

**„Heterogén sejtfenotípusok kialakulása egy homogén idegi őssejt  
populáció in vitro differenciációja során.”**

Doktori Értekezés Tézisei

Varga Balázs Viktor

ELTE  
Biológia Doktori Iskola  
Ideg tudomány és humánbiológia program  
Programvezető  
Détári László DSc., egyetemi tanár  
Témavezető  
Madarász Emília DSc., tudományos tanácsadó

A magasan specializált, végdifferenciált idegsejt-fenotípus és a vele kölcsönhatásban létező glia-típusok látszólag homogén, epitél-jellegű sejtekből alakulnak ki, egymásra épülő, sorozatos indukciós hatások következtében. A „neuruláció”-nak nevezett morfogenetikus szakaszban a neurális árok, majd a neurális cső és az erről leváló neurális lécs kialakulása során már jelentős morfológiai különbségek figyelhetők meg a jövőbeli idegszövetet alkotó sejtek között. A növekvő test anterior-poszterior és dorzo-ventrális tengelyei mentén meghatározott gén-együttesek időzített módon aktiválódnak. Ez a korai, pozíciótól függő gén-expressziós mintázat különböző neuron-differenciálódási útvonalak kialakulását eredményezi, és a jövőbeli idegsejt-fenotípusok sokféleségét biztosítja. A regionális elkölcsözödés ellenére, az idegsejt-képződés - régióktól függetlenül - azonos morfológiai és sejtbiológiai lépéseken át zajlik. A központi idegszövet minden régiójában először tömegesen idegsejtek keletkeznek, és csak ezt követi a nagymértékű gliasejt képződés. Bár mindezen folyamatokról sok leíró adat áll rendelkezésre, a molekuláris mechanizmusok, amelyek az idegszöveti sejt-képzés azonosságait és regionális különbségeit vezérlik, távolról sem ismertek.

Az *in vivo* vizsgálatokat jelentősen nehezíti a sejt heterogenitás robbanásszerű fokozódása, valamint a nem idegi szövetből származó molekulák hatása. Munkám során ezért az idegszöveti sejt fenotípusát meghatározó tényezők vizsgálatát idegi őssejt vonalakon, illetve azok *in vitro* differenciálódó populációin végeztem. A fenotípusukat tekintve azonos, klónozott idegi őssejtek tetszés szerint szaporíthatók, így megfelelő méretű és homogén kiindulási sejtanyagot biztosítottak. A laboratóriumban előzetesen már részletesen jellemzett, reprodukálható differenciációs lépések pedig lehetővé tették, hogy a vizsgálatokat az idegi sejtfejlődés jól meghatározható szakaszain végezhessem.

Munkám során, az *in vitro*, idegi sejt-differenciációs modell-rendszereken olyan idegi fejlődésbiológiai jelenségek sejt- és molekuláris biológiai hátterét vizsgáltam, amelyeket a térben és időben gyorsan változó, heterogén sejtösszetételű fejlődő agyszövetben nem, vagy csak korlátozottan tanulmányozhatók.

Vizsgáltam, hogy

- a fenó- és genotípusosan azonos őssejtekből milyen mértékben, és hogyan alakulhatnak heterogén sejttypusok a neuronális differenciáció során.
  - Az agyban régió-specifikusan kifejeződő ún. „pozicionális” gének hogyan aktiválódnak az in vitro differenciálódó őssejt-populációkban, azaz kialakul-e pozicionális heterogenitás a homogén őssejtek populációiban?
  - A homogén idegi őssejtekből milyen transzmitter fenotípusú neuronok alakulhatnak ki?
  - Mi lehet a magyarázata annak a jelenségnek, hogy a gliagenezis jelentős késéssel követi az őssejtek képződését?
- A pozicionális gén-aktivációról nyert eredmények alapján, transzfektált őssejtklonok létrehozásával vizsgáltam a dorzális előagyban kifejeződő régió-specifikus *emx2*-gén aktivitásának szerepét az in vitro idegi fejlődés során

A kísérletek során alkalmaztam sejtenyésztési, sejtbiológiai, immuncitokémiai, molekuláris biológiai és biokémiai módszereket, és az adatokat statisztikai eljárásokkal elemeztem.

Munkám főbb eredményei az alábbi pontokban foglalhatók össze.

