

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

Doktori értekezés

Hádinger Nóra

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók:

Dr. Krizbai István, PhD
Dr. Nagy Nándor, PhD

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Csillag András, az MTA Doktora

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Katona István, az MTA Doktora
Dr. Tárnok Krisztián, PhD

Budapest
2011

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
2.1. Idegi progenitorok a fejlődő központi idegrendszer területén	8
2.1.1. <i>A neuroepitélialis sejtek</i>	8
2.1.2. <i>A radiális glia sejtek</i>	11
2.1.3. <i>A köztes progenitorok</i>	13
2.2. Idegi progenitorok <i>in vitro</i>	15
2.2.1. <i>Primitív idegi őssejtek”, neuroepitél stádium</i>	16
2.2.2. <i>Radiális glia sejtek in vitro</i>	17
2.2.3. <i>Köztes progenitorok in vitro vizsgálata</i>	19
2.3. Az idegsejt képzés folyamata	19
2.4. Az idegsejt képzésről asztroglia képzésre való váltás folyamata	21
2.5. A fejlődő központi idegrendszer regionalizációja	24
2.5.1. <i>A velőlemez és a korai velőcső regionalizációja</i>	25
2.5.2. <i>A medio-laterális / dorzo-ventrális regionalizáció</i>	27
2.5.3. <i>Az antero-poszterior regionalizáció</i>	29
2.6. Az Emx2 homeodomén transzkripciós faktor szerepe az idegi fejlődés során.....	34
2.6.1. <i>Az Emx2 szerepe az anterior idegi régiók meghatározásában</i>	34
2.6.2. <i>Az Emx2 transzkripciós faktor szerepe a kérgi régiók kialakulásában</i>	35
2.6.3. <i>Az Emx2 transzkripciós faktor sejt-szintű hatásai</i>	37
2.7. Doktori munkám során alkalmazott kísérletes rendszerek	37
2.7.1. <i>Az NE-4C sejtek differenciációja</i>	39
3. CÉLKITŰZÉSEK	43
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	44
4.1. Az NE-4C és P19 sejtek fenntartása.....	44
4.2. Az NE-4C és P19 sejtek idegi differenciációjának indukálása retinsavval	44
4.3. Az NE-4C sejtek idegi differenciációjának indukálása, a növekedési faktorok megvonásával.....	44
4.4. Az R1 embrionális őssejtek fenntartása és differenciáltatása	45
4.5. Az NE-4C sejtvonallal genetikai módosítása	45
4.6. Primer idegsejt tenyészetek előállításának	46

4.7. NE-4C ^{GFP} /NE-4C és NE-4C ^{GFP} /primer idegsejt kokultúrák készítése.....	46
4.8. Immuncitokémiai festés.....	47
4.9. Az immuncitokémiai festések kiértékelése	48
4.9.1. Fluoreszcencia intenzitás alapján történő értékelés	48
4.9.2. Sejtszámolás alapján való kiértékelés	49
4.10. Western blot analízis	49
4.11. RT-PCR analízis.....	50
4.12. Tunel (TdT-dependent dUTP-biotin nick end labelling) reakció	53
4.13. BrdU-kezelés	53
4.14. Retinsav mérés sejtbiológiai („bioesszé”) módszerrel.....	53
4.15. A RA magi receptorainak gátlása	54
4.16. RAREhsplacZ egértörzs	54
4.17. β -galaktozidáz aktivitás kimutatása RAREhsplacZ egerek agyában.....	54
5. EREDMÉNYEK	56
5.1. REGIONÁLIS ÉS NEUROTRANZMITTER SAJÁTSÁGOK ALAKULÁSA AZ IN VITRO IDEGI FEJLŐDÉS SORÁN.....	56
5.1.2. Az NE-4C, a P19 és az R1 sejtek idegi differenciációja során különböző idegrendszeri régiókra jellemző proneurális gének aktiválódnak	56
5.1.3. Az egy-sejt-eredetű összejt populációk idegi fejlődése során, a központi idegrendszer regionalizációját szabályozó gének széles skálája aktiválódik.....	57
5.1.4. Az NE-4C összejtekből különböző neurotransmitter fenotípusú idegsejtek fejlődnek	60
5.2. AZ <i>EMX2</i> TRANSZKRIPCIÓS FAKTOR HATÁSA AZ ÖSSEJT FENOTÍPUSRA ÉS AZ IDEGI FEJLŐDÉS FOLYAMATÁRA	64
5.2.1. <i>Emx2</i> -t túltermelő NE-4C klónok létrehozása.....	64
5.2.2. Az <i>emx2</i> transzkripció faktor túlexpresszálatása megváltoztatja az NE-4C sejtek adhéziós tulajdonságait.....	66
5.2.3. Az <i>emx2</i> gén kifejeződésének hatására az indukátlan NE-4C sejtekben számos, az idegi fejlődésben meghatározó szerepet játszó gén expressziója megváltozik	69
5.2.4. Az <i>emx2</i> túlexpresszálatása nem gátolta az ideg- illetve asztroglia sejtek kialakulását	71
5.2.5. Az NE-4C ^{<i>emx2</i>+} sejtek regionálisan elkötelezetlenek maradtak	72
5.2.6. Az NE-4C ^{<i>emx2</i>+} sejtek GABA-erg és glutamaterg idegsejtek képzésére is képesek maradtak	74
5.2.7. A retinsavval indukált NE-4C ^{<i>emx2</i>+} tenyészetekben katekolaminerg, szerotonerg és kolinerg markerek is kimutathatóak voltak	76

5.3. AZ ASZTROGLIA KÉPZÉS SZABÁLYOZÁSA AZ <i>IN VITRO</i> IDEGI FEJLŐDÉS SORÁN	80
5.3.1 Az idegsejtek hatása az asztroglia képzésre	82
5.3.2. Az <i>all-transz</i> retinsav szerepe az asztroglia képzés szabályozásában	84
5.3.2.1. <i>A retinsav korai jelenléte szükséges az asztroglia sejtek in vitro kialakulásához</i>	84
5.3.2.2. <i>A retinsav az idegi differenciáció későbbi (asztroglia képző) szakaszában gátolja az asztroglia sejtek kialakulását</i>	85
5.3.2.3. <i>A differenciálódó NE-4C sejtek retinsavat termelnek, mely szabályozza a kialakuló asztroglia sejtek mennyiségét</i>	89
6. MEGBESZÉLÉS.....	92
6.1. Az NE-4C sejtek differenciációja során a régió specifikus gének széles skálája aktiválódik.....	93
6.2. Az NE-4C sejtek különböző idegsejt fenotípusok létrehozására képesek	94
6.3. A P19 és az R1 sejtek RA-val indukált idegi differenciációja során különböző <i>in vivo</i> expressziós területtel jellemzhető homeobox gének expressziója indukálódik, és az idegsejteket tartalmazó tenyészetekben mind GABA-erg mind glutamaterg markerek kimutathatóak.....	96
6.4. Az Emx2 homeodomén transzkripció faktor túlexpresszáltatása megváltoztatja az NE-4C neuroektodermális őssejtek fenotípusát, és differenciációs kapacitását	98
6.4.1. <i>Az NE-4C^{emx2+} sejtek megtartják idegi őssejt tulajdonságaikat, de úgy tűnik, az NE-4C alapvonalhoz képest egy későbbi fejlődési stádiumot képviselnek</i>	98
6.4.2. <i>Az emx2 transzgen expressziója nem változtatja meg jelentős mértékben az NE-4C sejtek regionális „elkötelezettségét”, de hatással van a kialakuló idegsejtek fenotípusára</i>	102
6.5. A retinsav fejlődési stádium függően szabályozza az asztroglia képzés folyamatát ..	104
7. KÖVETKEZTETÉSEK	109
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	111
9. SUMMARY	112
10. HIVATKOZÁSOK	113
11. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK.....	128
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	129

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

5-HT	- 5-hydroxytryptamine (szerotonin)
ANR	- Anterior neural ridge (elülső idegi szél)
AP	- Antero-poszterior (elülső-hátulsó)
AVE	- Anterior viszcerális endoderma
bHLH	- Basic helix-loop-helix (bázikus hélix-hurok-hélix)
BLBP	- Brain lipid binding protein
BMP	- Bone morphogenic protein
BrdU	- 5-bróm-2'-dezoxiuridin
BSA	- Bovine serum albumin (marha szérum albumin)
CNTF	- Ciliary neurotrophic factor
CT-1	- Cardiotrophin-1
DAB	- 3,3'-Diaminobenzidine
Dll4	- Delta-like 4
Dlx	- Distal less homeobox
DV	- Dorzo-ventrális
EB	- Embryoid body (embriócsomó)
EC	- Embryonic carcinoma (embrionális karcinóma)
EGF	- Epidermal growth factor
Emx	- Empty spiracles homolog
En	- Engrailed homeobox

ES	- Embryonic stem cell (embrionális őssejt)
E(x)	- Az embrionális fejlődés x. napja (a megtermékenyítés időpontjától számítva)
FACS	- Fluorescence-activated cell sorting (fluoreszcencia alapú sejtválogatás)
FCS	- Fetal calf serum (fötális borjúsavó)
FGF	- Fibroblast growth factor
GATA	- GATA binding protein
Gbx	- Gastrulation brain homeobox
GFAP	- Glial fibrillary acidic protein (gliális fibrilláris savas fehérje)
GFP	- Green fluorescent protein (zöld fluoreszcens fehérje)
Gli	- GLI family zinc finger
GLAST	- Glutamate aspartate transporter
GS	- Glutamine synthetase
Hes	- Hairy and enhancer of split
HPRT	- Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
ITS	- Inzulin, transferrin, szelén
Jag	- Jagged
KIR	- Központi idegrendszer
LeX	- Lewis X epitóp
LIF	- Leukemia inhibitory factor
Mash	- Mammalian achaete-scute complex homolog
Math	- Mammalian atonal homolog

MEM	- Minimum Essential Medium
ML	- Medio-laterális (középső-oldalsó)
Ngn	- Neurogenin
Nkx	- NK2 homeobox
NS	- Neural stem
NSC	- Neural stem cell (idegi őssejt)
Otx	- Orthodenticle homeobox
Pax	- Paired box
PBS	- Phosphate buffered saline
PE	- Phycoerithrin
PI	- Propidium iodide (propídium jodid)
PLL	- Poli-L-Lizin
PIR	- Perifériás idegrendszer
RA	- Retinoic acid (retinsav)
Raldh	- Retinaldehid dehidrogenáz
RAR	- Retinoic acid receptor (retinsav receptor)
RARE	- Retinoic acid responsive element (retinsav érzékeny elem)
R-NSC	- Rozetta stádiumú idegi őssejt
RT-PCR	- Reverse transcription-polymerase chain reaction (reverz transzkripció-polimeráz láncreakció)
Shh	- Sonic Hedgehog
Sox	- SRY (sex determining region Y)-box

SSEA-1	- Stage specific embryonic antigen 1
SVZ	- Szubventrikuláris zóna
TH	- Tirozin hidroxiláz
TUNEL	- Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (terminalis-dezoxiribonukleotidil transzferáz mediált dUTP fragment-vég jelölés)
UTR	- Untranslated region (Nem transzlálódó régió)
V1	- Elsődleges vizuális kéreg
VGAT	- Vesicular GABA transporter (Vezikuláris GABA transzporter)
VGlut	- Vesicular glutamate transporter (Vezikuláris glutamát transzporter)
VZ	- Ventrikuláris zóna
Wnt	- wingless-related MMTV integration site
ZLI	- Zona limitans intrathalamica

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az összetett felépítésű, számos ideg- és glia sejt típus alkotta, és az egész szervezet működését a szabályozása alatt tartó emlős idegrendszer (az idegrendszer működésében fontos szerepet játszó, ám nem idegi elemeket, például az endotél sejteket, mikroglia sejteket kivéve) egy kezdetben egy sejtrétegű, morfológiailag hasonló neuroepiteliális sejtekből álló idegrendszer kezdeményből alakul ki.

Ahhoz, hogy a bonyolult idegi struktúra kialakulhasson, az idegrendszer fejlődése során az idegi progenitorok térben és időben szigorúan szabályozott „működésére” van szükség.

A következőkben, nagy vonalakban, ezeket a szabályozó folyamatokat szeretném bemutatni, különös tekintettel az idegsejt képzésről asztroglia képzésre való váltást, és az idegrendszeri régiók szerinti, pozicionális elköteleződést szabályozó folyamatokra, melyeket doktori munkám során vizsgáltam. Mivel kísérleteimet egér eredetű őssejt populációkon végeztem, az alább bemutatott irodalmi adatokat a rágcsáló idegi fejlődés témaköréből gyűjtöttem.

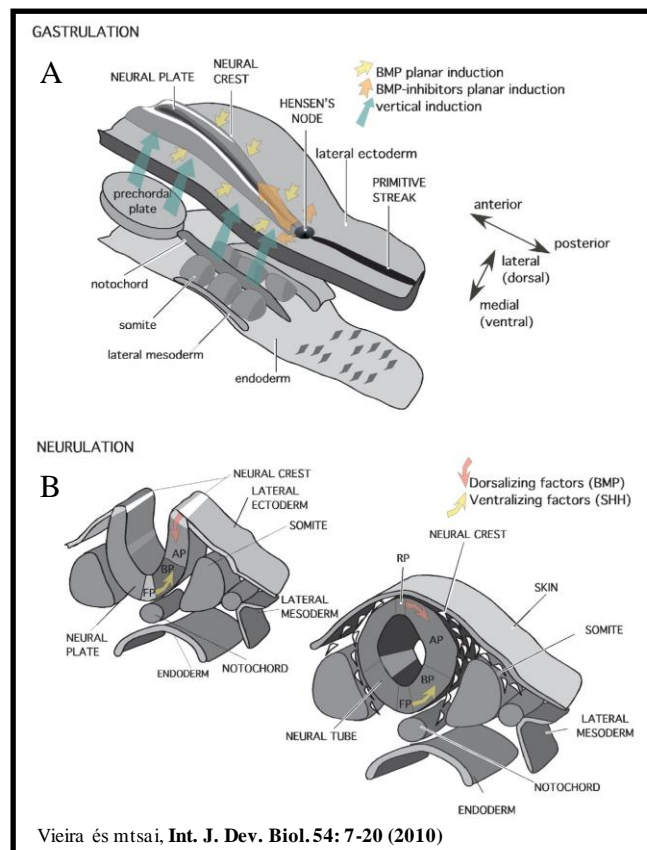
2.1. Idegi progenitorok a fejlődő központi idegrendszer területén

A következőkben idegi progenitornak nevezek minden neuroektodermális eredetű sejtet, mely osztódásra, és közvetlenül vagy közvetve, ideg- és/vagy glia sejtek létrehozására képes.

2.1.1. *A neuroepiteliális sejtek*

Az idegrendszer telepe a gasztrula stádiumú embrió epiblaszt rétegének anterior területén (az egér embrionális fejlődésének 7-7,5. napján), az embrió leendő dorzális oldalán alakul ki (Downs és Davies, 1993). Az epiblaszt sejtek ezen a területen a környezetből felszabaduló faktorok hatására morfológiai és molekuláris változásokon mennek keresztül, melyeknek eredményeképpen kialakul az egyrétegű, többmagsoros hengerhából álló velőlemez. A velőlemez, a gasztruláció megindulásával és az embriópajzs növekedésével párhuzamosan, rostrális irányba növekszik, míg végül az

embrió teljes hosszában végighúzódik. Az idegrendszer fejlődésének következő lépésében, a velőlemez szélei felemelkednek, és egymáshoz közelednek. Ezáltal a velőlemez fokozatosan csővé záródik (velőcső) (1. Ábra). A velőcsőből származik csaknem a teljes központi idegrendszer (KIR). A perifériás idegrendszer (PIR) a neuruláció során a velőlemezzől leváló sejtekből (velősánc eredetű sejtek) fejlődik.



