAP*-immunreaktivitást mutatott (7. ábra.C).

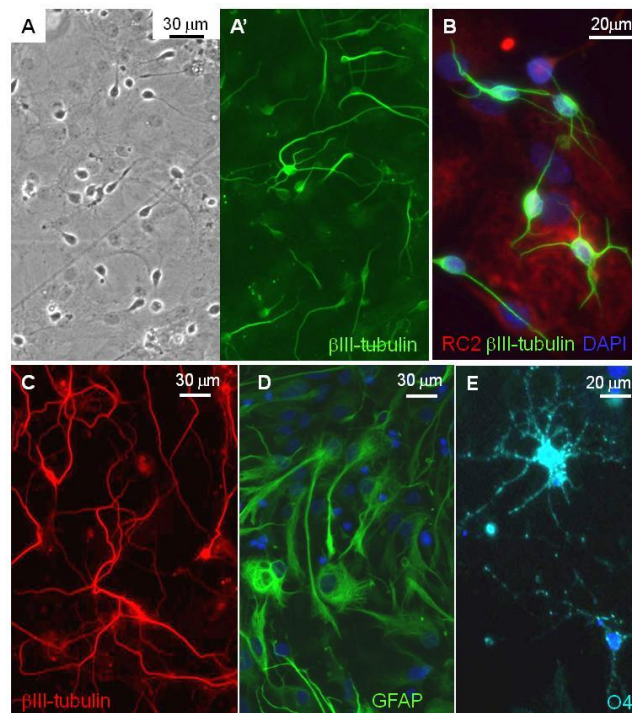
A különböző területekről klónozott sejtek egyszerre expresszáltak dorzális (*Emx2*) és ventrális (*Dlx2*) regionális gén-markereket; az előagy-eredetű sejtekben kimutattuk a *Gbx2* középagyi markert és ventrális embrionális előagyi (A2) klón kivételével, minden klón expresszált az *in vivo* egymást kizáró „proneurális” (*Ngn2*, *Mash1*) géneket. Egyedül a nyúltvelőre jellemző *Hox2b* expressziójának teljes

hiánya jelezte a regionális eredetre való „emlékezést”. A választott gének expressziós mintázata alapján úgy tűnt, hogy ezek a sejtek sem őrzik regionális sajátosságait, *in vitro*. Ugyanakkor, a fenotipikus sajátságokban jellegzetes, régióra utaló elköteleződés mutatkozott (lásd alább).

Minden sejtvonalba indukálható volt a neuron, asztroglia és oligodendroglia irányú differenciálódás (8. ábra). Sűrű tenyészetekben, az EGF megvonás hatására 4-7 napon belül idegsejtek keletkeztek és szérumban hozzáadására asztroglia sejtek fejlődtek. Az oligodendroglia fenotípus megjelenését Glaser et al., (2007) módszere szerint indukáltuk.



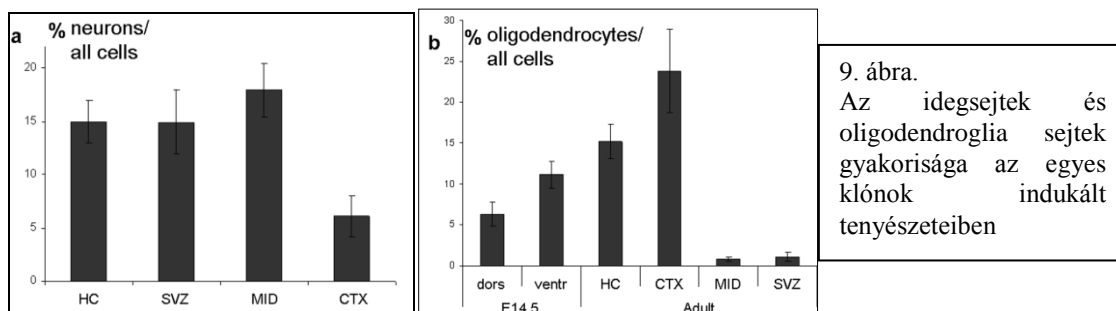
7.ábra. Radiális glia-jellegű sejtvonalak immuncitokémiai jellemzése.



8.ábra. Radiális glia jellegű ősz/progenitor sejtek idegszövet irányú differenciálódása, *in vitro*. A,B: Az RGI-1 klón idegsejt-képzésének 4. napján készült immuncitokémiai felvételek; C: idegsejtek a differenciálódás 8. napján; D: asztroglia sejtek a szérumban hozzáadás 3. napján; E: oligodendroglia sejtek az indukció 8. napján.