1. **A homogén őssejt-populációból a neuroektoderma eredetű sejttypusok heterogén együttese fejlődik** az in vitro indukált idegszöveti differenciálódás során. A főbb sejt-féleségek szigorúan reprodukálható időzítéssel és arányokban jelennek meg, függetlenül az indukciós – retinsavval vagy növekedési faktor megvonással történő – eljárástól.
  - a. Az SSEA1 immunoreaktív, indukátlan idegi őssejtek (1. stádium) aránya idegi differenciálódás során lecsökken, de őssejtek fennmaradnak a differenciált sejteket nagy arányban tartalmazó tenyészetekben is.
  - b. Az indukciót követő aggregáció (2. stádium) után, az aggregátumokban először a radiális glia szerű sejtek jelennek meg, majd
  - c. a harmadik stádiumtól (48 – 72. óra) az aggregátumokban egyre több posztmitotikus neuronális előalak képződik.

- d. A kivándorló, majd nyúlványosodó idegsejtek (4. stádium) mellett, számos neuronális irányba nem elköteleződött sejt is fejlődik. Az elkötelezetlen sejtek további osztódásra képesek és a neuronok hálózata alatt aljzatsejt réteget hoznak létre (5. stádium; 5.-6. indukciós nap).
- e. A hatodik stádiumban (8.–10. indukciós nap) GFAP immunoreaktív asztrogliasejtek jelennek meg a folyamatosan „érő” idegsejtek mellett, és számuk a következő 7 napban folyamatosan növekszik.

Az adatok egyértelműen bizonyították, hogy az idegi őssejtek indukciójának hatására a „pán-neurogenetikus” folyamatok, minden további exogén hatás nélkül lefutnak, és jól reprezentálják az in vivo fejlődés során leírt sejtfejlődési folyamatokat.

## **2. Az in vitro idegi differenciálódás során különböző testtengely szerinti régiókra jellemző „pozicionális” és „proneurális” gének aktiválódnak.**

- a. Az in vivo egymással át nem fedő régiókban expresszálandó mash1 és ngn1,2 proneurális gének az általam vizsgált különböző őssejtek (R1, P19, NE-4C) in vitro idegi differenciálódása együtt aktiválódtak.
- b. A neuronok in vitro kialakulásának idejére, a vizsgált régió-specifikus gének (otx2, pax6, emx2, dlx2, otx3, gbx2, hoxb2) mindegyike aktiválódott. A jelenséget megfigyeltük embrionális őssejtek (ES) és P19 embrionális carcinoma sejtek idegi differenciálódása során is.

A csak idegi őssejteket tartalmazó in vitro rendszerekben - az in vivo extraneurális hatások hiányában - bármely régió-specifititás képessége megjelenik, és egyik sem manifesztálódik kizárólagosan.

## **3. Az in vitro neuron képződés során, különböző neurotranszmitter fenotípusú idegsejtek alakulnak.**

A régió-specifikus gének in vitro kifejeződésében tapasztalt heterogenitás alapján feltételezhető volt, hogy a fenó-és genotípusukat tekintve azonos őssejtekből különböző neurotranszmitter fenotípusu neuronok alakulhatnak. A hatodik stádiumban – ahol az erett idegsejtek jeletét a math2 neuronális transzkripciós faktor aktív átírása is bizonyítja - a  $\beta$ III-tubulin pozitív idegsejtek közel fele glutamaterg, másik fele

GABAerg neuronnak bizonyult; mellettük kis arányban (<1%) serotonin-tartalmú idegsejteket is találtunk. TH pozitív katekolaminerg idegsejtek azonban, az NE-4C idegi őssejtekből nem alakultak ki, annak ellenére, hogy a kialakulásukhoz szükséges transzkripciós faktorok (*lmx1b*, *phox2b*, *nkx2.2* és *gata3*) génjei aktiválódtak.

Az adatok azt mutatják, hogy az egy-sejt eredetű sejtpopuláción belül ható, intrinsic kölcsönhatások elegendőek arra, hogy a fejlődő idegsejtek GABAerg illetve glutamaterg irányban elköteleződjenek. A katekolaminerg fenotípus kialakulásához azonban a populációt kívülről érő hatások szükségesek.

#### **4. Az *emx2* anterior-dorzális régió-specifikus gén túlermelődése jelentős változást okoz az idegsejt-fenotípus *in vitro* alakulásában.**

Az *emx2* sejt biológiai és molekuláris hatásainak vizsgálatára hoztam létre az NE-4C vonal *emx2*-túlermelő ( $NE-4C^{emx2+}$ ), valamint a telencefalikus *emx2*-enhancer szakasz által szabályozott  $\beta$ -galaktozidáz expresszálo riporter al-klónjait.

- a. A riporter konstrukciót hordozó NE-4C al-klón vizsgálati megmutatták, hogy az *emx2* az idegsejtté még nem differenciált, illetve nem-idegsejt-típusú aljzat-sejtekben expresszálódik.
- b. A  $NE-4C^{emx2+}$  sejtekben jelentős gén-expressziós változásokat tapasztaltunk az NE-4C anyavonal sejtjeihez képest.