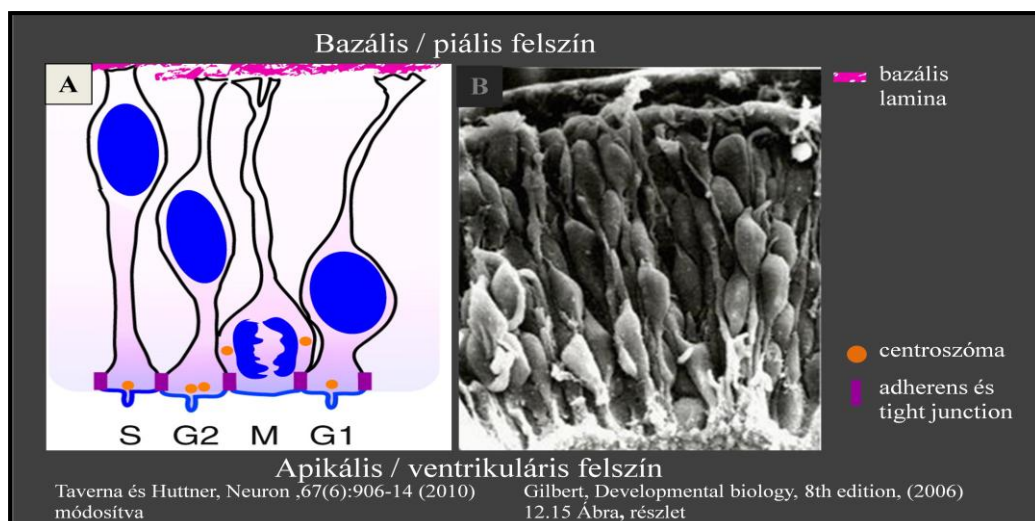
1. Ábra: A velőcső záródás folyamata (A): A *gasztruláció* folyamatával párhuzamosan, a környező szövetekből (axiális mezoderma – prekorda, notokord -, nem neurális ektoderma, Hensen csomó (csirke) – rágcsáló esetében organizátor -) származó szignálok hatására meghatározódik és a rostromedialis illetve mediolaterális/dorsoventrális tengelyek mentén polarizálódik az idegrendszer telepe. **(B):** A keresztmetszeti rajzokon a velőcső záródás folyamata látható.

Rövidítések: AP: alar plate –oldallemez-, BMP: bone morphogenic protein, BP: basal plate -alaplemez-, FP: floor plate –padló lemez-, RP: roof plate –tetőlemez, Shh: Sonic hedgehog

Angol kifejezések: Hensen's node: Hensen csomó, induction: indukció, neural crest: velősánc, neural plate: velőlemez, neural tube: velőcső, primitive streak: primitív csík, skin: bőr, somite: szomita

A velőlemez és a velőcsövet az idegsejt képzés kezdetéig a neuroepitéliális sejtek egyetlen sejtrétege alkotja. A neuroepitéliális sejtek folyamatosan osztódnak, túlnyomórészt szimmetrikus, önszaporító módon. Ezáltal, növelik az idegtelep kiterjedését, illetve az őssejt készletet.

A neuroepitéliális sejtek epitéliális karakterrel rendelkeznek. Apiko-bazálisan polarizáltak (Huttner és Brand, 1997), és az apikális oldalukon szoros és adherens sejtkapcsolatok (tight és adherens junction) által kapcsolódnak (Aaku-Saraste és mtsai, 1996). A neuroepitéliális sejtekre jellemző, hogy sejtmagvaik az ismétlődő sejtciklusok során az apikális és a bazális pólus között vándorolnak (interkinetikus magvándorlás). M fázisban a magvak az apikális, S fázisban a bazális oldalon helyezkednek el, ezáltal a sejtek többmagsoros hámot alkotnak (Sauer, 1935; Latasta és mtsai, 2009) (2. Ábra). A neuroepitéliális sejtekben megtalálható az idegi progenitorokra széleskörűen jellemző *nestin* intermedier filamentum (Lendahl és mtsai, 1990; Dahlstrand és mtsai, 1995).



2. Ábra: A többmagsoros neuroepitél (A): A neuroepitéliális sejtek a neuroepitél teljes vastagságát átérő, apikobazálisan polarizált sejtek. Az apikális / kamra felőli oldalon adherens és *tight junction*-ökkel egymáshoz, míg a bazális / piális oldalon bazális végtalpaikkal a bazális laminához kapcsolódnak. Az ábrán látható, hogy a sejtmagok a sejtciklus során az apikális és bazális pólus között változtatják a helyüket. **(B):** Pásztázó elektronmikroszkópos felvétel a velőcső záródás utáni stádiumról (csirke embrió).

Az idegsejtképzést megelőzően, nagyjából a velőcső záródásával egy időben (az előagy területén az embrionális fejlődés 9-10. napján) a neuroepithéliális sejtek számos változáson mennek keresztül. A sejtek elvesztik *tight junction* kapcsolataikat, és az

adherens kapcsolatokban az *E-cadherin* szerepét egyre inkább az *N-cadherin* veszi át (Aaku-Saraste és mtsai, 1996). Az idegsejt képzést megelőzően a neuroepitéliális sejtek fennmaradása a *Notch* jelátviteli útvonal által aktivált *Hes* (*hairy and enhancer of split*) transzkripciós faktorok aktivitásától válik függővé (Hatakeyama és mtsai, 2004). Szintén a velőcső záródásával egy időben, a sejtekben megjelenik a *nestin* fehérjének az RC2 monoklonális ellenanyag által felismert poszttranszlációs módosulata (Mission és mtsai, 1988; Park és mtsai, 2009). A szimmetrikus sejtosztódás mellett megjelenik az aszimmetrikus osztódási mód, melynek során a neuroepitéliális sejtek egy újabb neuroepitéliális sejtet és egy idegsejtet (lásd lejjebb) képeznek (Haubensak és mtsai, 2004).

Az első idegsejtek kialakulásával párhuzamosan, a neuroepitéliális sejtek az asztroglia sejtekre is jellemző markereket kezdenek el expresszálni. Az így kialakuló, a neuroepitéliális és asztroglia sejtekkel is számos közös vonást mutató sejtek a radiális glia sejtek.

2.1.2. A radiális glia sejtek

A radiális glia sejtek a neuroepitéliális sejtekhez hasonlóan, apiko-bazálisan polarizált sejtek, melyek az idegcső falát teljes vastagságában átérlik. Sejtmagjaik a neuroepitéliális sejtek sejtmagjaihoz hasonlóan interkinetikus vándorlást végeznek, ám a sejtciklus során végig a kamrafelszint övező elsődleges germinatív zónában, a ventrikuláris zónában (VZ) maradnak. A neuroepitéliális sejtekkel közös tulajdonságaik még többek között a *nestin* és RC2 pozitivitás illetve az adherens és rés kapcsolat (gap junction) kapcsoltág (Götz és Huttner, 2005; Mori és mtsai, 2005). A neuroepitéliális sejtekkel ellentétben, a radiális glia sejtek esetében az aszimmetrikus osztódási forma dominál a szimmetrikus, önsokszorozó osztódással szemben.

A radiális glia sejteket a késői neuroepitéliális sejtektől az asztroglia sejtekre is jellemző tulajdonságok jelenléte különbözteti meg. Ezek a tulajdonságok a dorzális előagy területen a tizenkettedik embrionális nap (E12) környékén jelennek meg. A sejtekben megjelennek a glikogén granulumok (Gadisseux és Evrard, 1985), és az *asztroglia specifikus glutamát transzporter (GLAST)* (Shibata és mtsai, 1997), *glutamin szintetáz (GS)* (Akimoto és mtsai, 1993), *brain lipid binding protein (BLBP)* (Feng és

mtsai, 1994), *SI00 β* , *Tenascin C (TN-C)* (Götz és mtsai, 1998), és *vimentin* (Pixley és de Vellis, 1984) fehérjék. A főemlősök esetén a radiális glia sejtek *GFAP (glial fibrillary acidic protein -gliális fibrilláris savas fehérje-)* intermedier filamentumot is tartalmaznak (Levitt és Rakic, 1980). A radiális glia populációban, csakúgy, mint az asztroglia populációban, heterogenitás figyelhető meg, azaz nem minden sejt expresszálja az összes fentebb említett markert egy időben (Hartfuss és mtsai, 2001). Ezen kívül, egyes eredmények szerint, az idegi őssejtekben az idegrendszer bizonyos területein (például a gerincvelőben), csak az idegsejt képzés lezajlását követően kezdenek el megjelenni a gliális markerek (Barry és McDermott, 2005).

A radiális glia sejteknek az idegrendszer fejlődésében betöltött funkciói közül először az idegsejtek radiális migrációját segítő szerepük vált ismertté (Rakic, 1971; Hatten, 1990). Míg alacsonyabb rendű gerincesekben (pl. madarak, halak) a radiális glia sejtek a felnőtt idegrendszerben is megtartják radiális morfológiájukat, addig emlősökben, a születés körüli időszakban elvesztik kapcsolataikat előbb a kamra, majd a piális felszínnel, és végül asztroglia sejtekké alakulnak. Ez az asztroglia-progenitor funkciójuk régóta ismert (Cameron és Rakic, 1991), arra azonban csak az utóbbi években derült fény, hogy a radiális glia sejtek idegsejt progenitorként is funkcionálnak (Malatesta és mtsai, 2003). Egyes adatok szerint, az idegsejtek többsége közvetlenül vagy köztes progenitorokon keresztül közvetve a radiális glia sejtekből származik az idegrendszer teljes területén (Anthony és mtsai, 2004). A radiális glia sejtek asztroglia és idegsejtek képzésén kívül, - oligodendroglia progenitorokon keresztül- oligodendroglia sejtek, (Casper és McCarthy, 2006) és - közvetlenül-ependima sejtek (Spassky és mtsai, 2005) létrehozására is képesek (3. Ábra). Ez azonban nem jelenti azt, hogy egy adott radiális glia sejt az összes glia és idegsejt típus létrehozására képes. A radiális glia sejtek differenciációs potenciálja a központi idegrendszer tengelyei mentén térben, és időben is változik, ezen kívül adott agyterületen belül, a fejlődés adott pillanatában is létezhetnek egymás mellett különböző fejlődési potenciállal rendelkező radiális glia sejtek (Kriegstein és Alvarez-Buylla, 2009). A felnőtt idegrendszer idegi őssejtjei szintén a radiális glia sejtektől származtathatóak (Merkle és mtsai, 2004).

A neuroepitéliális és radiális glia sejtek idegi őssejt potenciállal rendelkeznek. Ezek a sejtek az idegi fejlődés során, önmaguk folyamatos megújításával párhuzamosan,

aszimmetrikusan osztódva, közvetlenül vagy maguknál differenciáltabb progenitorok létrehozásán keresztül közvetve, idegsejtek és/vagy glia sejtek létrehozására képesek (Kriegstein és Alvarez-Buylla, 2009).

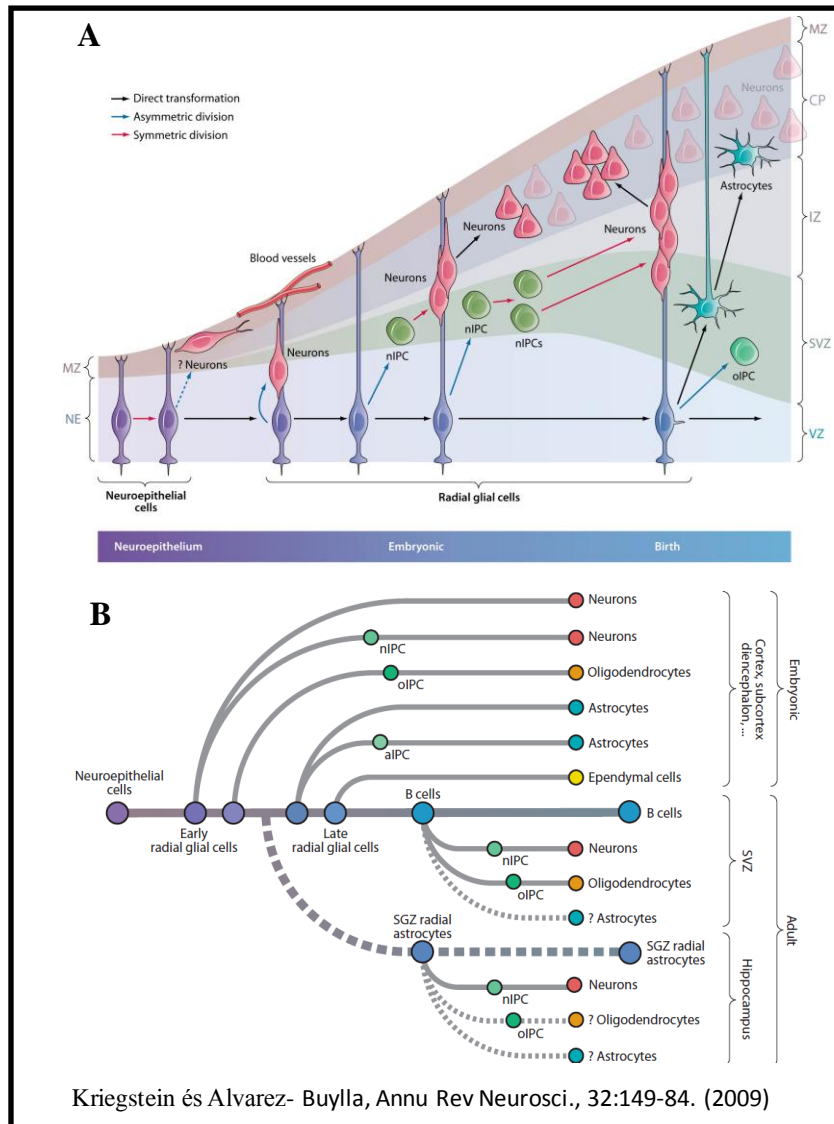
A neuroepitéliális sejtek azonban, döntő mértékben szimmetrikusan osztódnak, ezáltal két újabb neuroepitéliális sejtet létrehozva, és a radiális glia sejtek is képesek szimmetrikus, önsokszorozó osztódásra, az aszimmetrikus ideg- illetve glia sejt képző osztódások mellett. Ezeknek a sokszorozó lépéseknek a segítségével jöhet létre a kifejelett idegrendszert felépítő hatalmas mennyiségű sejt.

2.1.3. A köztes progenitorok

A központi idegrendszer köztes progenitorai számos tulajdonságuk, pl. fejlődési potenciáljuk, osztódási képességeik, jellemző markereik, alapján igen változó képet mutatnak az idegrendszer különböző területin, illetve adott idegrendszeri területen belül is, ezért nehéz általánosan jellemezni őket.

A köztes progenitorok, az idegi őssejtekkel ellentétben, sok esetben csak korlátozott számú (a dorzális előagyi szubventrikuláris zóna (SVZ) bazális progenitorai pl. az esetek 90%-ában egyszer, 10%-ában kétszer osztódnak (Noctor és mtsai, 2004)) osztódásra képesek. A köztes progenitorok az idegi őssejtekből származnak, és asztroglia, oligodendroglia vagy idegsejt irányba elkötelezettek (Kriegstein és Alvarez-Buylla, 2009), és szimmetrikus osztódások során két progenitor sejtet vagy két ideg- vagy glia sejtet képeznek. Egyes adatok szerint, bizonyos köztes progenitor populációk (például a ventrális előagyi SVZ területén) ideg- és glia sejtek létrehozására is képesek, attól függően, hogy a környezetükben milyen differenciációs szignálok vannak jelen (Yung és mtsai, 2002). A neuroepitéliális és radiális glia sejtekkel ellentétben, a köztes progenitorok nem érik át az idegrendszer kezdemény falát, és az esetek többségében multipoláris morfológiájú sejtek. A fejlődő központi idegrendszer bizonyos területein, mint például az előagyi ventrikuláris zónától bazálisan elhelyezkedő szubventrikuláris zónában, vagy a kisagy területén elhelyezkedő külső granulás rétegben, másodlagos germinatív rétegbe tömörülnek. A radiális morfológiájú idegi őssejtekkel ellentétben, melyek sejtteste az idegi fejlődés során a ventrikuláris zónában egy adott helyen helyezkednek el az antero-poszterior és dorzo-ventrális tengelyek mentén, a köztes

progenitorok születési helyüktől elvándorolhatnak. A kisagyi szemcsesejteket képző progenitorok például, a kisagyi primordium ventrikuláris zónájában keletkeznek, majd innen a primordium felszínére vándorolnak, így kialakítva a külső granuláris réteget (Sillioe és Joyner, 2007).