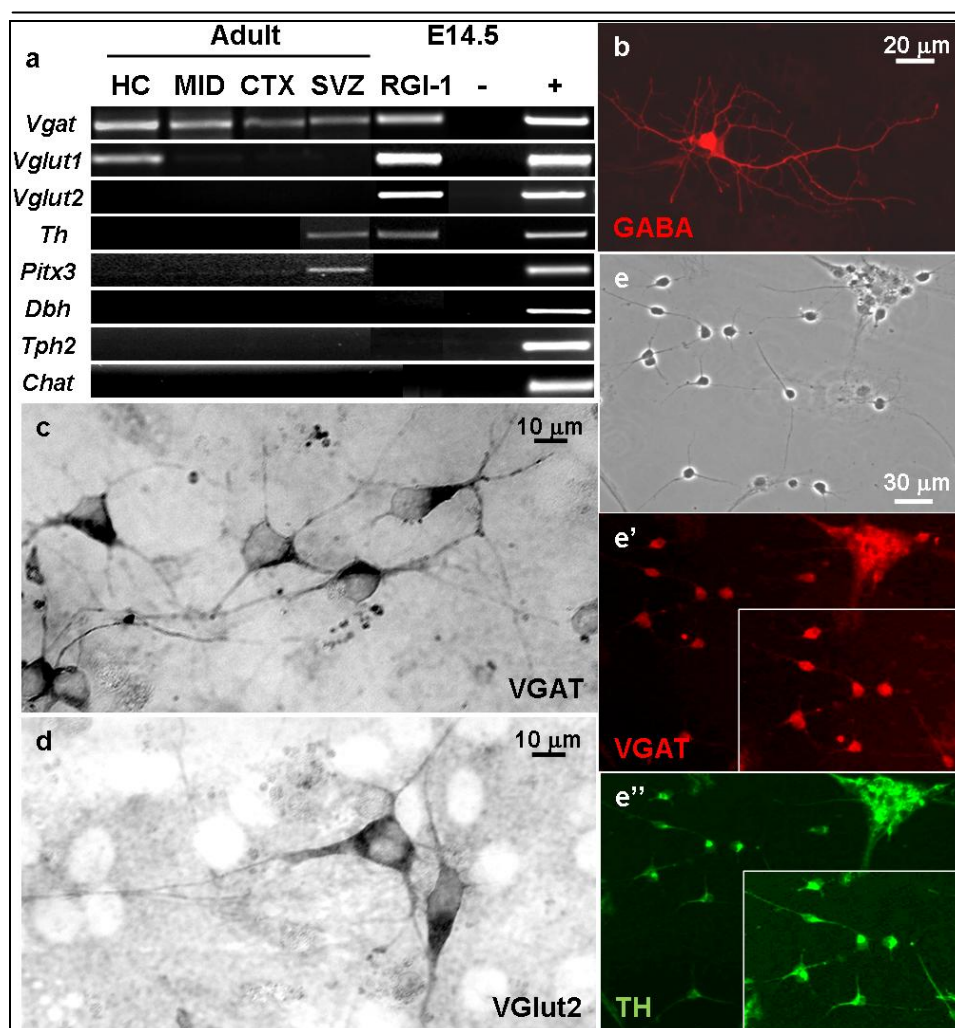
A neuron- és oligodendroglia-képzés mértékében az egyes sejtvonalak között azonban jelentős eltérések mutatkoztak (9. ábra).

Ugyancsak jelentős, eredet-függő klonális különbségek mutatkoztak a differenciált idegsejtek neurotranszmitter-produkciós sajátágaiban (3. táblázat; 10. ábra). Minden klón idegsejtjei tartalmaztak GABA-t, ami önmagában csak a fejlődő idegsejtek ismert GABA-akkumuláló képességét jelzi (Jelitai et al., 2004), de GABAerg fenotípus kialakulását az „érett” idegsejtekben jelen levő vezikuláris GABA transzporter (vGAT) minden klónban jelezte.



9. ábra. Az idegsejtek és oligodendroglia sejtek gyakorisága az egyes klónok indukált tenyészteteiben

Vezikuláris glutamát transzportert (vGlut1 és vGlut2) tartalmazó glutamaterg idegsejtek fejlődtek az embrionális eredetű klónokban, azonban a felnőtt agyból nyert sejtvonalak közül csak a hippocampusból származó sejtek képeztek (vGlut1-tartalmú) glutamaterg neuronokat. Tirozin-hidroxiláz (TH)- pozitív neuronokat (10. ábra) és TH mRNA-t csak az embrionális teljes előagyból és a felnőtt SVZ-ből nyert klónokban tudtunk kimutatni. Ezekben a klónokban fejlődő TH-pozitív idegsejtek azonban GABAerg sajátosságokat is mutattak. A dopamine- β -hidroxiláz mRNA-ek hiánya jelezte, hogy ezek a neuronok noradrenalint nem termelhetnek. Mindezen sajátosságok jól egyeznek az SVZ-eredetű, a szaglógumó periglomeruláris idegsejtjeit adó progenitor sejtek *in vivo* tulajdonságaival (Maher, Westbrook, 2008).