- i. a *pax6* dorzális előagyi gén aktív az indukátlan sejtekben;
- ii. a *vgat* gén expressziója gátlódik a differenciáció korai fázisaiban;
- iii. *blbp* és *egfr* gének expressziója jelentősen megnőtt

Az *emx2* túlermelés hatására az NE-4C őssejtek gén-aktivációs mintázata megváltozik. A korai neuroepitél sejtekre jellemző gén-expressziós mintázat helyett olyan gének aktiválódnak, amelyek átírása az elkötelezettség magasabb fokán álló, az előagy primer germinatív rétegeinek sejtjeire jellemző.

- c. Az  $NE-4C^{emx2+}$  sejtek adhezív sajátosságai jelentősen különböznek az NE-4C sejtektől. Szemben az anyavonal monolayer típusú növekedésével, az *emx2*-t túlerexpresszálo sejtek kompakt kolóniákat hoznak létre. A kolónia-képzésben a sejtfelszíni cadherin-készlet megváltozása játszik szerepet.

- d. Az NE-4C<sup>emx2+</sup> sejtek osztódási rátája nő, a sejtciklus időtartama mintegy 20%-kal csökken az NE-4C sejtekhez viszonyítva.
- e. Az NE-4C<sup>emx2+</sup> sejtek differenciálódása gyorsabb, mint az NE-4C sejteké: mitogén megvonást követő 12 órán belül megjelennek az RC2 immunopozitív radiális glia szerű sejtek, és 48-72 óra elteltével jelentős számú  $\beta$ III-tubulin immunreaktív, idegsejt alakul.
- f. Az NE-4C<sup>emx2+</sup> sejtekből alakuló idegsejtek között vannak GABAerg idegsejtek, bár ezek száma alacsonyabb, mint az NE-4C sejtek tenyészeiben. Az érett idegsejtekben kimutatható a vgat expresszió. Az adatok szerint, az emx2 túlkiváltás nem gátolja direkt módon a GABAerg fenotípus kialakulását.
- g. Az NE-4C<sup>emx2+</sup> idegi őssejtekből - a várakozásnak megfelelően – nagy arányban fejlődnek VGLUT2 immunoreaktív, glutamaterg neuronok. Szemben az NE-4C anyavonal sejtjeivel, a differenciált NE-4C<sup>emx2+</sup> idegsejtek között megjelentek tirozin-hidroxiláz-pozitív, katekolaminerg neuronok is. Szerotonin tartalmú idegsejteket ugyanakkor nem találtunk.

Az NE-4C<sup>emx2+</sup> sejtek fejlettebb progenitorokra jellemző marker sajátosságai, megváltozott adhezív sajátosságai, valamint felgyorsult differenciációja alapján feltételezhető, hogy az EMX2 túlermeléssel az NE-4C őssejt vonalat egy olyan fejlődési stádium felé toltuk el, amely az idegszövet-képzés érettebb állapotát képviseli.

## 5. A gliagenézis szabályozása in vitro

Az „idegsejt először, gliasejt aztán” elv érvényesül mindhárom (NE-4C, R1 és P19) őssejt-féleség retinsav-indukált in vitro idegi differenciálódása során. A neurogenézist kiváltó retinsav nem gátolja a később fejlődő GFAP pozitív asztroglia sejtek kialakulását, de a gliagenetikus időszakban alkalmazott retinsav megakadályozza az asztrociták képződését.

Feltételezésünk szerint az elkötelezetlen idegi őssejtekben a retinsav olyan programot indít, amely meghatározóan idegsejtek kialakulásra vezet. A folyamat – most már retinsavtól függetlenül – lehetetlenné teszi a glia-sors felé való differenciációt

lépéseket, például a proneurális neurogenin transzkripciós faktor asztroglia-specifikus géneket gátló hatásai révén. A neurogenetikus hullám – azaz, az aktív ngn expresszió - lezajlása után, a már posztmitotikus, fejlődő neuronok jelenlétében, megindulhat az asztrocita képzés. Retinsav jelenlétében azonban ez a folyamat gátlódik.

Összefoglalva megállapíthattuk, hogy egy rövid indukció után, az eredetileg homogén őssejt-populáción belüli sejt-kölcsönhatások igen különböző idegszöveti sejt-típusok kialakulását teszik lehetővé. A sejttypusok kialakulásának sorrendjét, egymáshoz viszonyított méretét, a populáción belüli kölcsönhatások – a reprodukálhatóságból ítélve – szigorúan szabályozzák.