3. Ábra: Az idegi progenitorok leszármazási kapcsolatai. A neuroepitéliális sejtek az idegsejt képzés megindulásával párhuzamosan, radiális glia sejtekké alakulnak. A radiális glia sejtek közvetlenül, majd túlnyomórészt köztes progenitorokon keresztül, közvetve, idegsejteket hoznak létre. A születést megelőző időszakban, a radiális glia sejtek egy része közvetlenül asztrogliá sejté alakul. Szintén ebben az időszakban keletkeznek a radiális glia sejtek aszimmetrikus osztódásával az asztrogliá illetve oligodendroglia irányba elkötelezett köztes progenitor sejtek. A radiális glia sejtek hozzák létre az ependima sejteket illetve a felnőtt előagyi szubventrikuláris zóna és a hippokampális szubgranuláris zóna őssejtjeit is. **(A):** Radiális glia sejtek a fejlődő előagy kéregben. **(B):** Az idegi progenitorok leszármazási fája.

Rövidítések: *aIPC*: asztrogliá irányba elkötelezett intermediér progenitor sejt (bazális progenitor), *CP*: cortical plate –kérgi lemez-, *IZ*: intermediér zóna, *MZ*: marginális zóna, *nIPC*: idegsejt irányba elkötelezett intermediér progenitor sejt, *oIPC*: oligodendroglia irányba elkötelezett intermediér progenitor sejt, *SGZ*: szubgranuláris zóna, *SVZ*: szubventrikuláris zóna, *VZ*: ventrikuláris zóna

Angol kifejezések: *astrocytes*: asztrogliá sejtek, *asymmetric division*: aszimmetrikus osztódás, *B cells*: B sejtek, *birth*: születés, *blood vessels*: vérerek, *direct transformation*: közvetlen átalakulás, *early radial glial cells*: korai radiális glia sejtek, *ependymal cells*: ependima sejtek, *late radial glial cells*: késői radiális glia sejtek, *neuroepithelial cells*: neuroepiteliális sejtek, *neurons*: idegsejtek, *oligodendrocytes*: oligodendroglia sejtek, *symmetric division*: szimmetrikus osztódás

2.2. Idegi progenitorok *in vitro*

Doktori munkám során *in vitro* modell-rendszereken vizsgáltam az idegi fejlődés mechanizmusait. Fontosnak tartom ezért, hogy az idegszövetben jelenlevő progenitorok bemutatása mellett, írjak a napjainkban leggyakrabban használt, ezeknek többé-kevésbé megfeleltethető *in vitro* idegi őssejt-rendszerekről.

Az idegi progenitorok tulajdonságainak *in vitro* vizsgálatához az idegi őssejtek/progenitorok két fő forrásból származhatnak. Az egyik esetben a progenitorokat közvetlenül az idegszövetből nyerik, a fejlődés egy adott stádiumában (Conti és Cattaneo, 2010). Ebben az esetben, a progenitorokat egy jellemző tulajdonságuk alapján elválasztják az idegszövet többi sejtjétől (Anthony és mtsai, 2004; Malatesta és mtsai, 2003), és/vagy olyan körülmények között tartják fenn az idegi tenyészeteket, melyek szelektíven a progenitorok túlélésének/felszaporodásának kedveznek (Reynolds és Weiss, 1992; Conti és mtsai, 2005; Markó és mtsai publikálatlan eredmények). A másik esetben, pluripotens őssejt populációk - pl. embrionális őssejt (ES) (Bain és mtsai, 1995; Conti és Cattaneo, 2010), embrionális karcinóma sejt (EC) (Jones-Villeneuve és mtsai, 1982) vonalak- idegi irányú differenciáltatása során alakulnak ki idegi irányba elkötelezett progenitor populációk. Mivel utóbbi esetben a differenciáció során a neurális sejteken kívül nem idegi sejtek is kialakulnak, itt is szükség lehet az idegi irányban elkötelezett progenitor sejtek kiválogatására (Ying és mtsai, 2003).

Idegi progenitorok számos fejlődési stádiumból és idegrendszeri régióból kinyerhetők, illetve a pluripotens őssejtek *in vitro* idegi differenciációja során is

kialakulnak különböző idegi progenitor stádiumoknak megfelelő sejtek. Ezek a fenotípusok azonban hosszú távon csak korlátozott mértékben tarthatók fenn *in vitro*.

2.2.1. Primitív idegi őssejtek”, neuroepitél stádium

In vitro körülmények között idegi őssejtként viselkedő sejtek már igen korai epiblasztból (az egér embrionális fejlődés 5,5. napjától [E5,5-]), az idegszövet kezdemény megjelenését megelőzően, izolálhatóak (nagyjából E7,5-ig). Ezek, a „primitív idegi őssejtek” (Hitoshi és mtsai, 2004), *in vitro*, az epiblasztban is expresszálódó markerek mellett (pl. *Sox2*, *FGF5*), a *Sox1* idegi markert is expresszálják, és idegsejtek, oligodendroglia és asztroglia sejtek létrehozására is képesek. Ezek a sejtek azonban, az epiblaszt és neurális markereken kívül a korai endoderma marker *GATA4-et* is expresszálják, tehát elköteleződésük neurális irányba nem teljes. A „primitív idegi őssejtek” fenntartásához *leukemia inhibitory factor (LIF)* jelenlétére van szükség. Ez a sejtpopuláció azonban hosszú távon nem tartható fenn *in vitro*, mert a „primitív idegi őssejtek” az osztódások során átalakulnak *fibroblaszt növekedési faktor 2 (FGF2)*-függő, „definitív idegi őssejteké”. Utóbbiak már teljes mértékben elkötelezettek idegi irányba. A fejlődő idegszövetben E8,5 körül jelennek az *FGF2* növekedési faktorra érzékeny idegi őssejtek, melyek *in vitro* aggregátum (ún. neurosphere) tenyészetekben *FGF2* jelenlétében fenntarthatóak (Tropepe és mtsai, 1999). „Primitív idegi őssejtekhez” hasonló tulajdonságokkal rendelkező sejtek ES sejtekből is differenciálhatóak, alacsony sejtszám, szérum-mentes, definiált körülmények és alacsony sejt denzitás mellett, *LIF* jelenlétében (Tropepe és mtsai, 2001).

A velőlemez stádiumú (E8,25) anterior idegrendszeri területekről *Sonic Hedgehog (Shh)* és a *Notch* jelátviteli útvonalat aktiváló *Delta-like 4 (Dll4)*, *Jagged (Jag)* fehérjék jelenlétében fenntartható idegi őssejtek izolálhatóak (Elkabetz és mtsai, 2008). Feltehetőleg ennek a progenitor stádiumnak feleltethetőek meg a humán és egér ES sejtekből egyaránt differenciálható, úgynevezett rozetta stádiumú idegi őssejtek (R-NSC) (Elkabetz és mtsai, 2008). A R-NSC sejtek rozetta morfológiájú sejt-csoportosulásokba tömörülve nőnek. Ezek a sejtek, a neuroepitélialis sejtekhez hasonlóan, apiko-bazális polarizáltságot mutatnak, és sejtmagjaik a sejtciklus során

interkinetikus magvándorlást végeznek. A radiális glia sejtekre jellemző *SI00β* fehérje nem expresszálódik az R-NSC sejtekben, és a szintén ES eredetű, radiális glia szerű $NSC^{FGF2/EGF}$ sejtek (lásd később) és az R-NSC sejtek génexpressziós mintázata is jelentős különbséget mutat. Az R-NSC sejtek érzékenyek a sejtek idegrendszeri régióinak megfelelő identitását meghatározó külső szignálokra, így számos idegsejt-típus képzésére, illetve központi és perifériás idegrendszeri (KIR ill. PIR) identitás kialakítására képesek. (Elkabetz és mtsai, 2008). Az R-NSC sejtek néhány passzázsra keresztül fenntarthatóak a *Shh* és *Notch* útvonalak aktiválása mellett. *EGF* (*epidermal growth factor – epidermális növekedési faktor*-) és *FGF2* növekedési faktorok hatására az R-NSC sejtek radiális glia szerű, $NSC^{FGF2/EGF}$ sejtekké (lásd később) alakulnak. Az idegszövetből, az anterior területekről, az embrionális fejlődés 9,5. napjáig izolálhatók *in vitro* R-NSC tulajdonságokat mutató neuroepitélialis sejtek.

2.2.2. Radiális glia sejtek *in vitro*

Az idegi őssejtek *in vitro* felszaporítására, fenntartására napjainkban leggyakrabban alkalmazott két módszer a neurosphere (Reynolds és Weiss, 1992) és NS (neural stem) (Conti és mtsai, 2005) technikák. Ezek során az idegszövet disszociálásával nyert sejteket olyan körülmények között tenyésztik, melyek az önsokszorozó progenitorok fennmaradásának kedveznek. Az ily módon felszaporított sejtpopulációk idegi őssejt komponense radiális glia sajátosságokkal rendelkezik (Conti és Cattaneo, 2010). A neurosphere tenyészetek esetében egy sejt eredetű (klonális), úszó aggregátumokban, az NS tenyészetek esetében aljzathoz tapadó (adherens), egy-sejtrétegű (monolayer) tenyészetekben tenyésztik az idegszövetből - vagy ES sejtek differenciálásából (Conti és mtsai, 2005)- származó sejteket, szérum mentes, definiált körülmények között, *EGF* és *FGF* növekedési faktorok jelenlétében. A neurosphere tenyészetek aggregátumai az idegi őssejt komponensen kívül ezek differenciáltabb utódait is tartalmazzák, és az így fenntartott idegi őssejtek idegsejt-képző kapacitásukat fokozatosan elvesztik (bizonyos számú osztódás során csupán glia sejtek képzésére képesek). Az adherens tenyésztési körülmények azonban alkalmasak a radiális glia tulajdonságokkal rendelkező, ideg- és glia sejteket egyaránt létrehozni képes, multipotens idegi őssejtek nagy tisztaságban, hosszútávon való fenntartására (Markó és mtsai publikálatlan eredmények; Conti, és Cattaneo, 2010).

A radiális glia sejtek áramlási citometriás módszerrel (FACS- Fluorescence-activated cell sorting) is izolálhatóak közvetlenül az idegszövetből. A riporter egértörzsekben a fluoreszcens *GFP* fehérje génjének expresszióját a radiális glia sejtekben jellemzően aktív promoterek (pl. a *blbp*, *glast*, *humán gliális fibrilláris savas fehérje* – *human glial fibrillary acidic protein /hgfap-*) hajtják meg (Malatesta és mtsai, 2000; Anthony és mtsai, 2004). A radiális glia sejtek a válogatás után a fent említett két módszer valamelyikével tarthatók fenn. Mivel a fent említett promóterek az asztroglia sejtekben is aktívak, a radiális glia sejtek csak az asztroglia sejtek születését megelőző stádiumokból szelektálhatóak ezzel a módszerrel.

Radiális glia sajátságokkal rendelkező sejtek ES sejtekből is differenciálhatóak, számos módszerrel (Pollard és Conti, 2007). Sőt, az ES sejtekből idegi differenciáltatás során kialakult, korábbi fejlődési stádiumot képviselő, ám csak rövidtávon fenntartható idegi őssejt populációk általában *EGF* és *FGF* függő radiális glia szerű populációkká alakulnak a tenyésztés során (Conti és Cattaneo, 2010).

A fentieket röviden az 1. Táblázat foglalja össze.

1. Táblázat: A különböző fejlődési stádiumokból származó idegi őssejtek *in vitro* sajátságai

	Származás	Jellemzők	Növekedési faktor igény	Fenntarthatóság
Primitív idegi őssejtek	epiblaszt ES differenciáció	epiblaszt markerek idegi markerek korai endoderma markerek	<i>LIF</i>	átmeneti populáció; <i>FGF2</i> függő őssejtek alakulnak fenntartás során
Korai, <i>FGF2</i> -függő idegi őssejtek	velőlemez	idegi irányban elkötelezett sejtek	<i>FGF2</i>	átmeneti populáció; radiális glia szerű, <i>EGF</i> és <i>FGF2</i> függő sejtek alakulnak fenntartás során
Rozetta stádiumú idegi őssejtek	velőlemez ES differenciáció	neuroepitéliális tulajdonságok radiális glia markerek hiánya	<i>Notch</i> aktiváció <i>Shh</i>	néhány passzázson keresztül fenntartható populáció; <i>EGF</i> és <i>FGF2</i> függő sejtek alakulnak
Radiális glia szerű idegi őssejtek	velőcső záródás utántól, embrionális és felnőtt idegszövet ES differenciáció	gliális markerek nestin pozitivitás	<i>EGF</i> <i>FGF2</i>	adherens körülmények között számos passzázson keresztül fenntartható populáció

Conti és Cattaneo, *Nat Rev Neurosci.*, **11(3):176-87.** (2010) nyomán

2.2.3. Köztes progenitorok *in vitro* vizsgálata

Mivel a köztes progenitorok korlátozott számú osztódás után ideg-, asztroglia vagy oligodendroglia sejtekké differenciálódnak, homogén köztes progenitor populációk hosszú távon nem tarthatóak fenn.

Köztes progenitor sejteknek az idegszövetből való szelektív kinyerésére példa az előagyi bazális progenitoroknak *TIS21*-pozitivitás alapján való szelektálása, riporter egértörzsből (a *TIS21* a bazális progenitorokra jellemző marker). Bizonyos kérgi radiális glia típusok és ES sejtek *in vitro* differenciációja során is megfigyelték köztes idegsejt képző progenitorok kialakulását (Conti és Cattaneo, 2010).

A különböző idegi őssejt fenotípusok *in vivo* csak átmenetileg vannak jelen, mivel az idegi fejlődés során maguk az őssejtek is fejlődésen mennek keresztül. A geno- és fenotipikusan stabil, homogén idegi őssejt populációk hosszú távú *in vitro* fenntartása ezért a stabil, definiált *in vitro* körülmények ellenére is nehézségekbe ütközik. Az idegi őssejtek felszaporításuk, fenntartásuk során változásokon mehetnek keresztül, illetve a tenyészetekben sokszor az idegi őssejtek differenciáltabb utódai is jelen vannak.

Annak, hogy fenotipusosan stabil, folyamatosan szimmetrikusan osztódó, progenitor vonalak létrehozása (Gottlieb és mtsai, 2002; Jandial és mtsai, 2008). Ilyen, immortalizált idegi őssejt klónok létrehozhatók például virális onkogénnel transzfektált (Jandial és mtsai, 2008) vagy tumor szupresszor deficiens idegi tenyészetekből (Schlett és Madarász, 1997).

2.3. Az idegsejt képzés folyamata

Az idegi fejlődés során, a velőcső záródásával egy időben megjelennek az első idegsejtek. Az idegsejtek keletkezése döntő többségében lejátszódik az embrionális és perinatális fejlődés során. Egyes munkák szerint a központi idegrendszer idegsejtjeinek nagy része közvetlenül, vagy köztes progenitorokon keresztül, közvetve, a radiális glia sejtektől származik (Anthony és mtsai, 2004; Anthony és Heintz, 2008). Más kutatócsoportok arra következtetnek eredményeikből, hogy bizonyos KIR területeken (pl. ventrális előagy, dorzális gerincvelő) a radiális glia sejtek csupán gliasejtek létrehozására képesek, és a neuronok közvetlenül vagy köztes progenitorokon keresztül

a neuroepitéliális sejtektől származnak (Pinto és Götz, 2007). Ezt az ellentmondást többek között az okozhatja, hogy a neuroepitéliális és radiális glia sejt stádium közötti határ nem mindig határozható meg egyértelműen (Anthony és Heintz, 2008).