10. ábra. A felnőtt (HC, MID, CTX, SVZ; a, e, e', e'') és embrionális (RGI-1; a, b, c, d) egéragyból klónozott sejtvonalakból fejlődő idegsejtek neurotransmitter "státusza".

Szerotonin-termelő vagy kolinerg idegsejteket nem tudunk kimutatni sem a gén-aktivációs mintázat (3. táblázat), sem az immocitokémiai festések alapján.

3. táblázat Különböző idegi ősz/progenitor sejt-klónokból differenciálódó utódsejtek

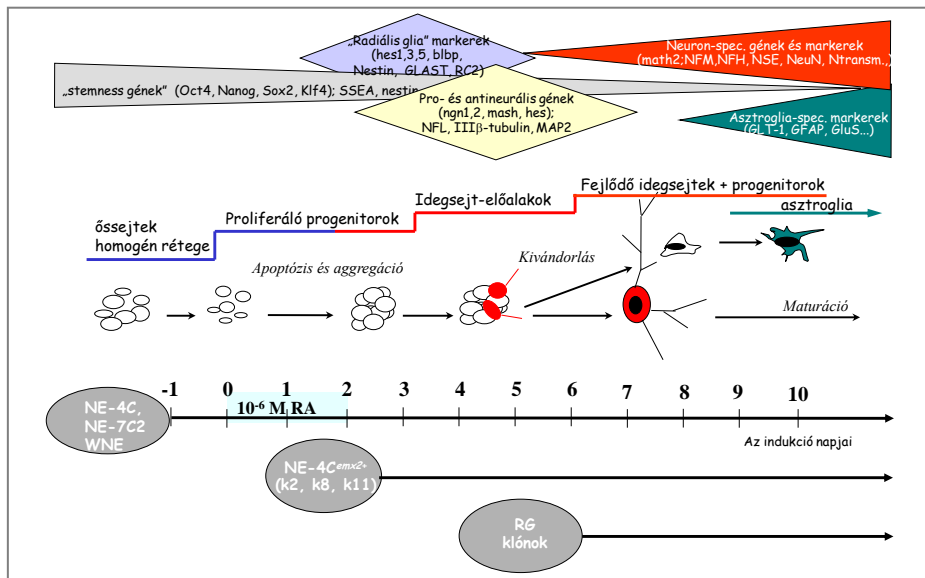
Klón	Embrionális (E14.5)			Felnőtt (P 50-75)						
	A2	C4	RGI-1	HC_A	CTX_H	MES_D	SVZ_I	SVZ_K	SVZ_T	SVZ_M
neuron (IIIβ-tubulin)	+(!)	+(!)	+(!)	+	+	+(!)	+	+	+	+
asztrocita (GFAP)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
oligodendrocita (O4)	+(!)	+	ni	+(!)	+(!)	+	+	+	+	+
Gene expression										
<i>vgat</i>	ni	ni	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>vglut1</i>	ni	ni	+	+	-	-	-	ni	ni	-
<i>pitx3</i>	ni	ni	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>tph2</i>	ni	ni	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>dbh</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>chat</i>	ni	ni	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>th</i>	ni	ni	+	-	-	-	+	+	+	+

ni: nem vizsgáltuk; (!): magas (>40%) gyakoriság

A különböző korú és eltérő agyi régiókból izolált ősz/progenitor sejt-klónok vizsgálatai is megerősítették, hogy a natív környezetből kiemelt multipotenciális sejtek megőriznek sok eredetükre jellemző fejlődési sajátosságot, de a tradicionálisan pozicionális génként számoltartott - és általunk vizsgált - markerek ezt az „emlékezetet” nem tükrözik (Marko et al., 2011b).

5. Idegi ősz/progenitor sejtek és az agy neurogén zónáinak retinoid metabolizmusa

A munka eredményeként olyan idegi ősz/progenitor sejt-klónokkal rendelkezünk, amelyek a „pan-neurogenézis” (regiótól független idegsejt kialakulás) három eltérő differenciációs állapotát képviselik (11. ábra).