A korai embrionális idegi őssejtekből, in vitro, különböző transzmitter-fenotípusú idegsejtek alakulhatnak. A lehetséges fenotípusok egyes régió-specifikus gének – mint a mi esetünkben az *emx2* - hatására módosulnak. Az adatok jelzik, hogy az in vivo idegsejt képzés során, az idegi ős/progenitor sejtekben még sokféle lehetséges fenotípus közül extraneurális, régiónális hatások válogatják ki az adott helyen és időben manifesztálódó neurotranszmitter-sajátságokat.

## Köszönet nyilvánítás

Doktori tanulmányaim, munkám és dolgozatom elkészítéséhez nyújtott segítségéért köszönet illeti az ELTE Biológia Doktori Iskolát és az MTA-KOKI munkatársait.

Köszönöm a Richter Gedeon Centenáriumi Alapítvány ösztöndíj támogatását.

Hálásan köszönöm az Idegi Sejt-, és Fejlődésbiológiai Laboratórium munkatársainak és szerzőtársaimnak elméleti és gyakorlati segítségét.

Nagyon köszönöm Madarász Emíliának több mint ötéves segítségét, türelmét és támogatását, amivel lehetővé tette szakmai fejlődésemet.

Sok köszönet illeti családomat és kedvesemet mindazért a támogatásért, amivel tanulmányaimat lehetővé tették, és mindazért az időért, amit tőlük vettem el a doktori munkám végzésével.



A dolgozat eredményeiből készült közlemények:

Teljes terjedelmű közlemények:

Varga B., Hádinger N, Gócza E., Dulberg V., Demeter K., Madarász E. and Herberth B.,  
Generation of diverse neuronal subtypes in cloned populations of stem-like cells. 2008.  
BMC Devl. Biol., 8: 89-107

Nóra Hádinger\*, Balázs V. Varga\*, Sára Berzsenyi, Zsuzsanna Környei, Emília  
Madarász, Balázs Herberth. Retinoic acid regulates astroglialogenesis.  
Int.J.Devl.Neurosci. 2009. 27: 365-375

\*Azonos mértékű hozzájárulás a cikk anyagához és megírásához

Balázs Varga, Károly Markó, Nóra Hádinger, Márta Jelítai., Kornél Demeter, Károly  
Tihanyi, Ádám Vas, Emília Madarász. Translocator protein (TSPO 18 kDa) is  
expressed by neural stem and neuronal precursor cells. Neurosci.Letts. *under revision*

Előadások/ posztterek (válogatás)

Varga B.V., Herberth B., Bence M., Hádinger N., Környei Zs., Madarász E.  
Expression of neurogenic and region specific genes during the in vitro induced  
neurogenesis of NE-4C cloned neuroectodermal cells. ISDN 2004 15th Biennial Meeting  
of the International Society for Developmental Neuroscience. Edinburgh, Scotland, 08/4-  
7/2004.

Herberth B., Hádinger N., Dulberg V., Varga BV., Madarász E. (2005) Development of  
the neurotransmitter phenotype during the in vitro differentiation of the NE-4C  
neuroectodermal cell line Cortical Development Santorini, Greece, 2005.-05.11-16.

Hádinger N., Herberth B., Dulberg V., Varga B.V., Madarász E. (2005) Determination of  
the neurotransmitter phenotype during the invitro differentiation of NE-4C  
neuroectodermal stem cells. FEBS J. Vol. 272, pp283.

Herberth Balázs; Hádinger Nóra; Varga Balázs; Dulberg Vered; Madarász Emília (2005)  
Idegsejt vagy asztrogliá? – Idegi sejtors-elköteleződés szabályozásának in vitro  
vizsgálata VI. Magyar Genetikai Kongresszus és XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok

Hádinger Nóra; Herberth Balázs; Varga Balázs; Dulberg Vered; Madarász Emília (2005)  
Development of the neurotransmitter phenotype during the in vitro differentiation of the  
NE-4C neuroectodermal cell line. VI. Magyar Genetikai Kongresszus és XIII. Sejt- és  
Fejlődésbiológiai Napok április 10-12 poszter, fiatal kutatói díj

Varga B. V., Hádinger N., Madarász E. & Herberth B. (2006) Neuron or astrocyte? – Cell  
fate determination in vitro. 5th Forum of European Neuroscience Soc., Vienna, Austria  
07.08 - 07.12.2006.

Nóra Hádinger, Balázs Herberth, Balázs Varga, Vered Dulberg, Emília Madarász (2006)  
Formation of the neurotransmitter phenotype during the in vitro neurogenesis by NE-4C  
neuroectodermal cells. 5th Forum of European Neuroscience, Vienna, Austria 07.08.-  
07.12.2006.