A kifejlett KIR-t számos idegsejt típus alkotja. A különböző idegsejt-típusokat, a fejlődés során, idegrendszeri rézionként és időben változó differenciációs programok alakítják ki. Ezeknek a differenciációs programoknak van azonban egy, az általános idegsejt tulajdonságokat (*pán neuronális* tulajdonságok) meghatározó, alapmechanizmusa (*pán neurogenetikus* program) (Goridis és Rohrer, 2002; Parras és mtsai, 2002; Pattyn és mtsai, 2004; Kageyama és mtsai, 2005).

A fejlődés kezdetén szimmetrikusan osztódó idegi progenitorokban, az idegsejt képzés kezdetével, megjelennek az aszimmetrikus osztódások. Ezek során a két leánysejt közül az egyik megtartja idegi őssejt tulajdonságait, míg a másik posztmitotikus idegsejtté vagy idegsejt irányban elkötelezett, korlátozott osztódó képességű köztes progenitorra differenciálódik. Ahhoz, hogy az adott utódsejt idegsejt irányban fejlődjön, aktiválódniuk kell az idegsejt tulajdonságokat meghatározó géneknek, és gátlódniuk kell a differenciálatlan állapotot fenntartó, az idegsejt irányú differenciációt gátló, illetve a glia irányú differenciációért felelős mechanizmusoknak.

Az idegsejt irányú differenciáció szabályozásában központi szerepet játszanak a *basic Helix-loop-helix (bHLH)* transzkripciós faktorok. Az idegsejt irányba elköteleződő utódsejtben aktiválódik a proneurális *bHLH* transzkripciós faktorok (pl. a *Drosophila achaete-scute* homológ *mash1* vagy az *athonal*-homológ *ngn1* és *ngn2*) expressziója. A proneurális transzkripciós faktorok (többek között) egyéb *bHLH* transzkripciós faktorok (pl. *NeuroD*, *Math2*) expresszióját serkentik, melyek szerepet játszanak az általános idegsejt tulajdonságokat meghatározó gének expressziójának serkentésében (Kageyama és Nakanishi, 1997; Ross és mtsai, 2003). A *bHLH* transzkripciós faktorok ezzel párhuzamosan, szerepet játszanak a differenciálatlan állapotot fenntartó, az idegsejt irányú differenciációt gátló, mechanizmusok feloldásában is (Bylund és mtsai, 2003; Ravanpay és mtsai, 2010). A *NeuroD2* transzkripciós faktor például, gátolja az idegsejt-specifikus gének expresszióját megakadályozó *REST (RE1-silencing transcription factor)* zinc finger (cink ujj) transzkripciós faktor kifejeződését (Ravanpay és mtsai, 2010). A *REST* expressziójának

gátlása ezen kívül, közvetve, változást okoz bizonyos kromatin struktúrát szabályozó komplexek összetételében. Az ennek következtében létrejövő epigenetikai módosítások nélkülözhetetlenek a sejciklusból való kilépéshez, az idegsejt irányú elköteleződéshez és az idegsejtek posztmitotikus fejlődéséhez.

A *bHLH* gének expressziója regionális mintázatot mutat, tehát az idegrendszer különböző területein elhelyezkedő progenitorokra / idegsejtekre más-más *bHLH* transzkripciós faktorok jellemzőek. Bár a *bHLH* transzkripciós faktorok sokfélesége önmagában nem elegendő az idegsejtek sokféleségének kialakulásához, a *bHLH* fehérjék sok esetben részt vesznek az általános idegsejt tulajdonságok meghatározásán kívül az idegsejt típusát meghatározó szabályozó folyamatokban is (Kageyama és mtsai, 2005; Mattar és mtsai, 2008).

Az idegsejt képzés általános programjának szabályozása szorosan összekapcsolódik a differenciálatlan idegi őssejt fenotípus fennmaradását (pl. *Delta-Notch* útvonal), és az idegi őssejtek makroglia irányú differenciációját szabályozó mechanizmusokkal (Ross és mtsai, 2003; Yoon és mtsai, 2008). Ez biztosítja az idegsejt irányú differenciációval párhuzamosan a megfelelő méretű progenitor populáció fennmaradását, és a különböző idegi sejtípusok megfelelő időrendben és megfelelő arányban való keletkezését.

2.4. Az idegsejt képzésről asztroglia képzésre való váltás folyamata

Míg az idegsejtképzés rágszalókban döntő mértékben lejátsszódik az embrionális és perinatális fejlődés során, az asztroglia sejtek képzése a velőcső teljes hosszában csak ezt követően, a perinatális (nagyjából az embrionális fejlődés 18. napjától kezdődően) és posztnatális időszakokban történik meg (3. Ábra). Hasonlóan, egy adott progenitor populáción belül az oligodendroglia képzés is csak az idegsejtek kialakulását követően indul meg. Az a jelenség, hogy az idegsejtek képződése megelőzi a makroglia (asztroglia és oligodendroglia) sejtek képződését, az *in vitro* idegi differenciáció során is megfigyelhető (Qian és mtsai, 2000).

Az irodalmi adatok nem egységesek abban a tekintetben, hogy az asztroglia sejteket képző progenitorok leszármazási kapcsolatban állnak-e azokkal az idegi progenitorokkal, melyek a fejlődés korábbi stádiumaiban az idegsejtek képzésében

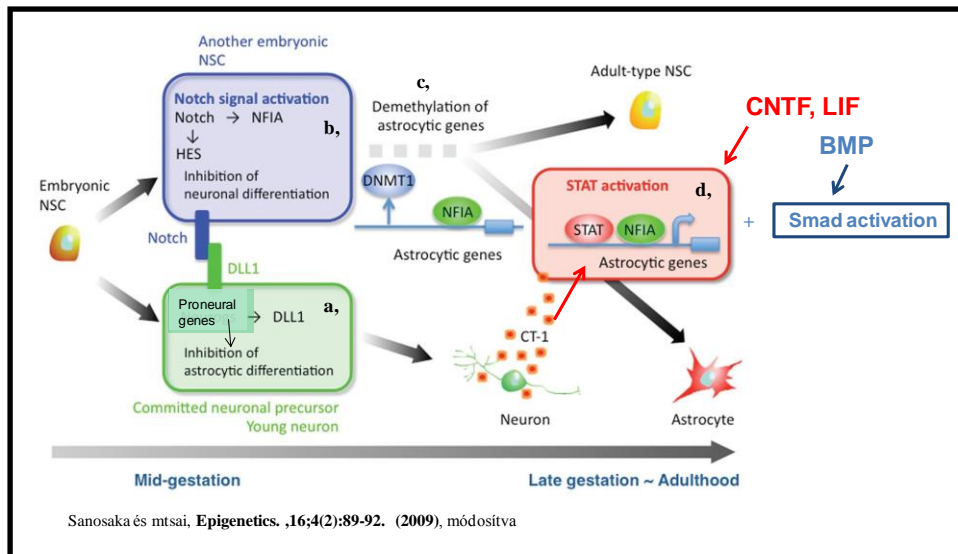
vesznek részt. Egyes munkák szerint már a korai neuroepitélben elkülönülnek az idegi fejlődés során idegsejtet vagy asztroglia sejtet létrehozó progenitorok, és csak kis részük hozza létre mindkét sejttípust (McCarthy és mtsai 2001; Malatesta és mtsai, 2000, 2003). Más vélemények szerint azonban, az asztroglia sejteket képző radiális glia populációk az idegsejteket képző radiális glia sejtektől származtathatóak (Anthony és mtsai, 2004; Anthony és Heintz, 2008).

Azonban, bármelyik esetet vegyük, felmerül a kérdés, milyen mechanizmusok állnak annak a hátterében, hogy az asztroglia képzés csak az idegsejt képzés után, késleltetve kezdődik el az idegi fejlődés során. Azaz: Az első esetben milyen hatások okozzák a gliális progenitorok korai elkülönülését? Ha az asztroglia irányba elkötelezett progenitorok már az idegsejt képzés idején is jelen vannak, miért csak ennek befejeztével hoznak létre gliasejteket? Illetve, a második esetben, ha az idegi őssejtek idegsejtek és asztroglia sejtek létrehozására egyaránt képesek, miért képeznek kezdetben szinte kizárólag idegsejteket, és csak ezt követően asztroglia sejteket?

Az „idegsejt képzés majd asztroglia képzés” sorrend kialakulására az egyik lehetséges magyarázat az lenne, ha az asztroglia képződést serkentő faktorok hiányoznának a fejlődő idegszövetből az idegsejt képzés szakaszában. Az asztroglia képzést serkentő faktorok közül azonban számos már az idegsejt képzés idején is jelen van az idegi progenitorok környezetében. Ilyen faktorok a *ciliary neurotrophic factor (CNTF)* (Hughes és mtsai 1988; Bonni és mtsai 1997), a *leukemia inhibitory factor (LIF)* (Viti és mtsai, 2003; Fukuda és mtsai, 2007) és a *bone morphogenic protein (BMP)* (Gross és mtsai, 1996; Rajan és McKay 1998; Fukuda és mtsai 2007).

A gliagenezist serkentő faktorok jelenléte azonban önmagában nem elegendő. Fontos az is, hogy az idegi progenitorok érzékenyek legyenek ezekre a faktorokra. Az asztroglia specifikus gének (*pl. gfap, s100β*) promoter régiói metiláltak az idegsejt képzés korai szakaszaiban, így transzkripciójuk, a gliagenezist serkentő szignalizációs útvonalak működésének ellenére, gátolt (Namihira és mtsai, 2009). Az idegsejtképzés későbbi periódusában, a növekvő számú fiatal neuron *Notch* receptor ligandumokat fejez ki, amelyek az elkötelezetlen progenitorokon jelen levő *Notch* receptorokhoz kötődve, azokban az asztroglia sejtekre jellemző gének promoter régióinak demetilálódását okozzák (Namihira és mtsai, 2009). Így, az idegsejt képzés

előrehaladásával párhuzamosan, az idegi progenitorok érzékenyebbé válnak az asztrogliára képzést indukáló szignálokra (4. Ábra).



4. Ábra: Az asztrogliára irányuló differenciációt szabályozó folyamatok. Az idegi differenciáció kezdeti szakaszaiban az asztrogliára specifikus gének promóter régiói metiláltak. (a): Az idegsejt irányba elköteleződő prekurzorokban a megnövekedett proneurális transzkripciós faktor szint, az idegsejt irányú fejlődési program elindításával párhuzamosan, az adott sejten belül gátolja az asztrogliára irányuló differenciációt. A proneurális transzkripciós faktorok hatására, az idegsejt prekurzorok felszínén megemelkedik a *Notch* receptor ligandok (*DLL1*) mennyisége. (b): A *DLL1* ligandok a szomszédos progenitorok *Notch* receptorait aktiválva, azok differenciálatlan állapotának fennmaradását segítik, illetve ezzel párhuzamosan, az asztrogliára specifikus gének promótereinek demetilációját okozzák (Az *NFIA* transzkripciós faktor aktiválásán keresztül, mely a *DNMT1* disszociációját okozza) (c). (d): Az idegsejtek képzés előrehaladtával tehát, az asztrogliára specifikus szabályozó szakaszok hozzáférhetővé válnak az asztrogliára képzést serkentő jelátviteli útvonalak effektorainak számára. A *LIF*, *CNTF* és (az idegsejtek által termelt) *CT-1* faktorok által aktivált JAK/STAT útvonal (az ábrán *STAT* aktiváció) a *BMP* fehérjék által aktivált *Smad* jelátviteli útvonallal együttműködve indukálja az asztrogliára sejtek képződését.

Rövidítések: *BMP*: bone morphogenic protein, *CNTF*: ciliary neurotrophic factor, *CT-1*: cardiotrophin-1, *DLL1*: delta-like 1, *DNMT1*: DNA methyltransferase 1 –DNS metiltranszferáz 1-, *HES*: hairy and enhancer of split, *LIF*: leukemia inhibitory factor, *NFIA*: nuclear factor I/A, *NSC*:neural stem cell –idegi őssejt-, *STAT*: signal transducer and activator of transcription

Angol kifejezések: *adult-type NSC*: felnőttkori idegi őssejt, *another embryonic NSC*: másik embrionális őssejt, *astrocytic genes*: asztrogliára gének, *committed neuronal precursor*: elkötelezett idegsejt előalak, *demethylation of astrocytic genes*: az asztrogliára gének demetilációja, *inhibition of neuronal differentiation*: az idegsejt irányú differenciáció gátlása, *inhibition of astrocytic differentiation*: az asztrogliára irányú differenciáció gátlása, *late gestation ~ adulthood*: késői embrionális fejlődés ~ felnőttkor, *mid-gestation*: az embrionális fejlődés középidéje, *young neuron*: fiatal idegsejt

Az idegsejt képzés majd asztroglia képzés sorrendiségének kialakulásában szerepet játszhatnak az asztroglia képzést az idegsejt képzés időszakában gátló faktorok is. Az idegsejt képzés programjában fontos szerepet játszó proneurális fehérjék (*Ngn1*, *Ngn2*, *Mash1*) például, egyidejűleg az asztroglia irányú differenciációt is gátolják, az asztroglia irányú differenciációt serkentő szignalizációs útvonalak gátlásán keresztül (Sun és mtsai, 2001). Nem elég tehát, hogy a progenitorok fogékonyvá váljanak az asztroglia képzést serkentő szignálokra, az idegsejt képzést serkentő szabályozó útvonalaknak is el kell hallgatniuk. A dorzális előagyi területeken, az idegsejt képzés előrehaladtával a *ngn1* gén promotere fokozatosan metilálódik a *Polycomb* kromatin módosító komplexek által. Ezáltal, gátlódnak az idegsejt képző, és előtérbe kerülnek az asztroglia képző folyamatok (Hirabayashi és mtsai, 2009). Hogy mi az, ami ezeket a metilációs folyamatokat időzíti, egyelőre nem ismert.

Bizonyos idegrendszeri területeken azonosítottak olyan, úgynevezett „pro-gliális” faktorokat, melyek expressziója szükséges és elégséges a gliogenetikus program elindulásához. Ilyen faktor például a *Sox9* homeodomén transzkripció faktor (Rowitch és Kriegstein, 2010).

Bár az asztroglia képzést szabályozó folyamatok számos eleme ismert, az idegsejt képzés és asztroglia képzés közötti váltás időzítésének pontos mechanizmusa még nem feltérképezett. A megértést nehezíti többek között az is, hogy ugyanúgy, ahogy az idegsejtek kialakulását szabályozó mechanizmusok esetében, az általános szabályozó folyamatok itt is szorosan összefonódnak a - progenitorok idegrendszeri tengelyek mentén való elhelyezkedésének megfelelő - régió specifikus szabályozó folyamatokkal (Rowitch és Kriegstein, 2010).