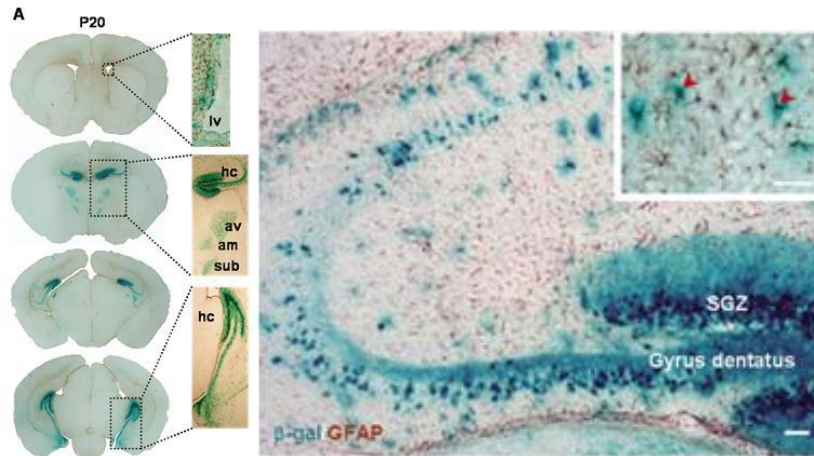


11. ábra. Az *in vitro* idegi sejtfejlődés sémája, és a rendelkezésünkre álló – korai neuroepitheliális NE-4C, NE-7C2, WNE; Emx2 túl-termelő NE-4C^{emx2+} k2-k14; radiális glia-jellegű RG sejt-klónok – elhelyezkedése a sejtfejlődési „skalán”

A korai (E9) neuroepitheliumból izolált NE-4C, NE-7C2, WNE vonalak *Oct4*, *Nanog* összejt-géneket expresszálnak, primitív epitheliális morfológiával rendelkeznek; idegi differenciálódásuk megindulásához retinsavas indukcióra és kompakt sejt-aggregátumok kialakulására van szükség. Az *Emx2* túltermelő NE-4C^{*emx2+*} vonalak idegi fejlődésének megindításához külső retinsav hozzáadása nem szükséges, spontán aggregátumokat formálnak, és a neuron-képzéshez szükséges idő lerövidül. A radiális glia-jellegű ősz/progenitor sejtek elongált bipoláris sejtalakkal és a radiális glia sejtekre jellemző gén-expressziós mintázattal és fehérje-készlettel rendelkeznek. Ezekben a vonalakban idegi differenciálódás retinsav hozzáadásával nem indukálható..

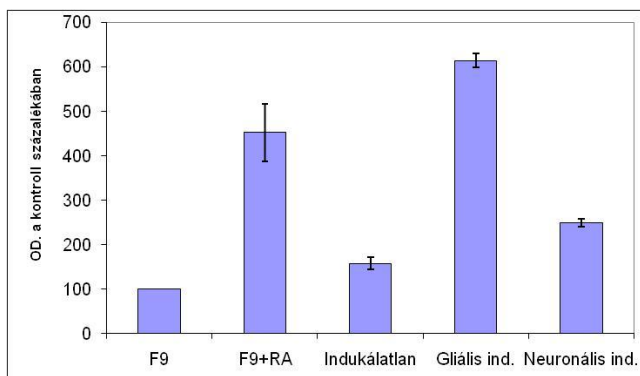
A korai embrionális fejlődés időszakában az őssejtek differenciálódását az **A-vitamin-származék retinoidok** (elsősorban az *all-transz-* és *9-cisz-*retinsav) az idegsejt-alakulás irányába tolják el. Embrionális őssejtekből és embrionális neuroektodermális őssejtekből *in vitro* retinsav kezeléssel tömeges idegsejtképződés indukálható (Schlett, Madarasz 1997; Környei et al., 2005, 2007). A felnőttkori őssejtek ugyanakkor, retinsav kezelés nélkül – pusztán a mitogén növekedési faktorok megvonásának hatására – képesek idegsejteket képezni (Markó et al., 2011b). Miután a sejtvonalak retinsav-érzékenysége alapvető eltéréseket mutatott, vizsgáltuk az egyes klónok retinsav-metabolizmusát, valamint a retinsav *in vivo* jelenlétét a fejlődő és kifejlett agy neurogén zónáiban.

Retinsav-riporter transzgenikus egértörzs (Rossand 1991) agyának vizsgálatai azt mutatták, hogy a felnőtt agy neurogén zónái a környező szövetrészeknél magasabb retinsav-tartalommal jellemezhetők (12.ábra)