2.5. A fejlődő központi idegrendszer regionalizációja

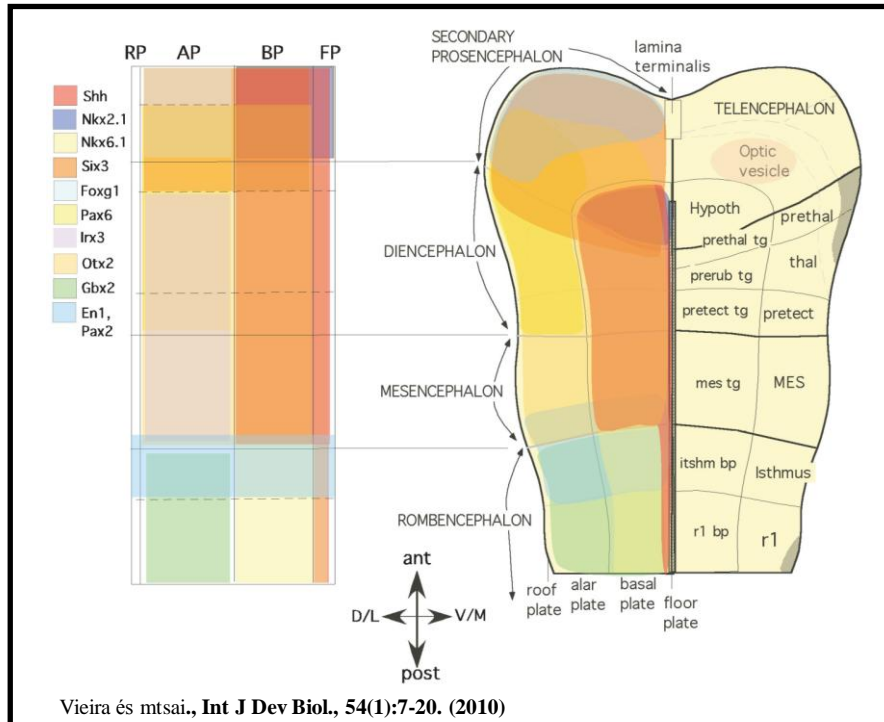
A központi idegrendszer kezdeményét kezdetben egy morfológiailag homogén sejtpopuláció építi fel. A fejlődés előrehaladtával azonban, a környező szövetekből, majd az idegszövet belső regionalizáló központjaiból származó szekretált morfogének hatására, az idegi progenitorokban az antero-poszterior (AP) illetve medio-laterális/dorzo-ventrális (ML/DV) testtengelyek mentén különböző fejlődési ”programok”

aktiválódnak. Ennek következtében, az idegi progenitorok többek között régióként eltérő proliferációs, adhéziós tulajdonságokkal rendelkeznek és területenként különböző utódsejteket hoznak létre.

2.5.1. A velőlemez és a korai velőcső regionalizációja

Az idegszövet regionalizációja már a velőlemez kialakulásával egy időben elkezdődik. Az idegtelep anterior pólusán elhelyezkedő anterior viszcerális endoderma (AVE) és az idegrendszer kezdeményt poszterior határoló mezodermális szövetek (primitív árok, nodus) által termelt morfogének, a környező nem-neurális ektoderma, majd a gasztruláció során kialakult axiális mezoderma (prekorda, notokord) által termelt faktorok meghatározzák a velőlemez majd a velőcső AP és ML/DV tengelyeit (Vieira és mtsai, 2010) (1. Ábra). A velőcső kialakulásával a velőlemez ML tengelye dorzoventrális (DV) tengellyé alakul. A velőlemez legmediálisabb területei képzik a velőcső legventrálisabb részét, míg a laterális velőlemez területek a velőcső dorzális területére kerülnek (1. Ábra).

A környező szövetek által termelt morfogének az idegszöveten belül gradienst hoznak létre, és az AP és ML/DV tengelyek mentén különböző pozícióban elhelyezkedő neuroepiteliális sejtekben, koncentrációtól függően, különböző gén-együttesek expresszióját indukálják, illetve gátolják (Vieira és mtsai, 2010). Ezek közül, az idegrendszeri régiók meghatározásában, kialakulásában kiemelkedő szerepet játszanak a homeodomén transzkripciós faktorok (Lumsden és Krumlauf, 1996). Ebbe a csoportba tartoznak többek között a *Drosophila* homeotikus szelektor génekkel homológ *Hox* transzkripciós faktorok is (Stein és mtsai, 1996). Az egyes morfogének által aktivált jelátviteli utak, illetve az általuk szabályozott transzkripciós faktorok egymással kölcsönhatva bonyolult szabályozási hálózatokat hoznak létre. Ezeknek a kölcsönhatásoknak eredményeképpen, az idegrendszer kezdemény longitudinális és transzverzális sávokra tagolódik, melyek mindegyike egyedi, régió-specifikus génexpressziós profillal rendelkezik (5. Ábra) (Puelles és Rubenstein, 2003; Vieira és mtsai, 2010).



5. Ábra: Génexpressziós domének a korai idegrendszer kezdemény területén. Sematikus (A) és realiztikus (B) ábrázolás. Az expressziós domének különböző színekkel vannak jelölve. A B ábra jobb oldalán az adott doménből a későbbiekben kialakuló idegrendszeri régiók vannak feltüntetve.

Rövidítések: ant: anterior, AP: Alar plate –oldallemez-, BP: basal plate –alaplemez-, D/L: dorzális/laterális FP: floor plate –padlólemez, hypoth: hypothalamus, MES: mesencephalon, mes tg: mesencephalic tegmentum, post: posterior, prerub tg: prerubral tegmentum, pretect: pretectum, prethal: prethalamus, prethal tg: prethalamus tegmentum, r1: 1. romboméra, RP: roof plate –tetőlemez-, thal: thalamus, V/M: ventrális/mediális, Irx3: iroquois homeobox 3, Six3: SIX homeobox 3 (A többi génszimbólumot lásd a Rövidítések fejezetben, ill. a szövegben)

Angol kifejezések: secondary prosencephalon: másodlagos prosencephalon, optic vesicle: optikus vezikula

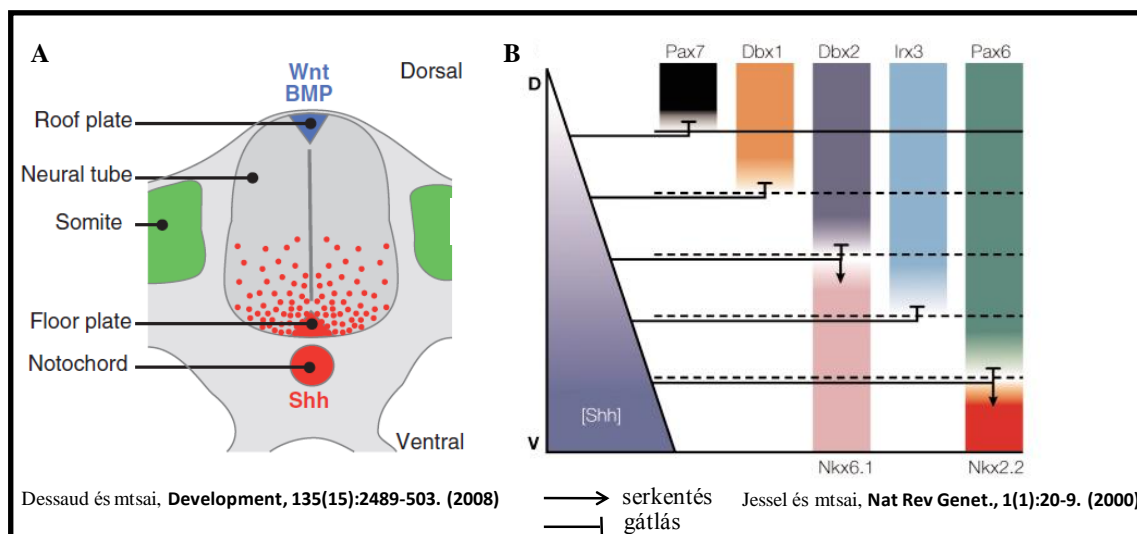
Az agy-primordium területén elsődlegesen három agyhólyag alakul ki. Ezek a prosencephalon (a leendő elő- és köztiagy), a mesencephalon (leendő középagy) és a rhombencephalon (leendő utóagy). Az agy-primordium ezután további transzverzális doménekre, neuromérákra tagolódik. A prosencephalon neuromérái a prozomérák, az utóagy területén kialakuló neuromérák a rombomérák. Az utóagyat általánosan 8, morfológiai és génexpressziós szinten egyaránt meghatározható, rombomérára osztják (r1-r8). A középagy és a prosencephalon transzverzális doménekre való osztása azonban, egyértelmű morfológiai határok hiányában, nem egységes az irodalomban. (Lumsden és Krumlauf, 1996; Puelles és Rubenstein, 2003; Kimura és mtsai, 2005).

A központi idegrendszer transzverzális doménjei négy DV (longitudinális) zónára oszthatók. Ezek a dorzálisról a ventrális oldal felé haladva a tetőlemez (roof plate), az oldallemez (alar plate), az alaplemez (basal plate) és a padló lemez (floor plate) (1. Ábra, 5. Ábra) (Vieira és mtsai, 2010).

2.5.2. A medio-laterális / dorzo-ventrális regionalizáció

Az idegrendszer telepének korai ML (majd DV) regionalizációját kialakító morfogének két fő forrásból származnak (Vieira és mtsai, 2010). Az idegrendszer telepétől ventrálisan, az embrió középvonalában helyezkedik el az axiális mezoderma (a prekorda a leendő előagyi és a prethalamikus területek alatt, a notokord az ettől poszterior elhelyezkedő területek alatt). A velőlemez laterálisan (majd a velőcsövet dorzálisan) a nem-neurális ektoderma határolja. Az axiális mezoderma által termelt *Sonic Hedgehog (Shh)* mediális / ventrális, míg a nem-neurális ektoderma által termelt *BMP* fehérjék laterális / dorzális pozicionális információt közvetítenek (Vieira és mtsai, 2010) (1. Ábra).

A fejlődés későbbi szakaszaiban az axiális mezoderma illetve a nem neurális ektoderma indukáló hatására az említett szövetekhez leközelebb elhelyezkedő idegrendszeri területek maguk is elkezdenek morfogéneket termelni. A mediális / ventrális középvonal *Shh*, míg a legdorzálisabb területek *BMP* és *wingless-related MMTV integration site (Wnt)* faktorokat termelnek (Vieira és mtsai, 2010; Chizhikov és Millen, 2005). Az így kialakuló „másodlagos organizátor központok” átveszik az axiális mezoderma illetve a nem-neurális ektoderma regionalizáló szerepét.

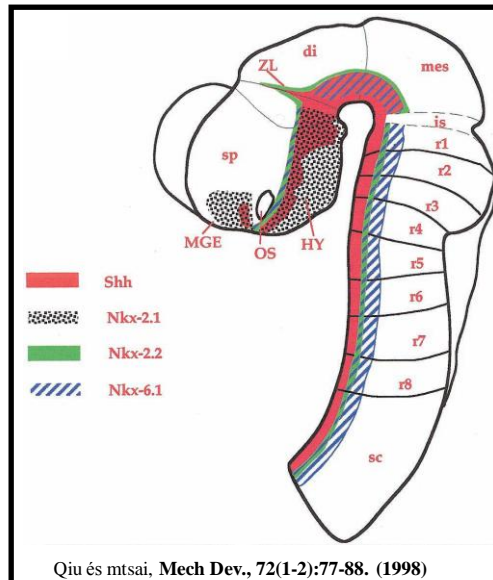


6. Ábra: A *Shh* koncentráció-függő hatása a génexpresszióra a gerincvelő területén. (A): A *Shh*-t a notokord, majd a padlólemez termeli. A DV tengely mentén dorzális irányba csökkenő *Shh* grádiens alakul ki. A tetőlemez területén a dorzális területek regionalizációjában szerepet játszó *Wnt* és *BMP* fehérjék termelődnek, melyek a *Shh*-ével ellentétes grádiens képeznek. **(B):** A *Shh* koncentráció függően különböző transzkripciós faktorok expresszióját indukálja, illetve gátolja a progenitorokban.

Rövidítések: *BMP*: bone morphogenic protein, *D*: dorzális, *Shh*: Sonic hedgehog, *V*: ventrális, *Wnt*: wingless-related MMTV integration site, *Dbx*: developing brain homeobox (A többi génszimbólumot lásd a rövidítés fejezetben, ill. a szövegben)

Angol kifejezések: dorsal: dorzális, floor plate: padlólemez, neural tube: velőcső, roof plate: tetőlemez, somite: szomita, ventral: ventrális

A *Shh* által indukált jelátviteli útvonalak a ventrális fenotípust meghatározó transzkripciós faktorok (régió specifikus gének) expresszióját serkentik, illetve, a dorzális fenotípust meghatározó transzkripciós faktorok kifejeződését gátolják. Az, hogy egy adott idegi progenitorban milyen gének transzkripcióját szabályozza a *Shh* szignalizáció, függ attól, hogy a *Shh* milyen koncentrációban van jelen a sejt környezetében (azaz a sejt a ML ill. DV tengely mentén a *Shh* forrástól milyen távolságban helyezkedik el) (6. Ábra), illetve attól, hogy az adott sejt az AP tengely mentén hol, azaz melyik transzverzális domén területén helyezkedik el (Ericson és mtsai, 1995; Dessaud és mtsai, 2008). Az *NK2 homeobox 2.2* (*Nkx2.2*) homeodomén transzkripciós faktor például, az idegrendszer teljes hosszában indukálódik a *Shh* hatására a ventrális területeken, míg az *Nkx2.1* és *Nkx6.1* transzkripciós faktorok, melyek expressziójához szintén *Shh* hatásra van szükség, csak a ventrális előagyi (*Nkx2.2*) illetve ventrális utóagyi, gerincvelői területeken (*Nkx6.1*) expresszálódnak (Qiu és mtsai, 1998) (7. Ábra).



7. Ábra: A *Shh* más és más gének expresszióját indukálja a különböző transzverzális doménekből. Az *Nkx-2.1*, *Nkx-2.2* és *Nkx-6.1* homeodomén transzkripciós faktorok, bár mindegyikük expressziója *Shh* által indukált, az AP tengely mentén eltérő expressziós mintázatot mutatnak. (3 napos csirke embrió –az expressziós mintázat megegyezik az egér velőcsőben megfigyelttel-)

Rövidítések: *di*: diencephalon, *hy*: hypothalamus, *is*: Isthmus, *Mes*: mesencephalon, *MGE*: medial ganglionic eminence -mediális gangliondomb-, *Nkx*: NK2 homeobox, *OS*: optic stalk –optikus kocsány-, *r*: romboméra, *sc*: spinal cord, *Shh*: sonic hedgehog, *sp*: secondary prosencephalon –másodlagos prosencephalon-, *ZL*: zona limitans intrathalamica

A laterális / dorzális identitást meghatározó morfogének (*BMP*, *Wnt* fehérjék) szintén koncentráció illetve AP pozíció függően fejtik ki hatásukat (Chizikov és Millen, 2005). Ezek a szekretált faktorok az adott dorzális idegrendszeri régiókra specifikus gének expresszióját serkentik, illetve a ventrális sorsot meghatározó géneket gátolják.

2.5.3. Az antero-poszterior regionalizáció

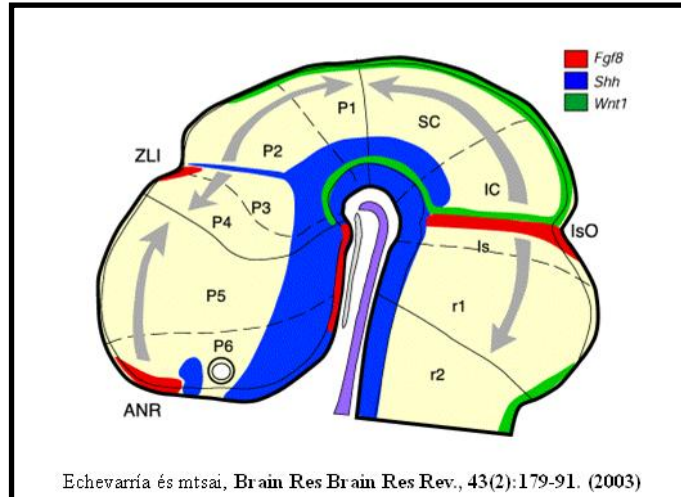
A központi idegrendszer kezdeményének AP regionalizációját kezdetben, szintén a környező nem neurális szövetekből származó szignálok irányítják. A neurális indukció során kialakuló idegtelep kezdetben anterior molekuláris identitással rendelkezik. Az anterior identitás kialakításában központi szerepet játszik az AVE és a korai gasztrula organizátor (Martinez-Barbera és Beddington, 2001). A primitív árokból majd a paraxiális mezodermből származó szignálok (például *FGF2*, retinsav) felelősek később a poszterior területek regionális identitásának meghatározásáért. (Jessel, 2000; Vieira és

mtsai, 2010). Az utóagy (r2-r7) és a gerincvelő transzverzális doménekre való tagolódásában jelentős szerepet játszanak a *Hox* gének. A különböző *Hox* gének valószínűleg a mezodermből (mely maga is *Hox* gének által regionalizált) származó retinsav hatására indukálódnak az idegszövet meghatározott területein (Lloret-Vilaspa és mtsai, 2010). A prekordális mezodermből származó szignálok az anterior területek regionális tulajdonságainak fenntartásában illetve további finomításában játszanak szerepet.

A kezdeti regionalizációs folyamatok következtében, többnyire az AP tengely azon pontjainál, ahol az egymás expresszióját gátló transzkripciós faktorok expressziós doménjei találkoznak, az idegszöveten belül újabb regionalizációs központok alakulnak ki, melyek tovább finomítják a környező progenitor sejtek regionális identitását (Vieira és mtsai, 2010). Ezek az AP regionalizációban szerepet játszó úgynevezett „másodlagos organizátor központok”, a fejlődő központi idegrendszer legrosztrálisabb pólusán elhelyezkedő elülső idegi szegély (ANR – anterior neural ridge), a thalamus-prethalamus határon kialakuló zona limitans intrathalamica (ZLI), és a középagy-utóagy határon húzódó isthmus organizátor (IsO) (8. Ábra).

Az ANR sejtszöveti *FGF8* fehérjét szekretálnak, mely egy anteriortól poszterior irányba csökkenő grádiens hoz létre a környező régiókban. Az *FGF8* a szintén az ANR területén termelődő *FGF15* szekretált fehérjével, és a környező, egyéb organizátor területekről származó *BMP*, *Wnt* és *Shh* morfogénekkal együttműködve szabályozza az előagyi területek regionalizációját (Vieira és mtsai, 2010).

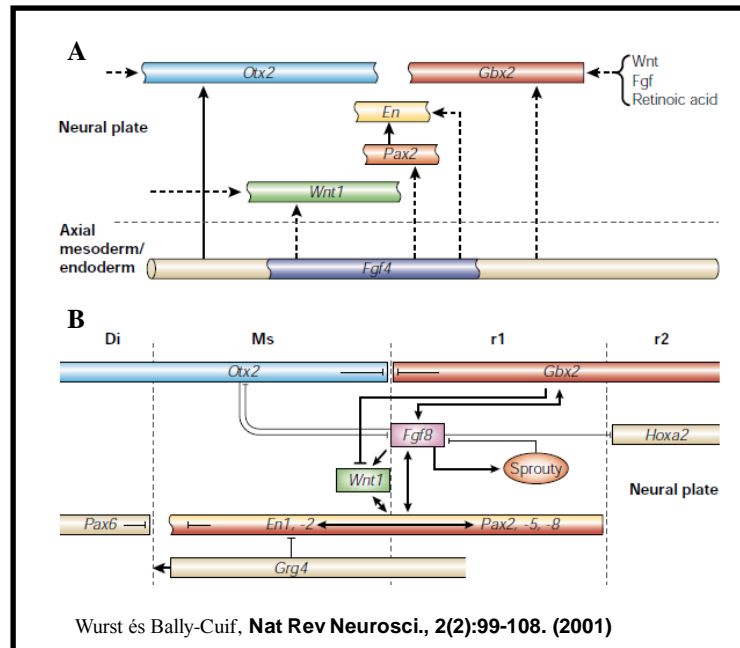
A ZLI a prekorda illetve a notokord szabályozása alatt álló területek találkozásánál jön létre. Az itt elhelyezkedő progenitorokban olyan génexpressziós mintázat alakul ki, mely lehetővé teszi a *Shh* termelődését az egész DV tengely mentén (8. Ábra). A ZLI-ből származó *Shh* a környező területekről származó, egyéb morfogénekkal együttműködve, eltérő génexpressziós mintázatot alakít ki a ZLI-tól rosztrálisan illetve kaudálisan elhelyezkedő progenitor populációkban. Míg bizonyos transzkripciós faktorok (pl. a homeodomén transzkripciós faktor *Nkx2.2*) a ZLI mindkét oldalán expresszálódnak, a *Gbx2* homeodomén transzkripciós faktor például csak a ZLI-tól kaudálisan, míg a *distal-less homeobox 2* (*Dlx2*) és *Nkx2.1* homeodomén transzkripciós faktorok csak a ZLI-tól rosztrálisan fejeződnek ki (Vieira és mtsai, 2010).



8. Ábra: A másodlagos organizátor központok elhelyezkedése. Az ANR (anterior neural ridge) a velőcső legrostrálisabb pólusán, a ZLI (zona limitans intrathalamica) a prethalamus (p3)-thalamus (p2) határon, az IsO (Isthmus organizátor) a középagy-utóagy határon helyezkedik el. A másodlagos organizátorok területén elhelyezkedő sejtek morfogéneket termelnek, melyek az idegszövetben diffundálva (szürke nyilak), grádienszt hoznak létre.

Ventrálisan lila illetve fehér színnel jelölve a notokord illetve prekorda látható. Rövidítések: *FGF8*: fibroblast growth factor 8, *IC*: colliculus inferior, *Is*: Isthmus, *p1-p4*: prozomérák (kötiagy), *p5-p6* (előagy) *r1-r2*: rombomérák, *Shh*: sonic hedgehog, *SC*: colliculus superior, *Wnt1*: wingless-related MMTV integration site 1

Az Isthmus organizátor a középagy és utóagy kezdemény határán, az egymás expresszióját gátló *gastrulation brain homeobox 2 (Gbx2)* és *orthodenticle homologue 2 (Otx2)* homeodomén transzkripciós faktorok expressziós doménjének találkozásánál alakul ki (9. Ábra) (Wurst és Bally-Cuif, 2001). Ezen a génexpressziós határon indukálódik az Isthmus organizátor aktivitásában meghatározó szerepet játszó *FGF8* expressziója. Az Isthmus organizátor aktivitásának fenntartásában fontos szerepet játszanak az Isthmus területén expresszálódó (bár az Isthmus területénél szélesebb expressziós doménnal rendelkező) *paired box 2* illetve *5 (Pax2, Pax5)*, *engrailed homeobox 1 (En1)* homeodomén transzkripciós faktorok és a *Wnt1* morfogén (Wurst és Bally-Cuif, 2001; Vieira és mtsai, 2010) (9. Ábra).



9. Ábra: Az Isthmus organizátor kialakulását, fenntartását szabályozó folyamatok. (A): A környező szövetekből érkező morfogének (szaggatott nyíl) hatására az idegrendszer különböző területein különböző transzkripciós faktorok expressziója indukálódik. **(B):** A régió specifikusan expresszálandó transzkripciós faktorok közötti gátló, ill. serkentő kölcsönhatások következtében a fő expressziós domének találkozásánál kialakulnak a morfogéneket szekretáló Isthmus organizátor sejtek. Ezután, az Isthmus területén illetve két oldalán kifejeződő szabályozó gének közötti kölcsönhatások (folyamatos vonalak) szükségesek az Isthmus organizátor fennmaradásáért is.

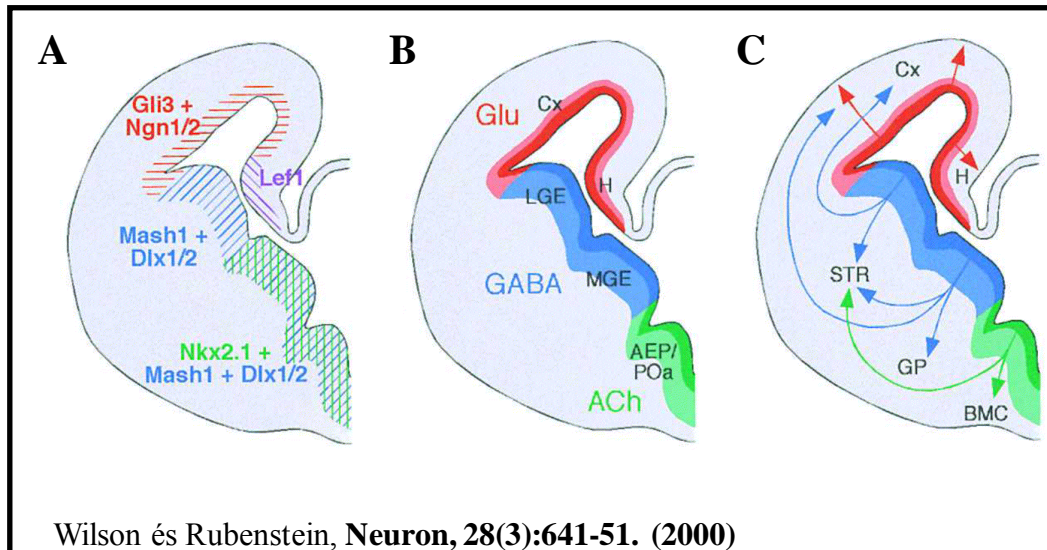
Rövidítések: di: diencephalon, ms: mesencephalon, r1-r2: rombomérák Az ábrán szereplő gének, morfogének teljes nevét lásd a Rövidítések fejezetben, illetve a Bevezetés szövegében.

Angol kifejezések: axial mesoderm/ endoderm: axiális mezoderma/ endoderma, neural plate: velőlemez, retinoic acid: retinsav

A fejlődő KIR főbb területekre való tagolódását követően, a transzverzális és longitudinális génexpressziós domének által alkotott molekuláris háló a sorozatos génexpressziós kölcsönhatások eredményeképpen egyre finomabbá válik, és ennek következtében az idegrendszeri régiók egyre kisebb régiókra tagolódnak. A különböző idegrendszeri területek regionális identitása nagyrészt még a tömeges idegsejt képzés időszaka előtt meghatározódik (Vieira és mtsai, 2010).

Az idegi progenitorok régió specifikus génexpressziós mintázata a posztmitotikus idegsejtekben az adott régióra jellemző idegsejt-fenotípust meghatározó szabályozó kaszkádokban folytatódik (Goridis és Rohrer, 2002; Schuurmans és mtsai, 2004). Az idegsejtek születési helye (és ideje) nagyban befolyásolja többek között a

posztmitotikus idegsejt előalakok migrációs kapacitását, adhéziós tulajdonságait és az idegsejtek neurotranszmitter fenotípusát (Wilson és Rubenstein, 2000) (10. Ábra).



10. Ábra: Az idegsejtek születésének helye meghatározza azok fenotípusát. Az ábrán 14 napos egér embrió előagyi féltekéjének sematikus képe (keresztmetszet) látható. (A): Az előagy ventrikuláris zónájában elhelyezkedő idegi progenitorok a dorzoventrális testtengely mentén való elhelyezkedésüknek megfelelő génexpressziós-mintázattal rendelkeznek. A progenitorokban kifejeződő régió specifikus transzkripciós faktorok meghatározzák a posztmitotikus utódok neurotranszmitter fenotípusát (B), és migrációs mintázatát (C). Az előagy kéreg glutamaterg neuronjai a dorzális előagy területén születnek, majd a radiális glia nyúlványok által irányított radiális migráció (egyenes nyilak) során kerülnek a későbbi kéreg területére. A kérgi GABA-erg interneuronok a ventrális előagyi területekről származnak. A mediális gangliondomb (MGE) és a laterális gangliondomb (LGE) területén túlnyomórészt GABA-erg idegsejtek keletkeznek, melyek egy része a kéreg területére (tangenciális migráció, görbe nyilak) és a striátumba vándorol. Az előagy legventrálisabb területein (anterior entopedunkuláris área/preoptikus área) jellemzően kolinerg neuronok keletkeznek, melyek egy része a striatum területére vándorol.

Rövidítések: ACh: acetilkolin, AEP: anterior entopedunkuláris área, BMC: bazális magnocelluláris komplex, Cx: cortex, GABA: γ -amino-vajsav, Glu: glutamát, GP: globus pallidus, H: hippocampus, LGE: lateral ganglionic eminence -laterális gangliondomb-; MGE: medial ganglionic eminence -mediális gangliondomb-; POA: anterior preoptikus área; STR: striatum

Gli3: *GLI family zinc finger 3*, Lef1: *lymphoid enhancer-binding factor 1* (Az ábrán szereplő további gének teljes nevét lásd a Rövidítések fejezetben, illetve a Bevezetés szövegében.)

Az idegsejt fenotípusát a sejten belüli differenciációs programon kívül, az idegsejt környezetéből származó – többnyire szintén régió specifikusan szabályozott - hatások is

befolyásolják. Az idegsejtek megfelelő helyre kerülésében, vetítési mintázatának kialakulásában, idegi hálózatba való integrálódásában fontos a migrációjukat, nyúlványaik növekedését szabályozó extracelluláris komponensek, növekedési faktorok jelenléte, a megfelelő sejt-sejt kapcsolatok létrejötte.

Az idegi aktivitási folyamatok szintén hozzájárulnak az idegsejtek fenotípusának, kapcsolódási mintázatának kialakulásához. A kérgi hálózatok kialakulásában például, az érzékszervekből érkező szignálok (Wiesel és Hubel, 1963; Sugiyama és mtsai, 2008) és a kérgen belüli, spontán aktivitás mintázatok (Peinado és mtsai, 1993, De Marco García és mtsai 2011) is szerepet játszanak. A fejlődő *Xenopus* központi idegrendszeren végzett kísérletek alapján, az idegsejtek neurotranszmitter fenotípusának meghatározásában is meghatározó szerepet játszhatnak az idegi aktivitási folyamatok (Root és mtsai, 2008; Marek és mtsai, 2010).

2.6. Az *Emx2* homeodomén transzkripció faktor szerepe az idegi fejlődés során

Az idegi regionalizációt szabályozó faktorok közül az *Emx2* transzkripció faktor idegi fejlődésre gyakorolt hatását doktori munkám során bővebben is vizsgáltam.

A homeoboxot tartalmazó emlős *emx2* gén a *Drosophila melanogaster* elülső feji szelvényeinek (ezen belül elülső idegi elemeinek) kialakításához szükséges *empty spiracles* *gap* gén emlős homológja (Simeone és mtsai, 1992; Hirth és mtsai, 1995).

A fejlődő rágcsáló idegrendszerben az *emx2* gén expressziója a prosencephalikus területre korlátozódik. Az elülső idegrendszeri régiók meghatározásának idején, a tömeges idegsejt-képzés időszaka előtt, az *emx2* széles körben expresszálódik a prosencephalon területén. Később, az idegsejt képzés szakaszában, expressziója nagyrészt a dorzális előagyi területekre korlátozódik (Kimura és mtsai, 2005).

*2.6.1. Az *Emx2* szerepe az anterior idegi régiók meghatározásában*

Az *Emx2* három-szomitás stádiumban (~E8) kezd el expresszálódni a leendő prosencephalon poszterior területén (Kimura és mtsai, 2005), és a *Pax6*, *Otx1* és *Otx2* homeodomén transzkripció faktorokkal együttműködve szerepet játszik a köztiagyi területek és a kaudomediális előagyi területek (archipallium, kérgi szegély [cortical

hem], plexus choroideus) regionális identitásának meghatározódásában (Shinozaki és mtsai, 2002, 2004; Kimura és mtsai, 2005).