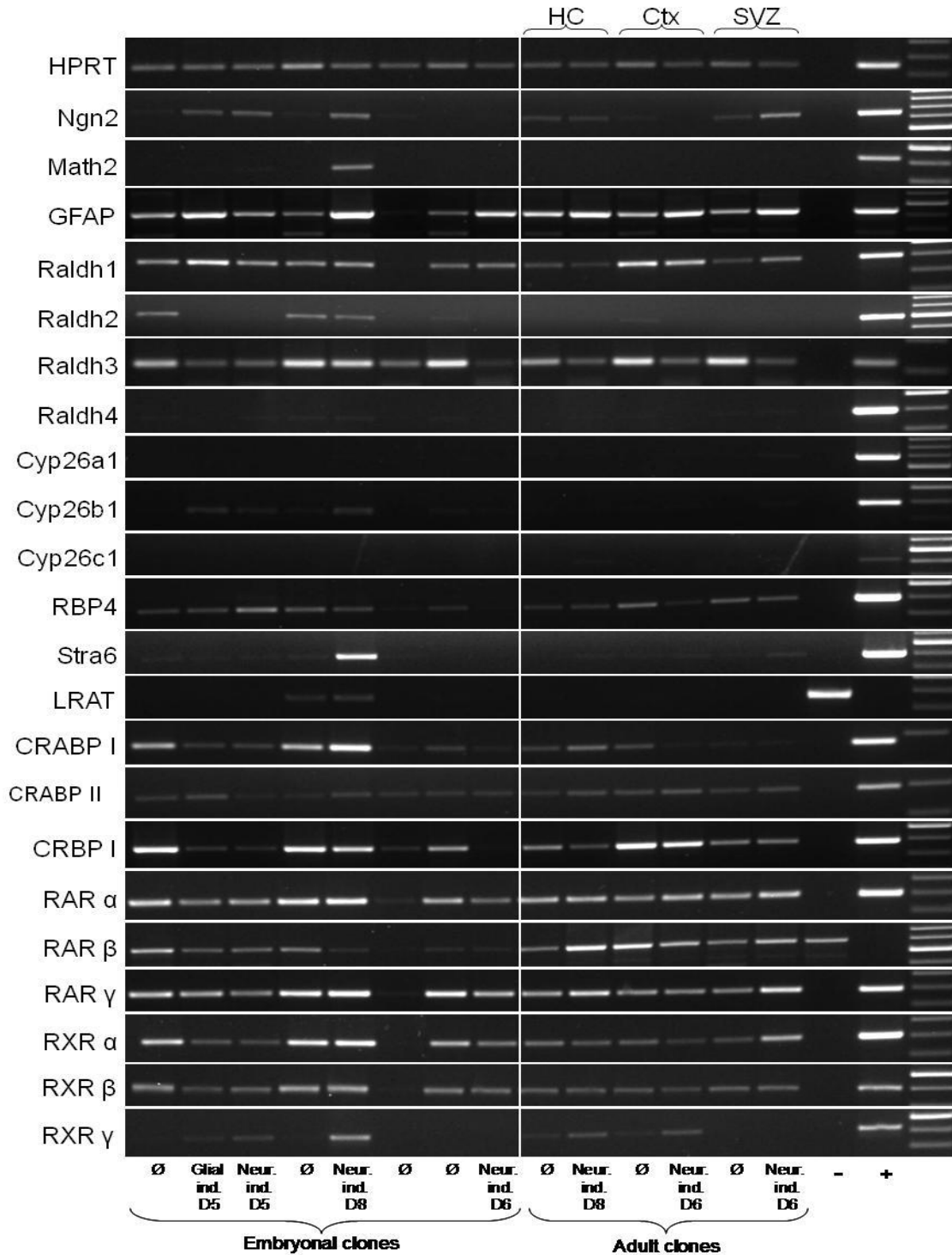
12. ábra. Retinsav-tartalom (kék festődés) a RARE-LacZ retinsav-riporter transzgenikus egér (Rossand 1991) előagyában. Felnőttkori neurogenetikus zónákat (az előagyi oldalkamrák mentén a SVZ és a hippocampus g.dentatus garnuláris zónája alatt húzódó SGZ) az átnézeti képeken is kiemeli a retinsav-tartalmat jelző fektődés (Orsolits et al., 2009)

Miután felnőtt agyból izolált ősz/progenitor sejtek differenciálódása külső retinsavval nem volt indukálható, feltételeztük, hogy ezek a sejtek maguk képesek retinsavat előállítani. Egy retinsav-érzékeny promoterral vezérelt galaktozidáz (RARE-LacZ) génkonstrukciót hordozó reporter sejtvonalt (F9-RARE) felhasználásával, fotometriás bio-assay alkalmazásával mértük az egyes sejtklónok retinsav termelését indukátlan állapotban, illetve az idegsejt- és gliaképzés stádiumaiban (13. ábra).



13.ábra. Felnőtt SVZ eredetű idegi ősz/progenitor sejtek retinsav-termelése indukátlan állapotban, illetve a gliasejtek és neuronok kialakulása után. Az F9+RA olyan riporter-tenyészeteket jelez, amelyeket 10^{-6} M retinsavval kezeltünk.

A mérések azt bizonyították, hogy a sejtvonalak termelnek retinsavat, és a termelés mértéke az idegi differenciálódás előrehaladásával nő (13. ábra). A retinsav-termelés lehetőségét megerősítették a gén-expressziós vizsgálatok adatai, amelyek szerint a retinol(Avitamin)-ból történő ratsav-előállítás enzimeit, a retinol- és retinsav tároló /transzportáló fehérjéket és a retinoid receptorokat kódoló gének aktívak az idegi ősz/progenitor sejtekben (14. ábra)(Orsolits et al., kézirat benyújtás előtt).