2.6.2. Az *Emx2* transzkripciós faktor szerepe a kérgi régiók kialakulásában

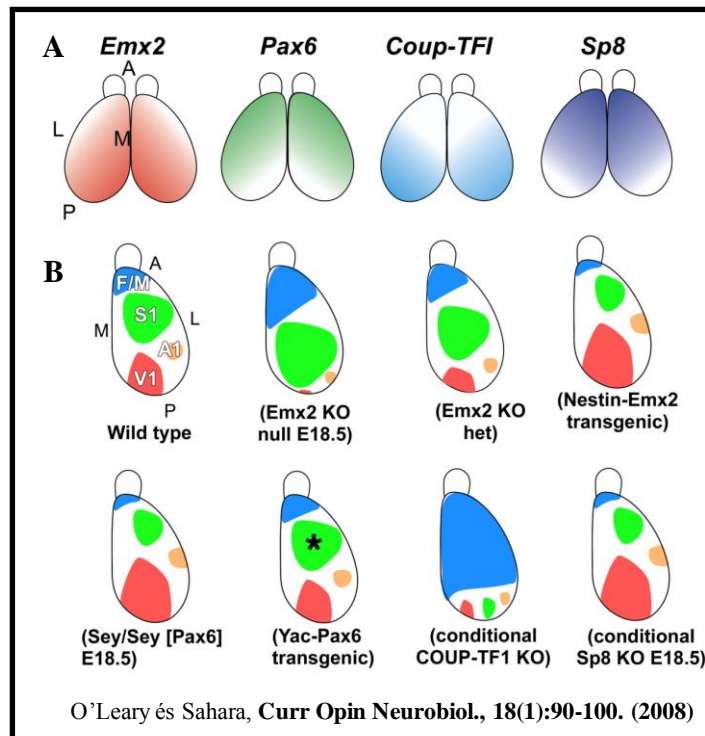
A neocortex, bár fejlődésének alapvető lépései egész területén hasonlóak, speciális kérgen beüli, és más agyterületekkel való kapcsolatokkal, jellemző citoarchitectonikai felépítéssel és molekuláris tulajdonságokkal rendelkező régiókra tagolódik (Brodmann, 1909; Caviness, 1975; Watakabe és mtsai, 2009).

A fejlődő előagy kéreg regionalizációjában meghatározó szerepet játszanak többek között az *Emx2*, a paired box és homeodomén DNS-kötő hellyel is rendelkező *Pax6*, a zinc finger (cink ujj) domén *Sp8* és az orphan magi receptorok közé tartozó *COUP-TF1* transzkripciós faktorok. Ezek a gének ellentétes, egymást kiegészítő expressziós grádiennsel rendelkeznek a dorzális előagy ventrikuláris zóna sejtjeiben, és hiányukban a különböző kérgi régiók mérete és egymáshoz viszonyított aránya jelentős változásokat szenved (O'Leary és Sahara, 2008) (11. Ábra).

A ventrikuláris zóna radiális glia progenitoraiban az *emx2* gén expressziója az anterolaterális területektől a poszteromediális területek felé haladva egyre magasabb (O'Leary és Sahara, 2008). Az *Emx2* az előagy kéreg kaudomediális területein elhelyezkedő régiók kialakulásában játszik szerepet (Hamasaki és mtsai, 2004). Az *emx2* homozigóta illetve heterozigóta knock out (KO) – génkiütött - egerekben, a rostrális kérgi régiók (primer motoros –M1- és szomatoszenzoros áréák –S1-) határa kaudális irányba tolódik, miközben a kaudális kérgi areák (primer vizuális –V1- és auditoros áréák –A1-) mérete csökken (O'Leary és Sahara 2008) (11. Ábra).

Az, hogy az *Emx2* pontosan milyen fejlődési lépéseket szabályoz, kevéssé ismert. Az *Emx2* szerepet játszik az elsődleges vizuális kéreg talamo-kortikális kapcsolatainak kialakulásában (Bishop és mtsai, 2003). Feltehetően olyan nyúlványnövekedést segítő faktorok, adhéziós molekulák expressziójának a szabályozásában vesz részt, melyek segítik a talamikus dorzális oldalsó térdes testből (corpus geniculatum laterale) érkező rostoknak a V1 területére való benövését (Leingärtner és mtsai, 2003). Az *Emx2* a szintén *Drosophila* empty spiracles homológ *Emx1* transzkripciós faktoral együttműködve szabályozza a kérgi fejlődésben fontos szabályozó szerepet játszó,

átmeneti idegsejt populációk kialakulását (Bishop és mtsai, 2003). A subplate neuronok talamokortikális axonok „vezetésében”, a Cajal Retzius sejtek a kérgi rétegződés kialakításában vesznek részt. Az *Emx* KO állatokban valószínűleg ez utóbbi sejtípus hiánya okozza a kérgi rétegződésben megfigyelt rendellenességeket.



11. Ábra: A kérgi regionalizációban szerepet játszó *Emx2*, *Pax6*, *COUP-TFI* és *Sp8* transzkripciós faktorok expressziós mintázata (A), és megváltozott expressziós szintjük hatása az elsődleges kérgi áréak kialakulására (B). (B): Az *emx2* gén kiütése, homizigóta vagy heterozigóta formában (*Emx2* KO null ill. *Emx2* KO het) a poszterior áréak (V1, A1) méretének csökkenését, az anterior áréak (M1, S1) méretének növekedését és poszterior irányba való tolódását okozza. Az *emx2* génnek a *nestin* promotor szabályozása alatt való túlexpresszáltatása (*Nestin-Emx2* transgenic) a kérgi áréak anterior irányba való eltolódását okozza. Működőképes *Pax6* fehérje hiányában - small eye mutáns (*Sey/Sey [Pax6]*) -, az anterior areák méretének csökkenése, és a poszterior areák megnövekedett mérete és anterior irányba tolódása figyelhető meg. A *pax6* gént túlexpresszázó állatokban (*Yac-Pax6* transgenic) az S1 áréa méretében enyhe mértékű csökkenés (csillaggal jelölve) figyelhető meg. Ha a *COUP-TFI* fehérjét eltávolítják a kérgi területekről (Conditional *COUP-TFI* KO), a frontális/motoros területek méretének nagymértékű növekedése és erőteljes poszterior irányba való tolódása figyelhető meg, míg az elsődleges érző területek mérete jelentős csökkenést mutat. Az *sp8* szelektív eltávolításának hatására a dorzális előagyi területekről (conditional *Sp8* KO), a kérgi területek anterior irányba tolódnak.

Rövidítések: A: anterior, A1: primer auditoros áréa, F/M: frontális/ motoros áréa, L: laterális, M: mediális, P: poszterior, S1: primer szomatoszenzoros áréa, V1: primer vizuális áréa

Angol kifejezések: wild type: vad típus

2.6.3. Az *Emx2* transzkripciós faktor sejt-szintű hatásai

Bár számos idegi fejlődési folyamat szabályozásában bizonyított a szerepe, keveset tudunk az *Emx2* transzkripciós faktor célgénjeiről, illetve a sejt-szintű folyamatokról, melyeket szabályoz.

Az *emx2* gén expresszióját a dorzo-mediális előagyi területekről (az ún. kérgi hem területéről) származó morfogének, a *BMP* és *Wnt* fehérjék pozitívan (Theil és mtsai, 2002; Suda és mtsai, 2010), míg az ANR illetve az anterior commissurális lemez területéről származó FGF8 negatívan szabályozza (Fukuchi-Shimogori és Grove, 2003). A *Gli3* cink finger illetve valószínűleg az *Otx2* homeodomén transzkripciós faktor, szintén pozitívan szabályozzák az *emx2* expressziót (Theil és mtsai, 1999, Suda és mtsai, 2010).

Bizonyos adatok szerint az *emx2* közvetlenül szabályozhatja a *wnt* (Muzio és mtsai, 2005) illetve *fgf8* (Fukuchi-Shimogori és Grove, 2003) gének expresszióját.

Heins és munkatársai munkája alapján az *Emx2* transzkripciós faktor a radiális glia sejtek szimmetrikus, önsokszorozó osztódását serkenti a kérgi területeken az idegsejtképzés időszakában (Heins és mtsai, 2001). Gangemi és munkatársai viszont arról számoltak be, hogy a felnőtt idegszövetben található idegi őssejtekben az *Emx2* aszimmetrikus osztódást indukál, tehát az idegsejt képzés irányába hat (Gangemi és mtsai, 2001). Galli és munkatársainak (Galli és mtsai, 2002) munkája szintén alátámasztja, hogy az *Emx2* a szimmetrikus osztódások arányát csökkenti a felnőtt idegi őssejtekben.

2.7. Doktori munkám során alkalmazott kísérletes rendszerek

Az idegi fejlődés folyamatainak vizsgálatához, kísérleteimben *in vitro* modell rendszereket alkalmaztam. Az NE-4C neuroepitéliális őssejt- (Schlett és Madarász, 1997), a P19 karcinóma sejt- (McBruney és Rogers, 1982) és az R1 (Nagy és mtsai, 1993) embrionális őssejt vonalak egérből (*Mus musculus*) származó, egy sejt eredetű, fenó- és genotípusosan homogén sejtvonalak, melyek *all-transz* retinsavval indukálva idegi irányba differenciáltathatóak.

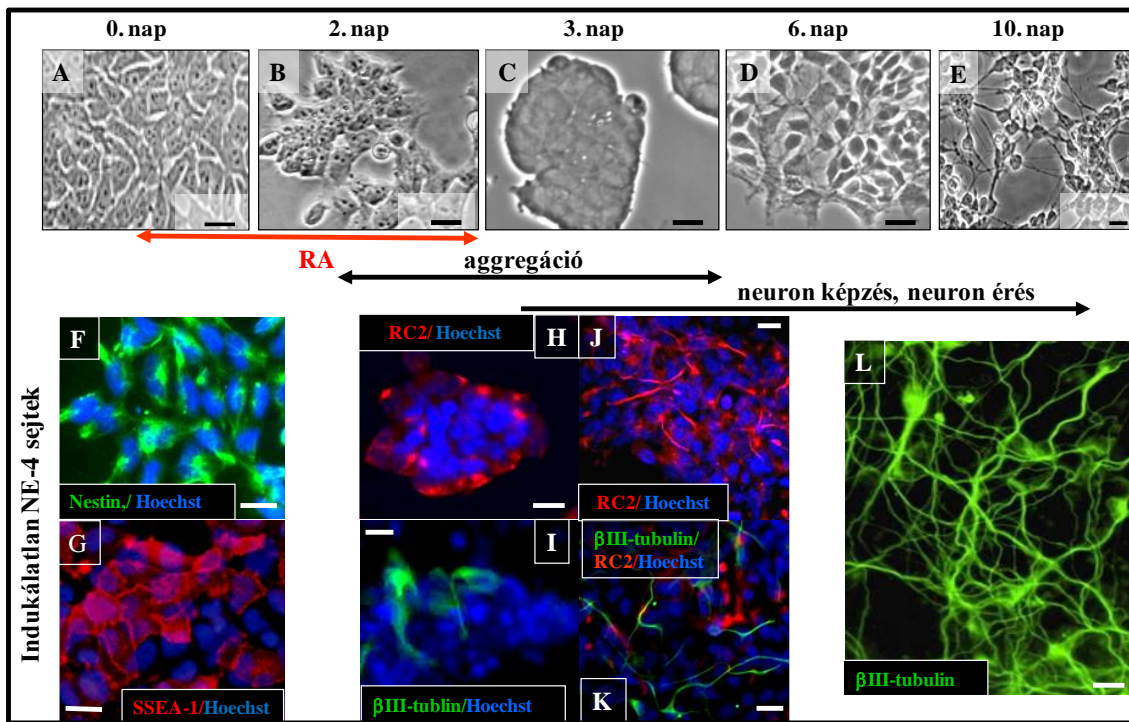
A retinsavat széles körben használják az őssejtek *in vitro* idegi differenciálódásának megindítására (Jones-Villeneuve és mtsai, 1982; Fraichard és mtsai, 1995; Schlett és Madarász, 1997). Az *all-transz* retinsav (RA) az A-vitamin származéka. Közvetlenül retinaldehidből keletkezik, a *retinaldehid dehidrogenáz* enzimek (*Raldh*) által katalizált reakcióban. A RA kisméretű, lipidoldékony molekula, mely a sejtmembránokon átjutva, autokrin és parakrin módon is hathat. Hatását főleg a *RAR* (*RAR α - γ*) és *RXR* (*RXR α - γ*) magreceptorokhoz kötődve fejti ki. A *RAR* és *RXR* receptorok egymással különböző összetételű dimereket képezhetnek, és a szabályozó régiókban elhelyezkedő RARE (retinoic acid responsive element) DNS-szakaszokhoz, illetve különböző transzkripciós faktor és kromatin módosító komplexekhez kötődve szabályozzák a génexpressziót. A RA a gerincesek embrionális fejlődése során fontos szerepet tölt be többek között a testtengelyek mentén való regionalizációs folyamatokban, a sejtek osztódási, apoptotikus és differenciációs folyamatainak szabályozásában (Lloret-Vilaspa és mtsai, 2010; Gudas és Wagner, 2011).

Míg a teratokarcinóma eredetű P19 sejtek (Jones-Villeneuve és mtsai, 1982) és a hólyagcsíra állapotú embrió embriócsomójából származó R1 embrionális őssejtek a retinsavas indukció során nem idegi sejteket is képeznek, a neuroepitéliális eredetű NE-4C sejtek idegi irányban elkötelezettek, így a differenciáció során kizárólag idegi sejteket hoznak létre.

Az NE-4C sejtvonal 9,5 napos (E9,5), p53 deficiens egérembrió (Livingstone és mtsai, 1992) prosencephalikus és mesencephalikus agyhólyagaiból készült primer sejtenyészetből származik, előállítására többszöri klónozással történt, így biztosítva a sejtvonal egy-sejt eredetét (Schlett és Madarász, 1997). Az NE-4C sejtek az őssejt állapot fenntartását támogató körülmények között, folyamatosan osztódnak. A sejtvonal több mint száz passzáson keresztül stabilan fenntartható. Az indukálatlan NE-4C sejtek epitél morfológiával rendelkeznek, tartalmazzák a neurális progenitorokra jellemző *nestin* intermedier fillamentumot (Lendhal és mtsai, 1990), és változó mértékben a felszínükön hordozzák a főként differenciálatlan sejtípusokra jellemző (Solter és Knowles, 1978; Fox és mtsai, 1981; Gomperts és mtsai, 1994; Jiang és mtsai, 2002; Capela és Temple, 2002, 2006) *SSEA-1/LeX* antigént (*stage specific embryonic antigen 1/Lewis X epitóp*) (12. Ábra A, F, G).

2.7.1. Az NE-4C sejtek differenciációja

Az NE-4C sejtek RA-val indukált idegi fejlődése jól reprodukálható módon, egymást szigorú sorrendiségben követő lépéseken át történik (Schlett és Madarász 1997; Schlett és mtsai 1997; 2000; Herberth és mtsai 2002; Jelitai és mtsai 2002, 2004; Tárnok és mtsai, 2002; Varga és mtsai, 2008, Hádinger és mtsai, 2009) (2. Táblázat) (12, 13, 14. Ábra).

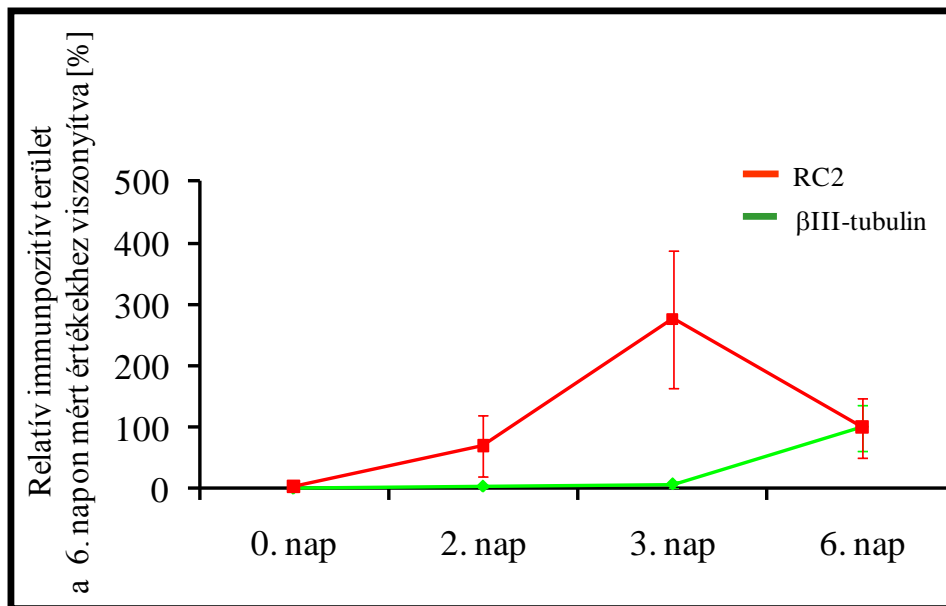


12. Ábra: Az NE-4C sejtek idegi differenciációjának lépései. (A-E): Fáziskontraszt felvételek. **(F-L):** Immuncitokémiai festések. Az asztroglia képzés stádiuma az ábrán nincs feltüntetve (lásd 36. Ábra).

piros nyíl: a RA-as kezelés időtartama, mérték: 20 μ m

A RA kezelés hatására, egy kezdeti, kb. két napos proliferációs szakasz után, a sejtek kisebb-nagyobb aggregátumokat hoznak létre. Ezekben az aggregátumokban, elsőként radiális glia szerű sejtek alakulnak ki. Ezeket a sejteket RC2 pozitívításuk (12., 13. ábra), és elnyújtott alakjuk különbözteti meg az indukálatlan, epitel morfológiájú, RC2 negatív NE-4C sejtektől (12./ H, J, K Ábra). Az RC2 pozitív sejtek megjelenése a radiális glia sejtekre jellemző *Pax6* transzkripciósi faktor (Götz és mtsai, 1998; Heins és mtsai, 2002) és *BLBP* fehérje mRNS-ének megjelenésével esik egybe.