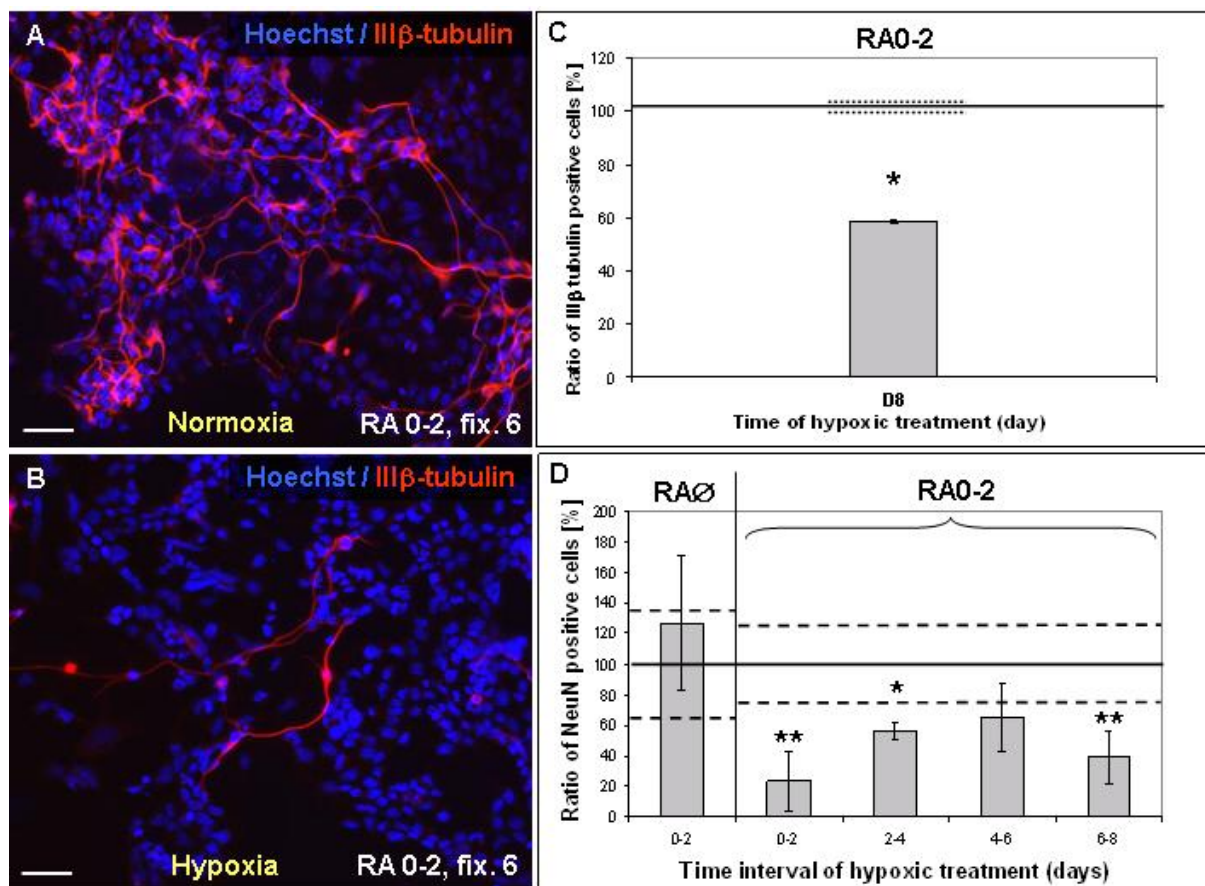
14. ábra. Az embrionális (RG1-1, A2, C4) és felnőtt egérgy különböző régióiból nyert klónok retinsav-metabolizmusát jelző gének aktivitásának összefoglaló ábrája.

Az egyes klónok gén-profilja – bár érdekes eltéréseket is jelez – megerősítette, hogy a sejtek képesek retinsav termelésre és tárolásra, de ennek mértéke és útvonala a sejtfejlődéssel jelentősen változik. Az NE-4C korai embrionális (E9) neuroepitheliális őssejtek – a tápközegben jelelő A-vitaminból – csak igen kis mértékben képesek retinsavat előállítani: a folyadékkörnyezetükben kialakuló 10^{-10} M retinsav-koncentráció (Hádinger et al., 2009) az idegi differenciálódás megindításához (min. 10^{-8} M) nem elegendő. A fejlődés későbbi (E14,5 vagy felnőtt) stádiumaiból izolált sejtek retinsav-termelése a küszöbértéket meghaladja, és így külső retinsav hozzáadás nélkül is indukálhatja az idegszöveti sejtfejlődést.

6. Idegi ősz/progenitor sejtek „sorsa” felnőtt ép és sérült előági környezetbe ültetve

Zöld fluoreszcens fehérjét expresszáló NE-4C (GFP-4C) és a „zöld egérből” (Nagy András és Gócsa Elen szíves adománya) izolált A2 és C4 klónokat beültettük felnőtt egerek ép vagy fagyasztásos lézióval (Ágoston et al.2007) sértett előágiába. A radiális glia-jellegű sejtek – hasonlóan az NE-4C sejtekhez – a kifejlett agyi parenchyma-ban kizárólag a nagy rostkötegekben maradnak fenn 3 hétnél hosszabb ideig. Idegsejt irányú differenciálódásukat nem tudtuk megfigyelni.

Megvizsgálva a differenciálatlan és idegi irányban differenciálódó NE-4C sejtek O_2 -szükségleteit azt láttuk, hogy bár az indukátlan őssejtek károsodás nélkül szaporodnak hypoxia-s (1 tf% atmoszférás O_2) körülmények között, ez az O_2 -ellátás megakadályozza, hogy belőlük idegsejtek fejlődjenek (15.ábra) (Zádori et al., 2011).

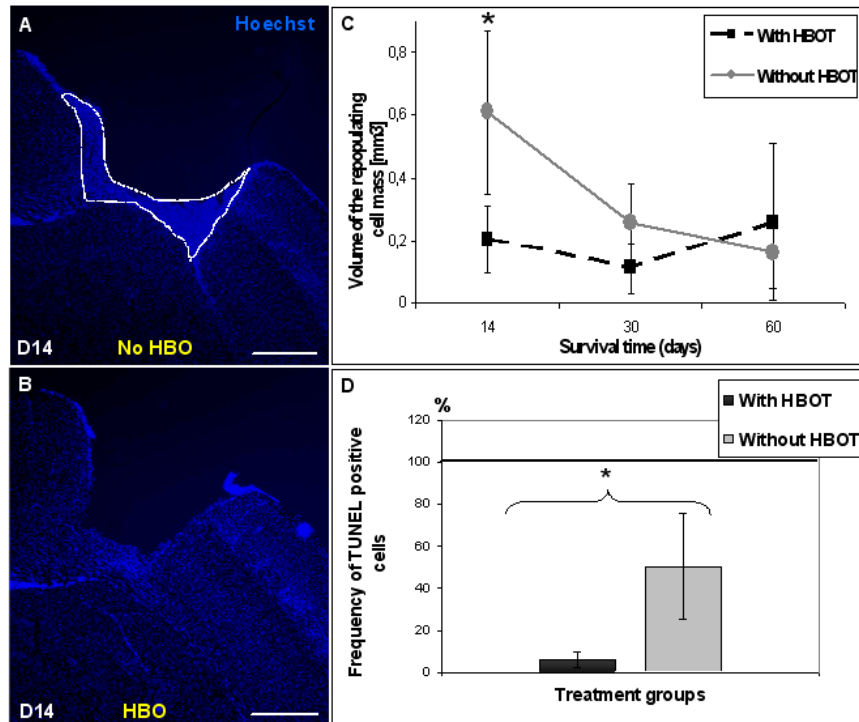


15.ábra. A hypoxia hatása az NE-4C idegi őssejtek in vitro indukált neuron-képzésére.

Különösen O_2 -érzékeny periódusnak bizonyult az „elköteleződés” (indukció 0-2 napjai) és a „neuronális érés” (indukció 6-8 napjai) stádiuma. Ezekben a periódusokban történt hipoxiás kezelés gyakorlatilag megszüntette a neuron-képződést, miközben a differenciálatlan sejtek aránya jelentősen megnőtt.

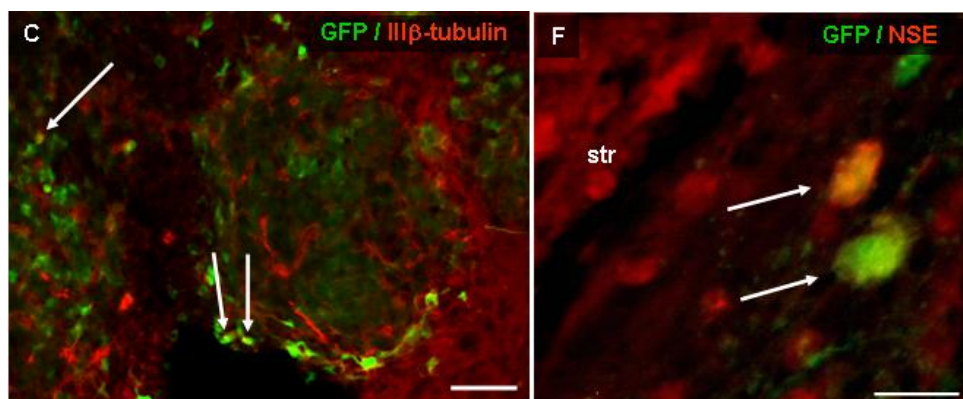
Az *in vitro* nyert adatok alapján olyan implantációs kísérleteket végeztünk, ahol az implantátumot befogadó, vagy implantálás nélküli sértett agyú állatokat a beültetéstől kezdődő (7.nap) egy héten át napi 90 percre túlnyomásos O₂-kamrába helyeztük. A 2 atm nyomású tiszta oxigén belélegezésével („hyperbar oxigén kezelés”; HBO) legalább átmenetileg oxigenálhatók a rossz keringésű szövetrészek.

A HBO kezelés eredményeként sérült zónában lecsökkent a saját (gazda) eredetű sejtek akkumulációja, anélkül, hogy ez fokozott sejtpusztulással járt volna (16.ábra).



16.ábra. A sértett – össejtekkel nem implantált -agykéregben a hyperbar O₂-kezelés hatására csökkent az inherens sejt-szaporulat. A,B: a sejtmagokat festő Hoechst festéssel látható, hogy a sértés helyén jelentősen kevesebb sejt gyülekezik a HBO-kezelt (B), mint a kezeletlen (A; fehér vonallal jelölt zóna) kéregben. C: A HBO-kezelés befejezésekor (14. nap) szignifikánsan magasabb a sértésnél gyülekező sejtek mennyisége a kezeletlen agyban; a különbség a kezelés utáni második héten megszűnik. D: TUNEL vizsgálat bizonyítja, hogy a sejtszám-változást nem a HBO-okozta sejtpusztulás eredményezte.

A beültetett össejtek a lézió területét benépesítik (Agoston et al., 2007, Zadori et al., 2011), de kezeletlen agyban belőlük idegsejtek nem keletkeznek. A HBO-kezelés a beültetett össejtek számát is csökkenti a lézionált területen, de legalább néhány idegsejt kialakulást eredményezte.



17.ábra. HBO kezelés hatására megjelennek implantált össejt-eredetű idegsejtek a sértett agykérgi régió ép szövetvel érintkező határán. zöld: GFP fluoreszcencia a beültetett össejtek azonosítására; piros: neuron-specifikus fehérje-markerek a neuronok azonosítására; bal panel: neuron-specifikus tubulin (mérce 50 μm); jobb panel: neuron-specifikus enoláz (mérce 10 μm).

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a különböző idegi ős- és progenitor-sejtek a forrás-szövet fejlődési állapotától és típusától függően egymástól eltérő sajátságokat hordoznak. A felnőtt agyból izolált klónok esetén sok eredet-specifikus sajátság irreverzibilisnek mutatkozik, de a maradó elkötelezettséget – legalábbis az általunk vizsgált – „tradicionális” pozicionális gének expressziós mintázata csak nagyon korlátozottan tükrözi. Minden vizsgált ős/progenitor sejtklónban az *in vitro* sejt differenciálódás kezdetén a régióra elkötelező gének tág spektruma aktiválódik. Feltételezésünk szerint, a környezet reguláló hatása szűkíti és állítja be az adott területre jellemző regionális gén-expressziós profilt. Hasonlóan fontos szerepet játszanak a környezetből érkező jelzések a sejt differenciálódás teljes folyamata alatt. Az agyba beültetett idegi őssejtek sorsát a befogadó környezet alapvetően megszabja. A rendelkezésünkre álló különböző idegi ős/progenitor sejtklónok lehetővé teszik, hogy a sejt-túlélést és fejlődést szabályozó külső faktorokról további fontos adatokat gyűjtsünk.

Hivatkozások

- Ágoston et al, 2007. J.Neuropath. Appl. Neurobiol., 2007. 33(5):510-22
- Hádinger et al., 2009. Int.J.Devl.Neurosci. 2009. 27: 365-375
- Hersel et al., 2003. Biomaterials 2003;24(24):4385-415
- Jelitai, et al., 2004. J.Neurosci.Res. 2004 76(6):801-11
- Környei et al., 2005,
- Környei et al., 2007
- Maher, Westbrook. 2008. J Neurophysiol 2008. 99: 1559–1564.
- Marko et al., 2011a. In: Manipulation of the Mouse Embryo. Ed.; A. Nagy
- Marko et al., 2011b. PlosOne 2011 *in press*
- Marko et al., 2008. Bioconjugate Chem. 2008. 19: 1757-1766
- Orsolits et al., 2009. Glia, 57 (13): S84-S84
- Schlett, Madarasz 1997.
- Tarnok et al., 2002
- Varga et al., 2008. BMC Dev.Biol.
- Zadori et al., 2011. Experimental Neurology 227 (2011) 136–148