Az aggregátumokban, az indukció harmadik-negyedik napján, az RC2-pozitív sejtek megjelenését követően alakulnak ki az első, β -III-tubulin pozitív posztmitotikus idegsejtek. Az indukció első hetének végéig gyorsan nő az idegsejtszám, majd az idegsejtek érésével párhuzamosan, az újonnan képződő idegsejtek száma csökken (12., 13., 14. Ábra) (Schlett és Madarász, 1997; Schlett és mtsai, 1997).



13. Ábra: Az RC2-pozitív, radiális glia szerű sejtek az idegsejtek kialakulását megelőzően jelennek meg az NE-4C tenyészetekben. Az RC2 immunopozitív illetve β III-tubulin immunopozitív területek méretét az adott differenciációs stádiumokban az (össz sejtszámmal arányos) Hoechst-pozitív területekhez képest határoztuk meg. Az értékeket a grafikonon az indukció 6. napján mért értékekhez viszonyítva (100%), százalékos arányban tüntettük fel.

Az idegsejt előalakok érésével az idegi nyúlványok hossza, az elágazó nyúlványok száma nő, és idegsejt hálózatok szerveződnek (Schlett és mtsai, 1997) (12./ E, L Ábra).

Az idegsejtek érését a GABA által kiváltható intracelluláris Ca^{2+} -válasz és a funkcióképes NMDA receptorok megjelenése jellemzi (Jelitai és mtsai, 2002, 2004). Az érés során megjelennek a szinapszisok képzésében szerepet játszó *synaptophysin* és *synapsin* fehérjék.

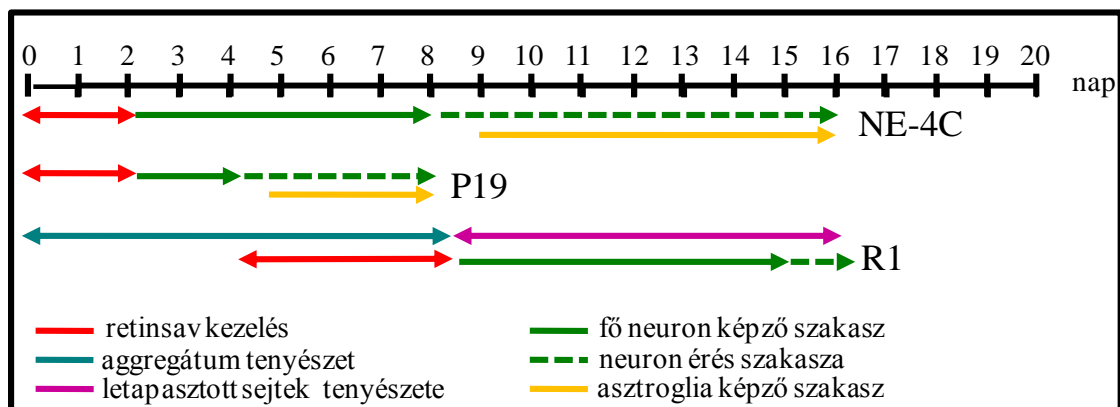
2. Táblázat: Az NE-4C sejtek retinsav indukálta differenciációjának főbb lépései, a különböző stádiumokra jellemző morfológia, sejtípusok, immuncitokémiai markerek.

Nap	Sejtbiológiai események	A tenyészet morfológiája	Jellemző sejtípusok	Fenotípus markerek
0	Folyamatos osztódás	egy-sejt réteg	egyforma, epithél alakú őssejtek	Nestin (Schlett és Madarász, 1997), SSEA-1
1-2	osztódás és szelektív érzékenység a depolarizációra (Herberth és mtsai, 2002); változó adhézions tulajdonságok (Schlett és mtsai, 2000; Tárnok és mtsai, 2002)	egy-sejt réteg	egyforma, epithél alakú őssejtek	Nestin, RC2, SSEA-1
2-4	csökkenő osztódási ráta (Schlett és Madarász 1997) aggregáció; idegsejt képződés kezdeté	aggregátumok	őssejtek; radiális glia sejtek; idegsejt előalakok	SSEA-1, Nestin, RC2 β III-tubulin, neurofillament-light (Schlett és mtsai, 1997)
3-7	sejtkivándorlás az aggregátumokból; idegsejtképződés, nyúlványnövekedés	kivándorló sejtek a fellazuló aggregátumok körül	radiális glia sejtek; őssejtek; idegsejt előalakok	RC2, Nestin SSEA-1, MAP2, NeuN, β III-tubulin
6- 11	csökkenő mértékű idegsejtképződés, idegsejt érés (Herberth és mtsai, 2002; Jelitai és mtsai, 2002, 2007); idegsejthálózatok kialakulása; aljzatsejtek osztódása	idegsejtek hálózata az egy-sejt réteget alkotó aljzatsejteken	idegsejt előalakok; differenciálódó idegsejtek; őssejtek	β III-tubulin, MAP2, NeuN synaptophysyn, NMDA receptors (Jelitai és mtsai, 2002) Nestin, SSEA1
10-	Idegsejtek sejtestjének aggregációja neurit kötegek kialakulása; asztrogliá-sejtek képzése; aljzatsejtek osztódása	nyúlványköte gekkel összekötött idegsejt aggregátumok az egy-sejt réteget alkotó aljzatsejteken	különböző érettségű idegsejtek; asztrogliá-sejtek; őssejtek	β III-tubulin, MAP2, NeuN, synaptophysyn, NMDA receptorok (Jelitai és mtsai, 2002) GFAP, S100 β (Schlett és Madarász, 1997) Nestin, SSEA1

A GFAP– pozitív asztrogliá sejtek a idegsejtek megjelenéséhez képest 5-7 napos késéssel, az indukció második hetétől jelennek meg az NE-4C tenyészetekben (14. Ábra, 37. Ábra) (Schlett és Madarász, 1997; Hádinger és mtsai, 2009).

Bár az oligodendroglia irányú differenciációt munkánk során nem vizsgáltuk, Anderová és munkatársainak (2006) kérgi implantációs kísérletei szerint, az NE-4C vonal GFP-t expresszáló alklónja *in vivo* oligodendroglia sejtek létrehozására is képes.

A P19 és R1 sejt vonalak RA által indukált, idegi irányú differenciációjának fontosabb lépései a 14. Ábrán láthatók.



13. Ábra: Az NE-4C, P19 és R1 sejtek idegi differenciáltatásának menete, és az általunk vizsgált differenciációs folyamatok időrendje. A differenciáció kezdőpontjának a retinsavas kezelés kezdetét (NE-4C, P19 sejtek), illetve az aggregáció kezdetét (R1 sejtek) vettük. A differenciáltatás módjáról bővebben lásd az *Anyagok és módszerek* fejezetet.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A doktori értekezés tárgyát képező munkában egy sejt eredetű őssejt-populációk (NE-4C neuroektodermális őssejtek, P19 embrionális karcinóma sejtek, R1 embrionális őssejtek) *in vitro* indukált idegi fejlődését vizsgáltam. Azoknak a differenciációs folyamatoknak a hátterére voltam kíváncsi, melyek során a geno- és fenotípusosan homogén őssejt-populációkból, heterogén sejtösszetételű tenyészetek alakulnak ki. A kísérletek során a következő kérdésekre kerestem a választ:

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

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Az NE-4C és P19 sejtek fenntartása

Az NE-4C (Schlett és Madarász, 1997) (ATCC Nr.: CRL-2925) és P19 (McBruney és Rogers, 1982) (ATCC Nr.: CRL-1825) sejteket 5% FCS-t (fetal calf serum –fötális borjúsavó-) (Gibco), 4 mM glutamint (Sigma), 40 µg/ml gentamicint (Chinoin) és 2,5 µg/ml amphotericin-t (Sigma) tartalmazó Minimum Essential Medium (MEM; Sigma) tápoldatban tartottuk fenn 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó gázkörnyezetben. A szemi-konfluens tenyészetek sejtjeit a tenyésztőaljzatról foszfát pufferben (PBS –phosphate buffered saline-) hígított, 1mM EDTA-t (Reanal) tartalmazó, 0,05%-os tripszin (Sigma) oldattal való kezelés (1 perc) után felszedtük. A sejtuszpenziót ezután, poli-L-lizinnel (PLL) (Sigma) borított csészékbe osztottuk szét 10⁴ sejt/cm² sejtsűrűségben.

Bár az NE-4C sejtek megfelelő mértékben csak szérumot tartalmazó tápban tapadnak le a tenyésztőaljzatra, a kezdeti letapadást követően, a sejtek szérum mentes, 1% ITS-t –inzulin transzferrin szelén- (Gibco) tartalmazó MEM/F12 1:1 (Sigma), tápoldatban is fenntarthatók FGF2 (10 ng/ml) (Peprotech) ill. EGF (20 ng/ml) (Peprotech) növekedési faktorok jelenlétében.

4.2. Az NE-4C és P19 sejtek idegi differenciációjának indukálása retinsavval

Az indukcióhoz a sejteket 3x10⁴ sejt/cm² sejtsűrűségben 10⁻⁶ M *all-transz* retinsavat (RA) (Sigma) tartalmazó tápoldattal (5% FCS-t tartalmazó MEM, ill. 1% ITS-t tartalmazó MEM/F12 1:1 oldat) kezeltük 48 órán át vagy a kísérletben megadott időtartamig. A retinsavas kezelés kezdetét tekintettük a differenciáció kezdetének.

A retinsavas kezelés után a tenyészeteket a retinsavas kezelés során alkalmazott, de retinsav-mentes, tápoldatban tartottuk fenn. A tápoldatot a differenciáció időtartama alatt minden második nap cseréltük.

4.3. Az NE-4C sejtek idegi differenciációjának indukálása, a növekedési faktorok megvonásával

Az 5% FCS-t tartalmazó MEM, vagy az 1% ITS-t, FGF2-t (10 ng/ml) és EGF-et (20 ng/ml) tartalmazó MEM/F12 (1:1) oldatokat 1% ITS-t tartalmazó MEM/F12 1:1 oldatra cseréltük. A tápoldatot a differenciáció időtartama alatt minden második nap lecseréltük.

4.4. Az R1 embrionális őssejtek fenntartása és differenciáltatása

Az R1 sejteken (Nagy és mtsai, 1993) [ATCC Nr.: SCRC-1011] végzett kísérleteinkhez a cDNS-mintákat Dr. Góczy Elentől (Gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont) kaptuk.

Az R1 sejtek fenntartása és idegi differenciáltatása a következő módon zajlott: Az R1 sejteket egér embrionális fibroblaszt sejtek “feeder/tápláló sejtek” tenyészetén tartották fenn. A sejtek fenntartásához ES tenyésztő médiumot alkalmaztak. Ez a következőket tartalmazta Dulbecco’s modified Eagle’s medium (KODMEM, Gibco) tápoldatba oldva: 1% glutamax (Gibco), 50 µg/ml sztreptomycin (Sigma), 50 egység/ml penicillin (Sigma), 50mM β-merkaptóetanol (Sigma), 0,1 mM nem-esszenciális aminosavak (Gibco), 1000 egység/ml leukémia gátló faktort (leukemia inhibitory factor- LIF, Esgro), 20% FCS (HyClone).

Az idegi differenciáció indukálásához a sejteket először zselatinnal (Sigma) borított tenyésztő edénybe (Greiner) helyezték, majd 24 óra (a differenciáció 0. napja) múlva a sejtek letapadását gátló bakteriológiai tenyésztő edénybe vitték át (ezt vettük a differenciáció kezdetének). A differenciáltatáshoz a sejteket 5×10^5 sejt/ml sejtsűrűségben 1% glutamaxot, 50 µg/ml sztreptomocint, 50 egység/ml penicillint, 50mM β-merkaptóetanol, 0,1 mM nem-esszenciális aminosavakat, és 15% FCS-t tartalmazó KO-DMEM tápoldatban tartották. A sejtekből kialakult embrió-csomókat (Embryoid Body, EB) szuszpenzióban tartották, és minden második nap friss tápoldatba helyezték. Az idegi differenciálódás elősegítéséhez *all-transz* retinsavat (10^{-6} M; Sigma) használtak a differenciáció 4. és 8. napja közötti időszakban. A 8. napon az embrió-csomókat zselatinnal borított edényekbe helyezték és további hét napig tenyésztették.

4.5. Az NE-4C sejtvonal genetikai módosítása

Kísérleteink egy részében az NE-4C sejtvonal genetikailag módosított al-klónjait használtuk. Azokban a kísérletekben, ahol különböző differenciációs stádiumból származó NE-4C sejteket vagy NE-4C sejteket és primer tenyészeteket kevertünk össze, GFP-vel jelölt NE-4C sejteket (NE-4C^{GFP} [ATCC Nr.: CRL-2926]) használtunk. Az Emx2 transzkripció faktor vizsgálatához az emx2-t konstitutívan expresszáló NE-4C^{emx2+} klónokat hoztunk létre.

Az NE-4C sejteket a GFP- (módosított pCAGGS vektor; Niwa és mtsai, 1991) illetve emx2-vektorokkal (emx2 ORF-et tartalmazó pLenti6/V5 Directional TOPO plazmid

[Invitrogen], Rossella Galli -Stem Cell Research Institute, Milánó, Olaszország-ajándéka) a következő módon transzfektáltuk: A transzfektáláshoz Superfect reagenst (Qiagen) használtunk a gyártó utasításai alapján, 1 µg DNS: 3 µl Superfect reagens arányban. A plazmid DNS-t a Superfect reagenssel (5 µg DNS, 15 µl Superfect reagens, 100 µl szérum- és antibiotikum-mentes tápoldatban) 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A szemi-konfluens ($1-1,5 \times 10^4$ sejt/cm²) NE-4C tenyészeteket PBS-sel (phosphate buffered saline, foszfát puffer) mostuk, majd a DNS-Superfect komplexet 5% szérum tartalmú tápoldattal 2ml-re hígítottuk és a tenyészeteket ezzel inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Másnap a tápoldatot friss, 5% FCS-t tartalmazó tenyésztő folyadékra cseréltük, majd 24- 48 óra elteltével, antibiotikummal (5 µg/ml Blastocidin [InvivoGen] az *emx2*-, illetve 400 µg/ml Geneticin [Sigma-Aldrich] a GFP-transzfekeció esetén) szelektáltuk a sejteket. A GFP-plazmiddal való transzfektálás esetén, az erősebb GFP-expressziót mutató sejteket áramlási citometriás módszerekkel válogattuk ki. A szelektált sejteket ezután klonális sűrűségben (15 sejt/cm²) PLL-el kezelt tenyésztőedényekbe tettük, és egy sejt eredetű klónokat hoztunk létre. A transzgen működését a klónokban fluoreszcens mikroszkóp alatt (GFP) illetve RT-PCR módszerrel (*emx2*) ellenőriztük. A klónokat ezután folyamatos antibiotikum szelekció mellett az NE-4C alapvonallal megegyező módon tartottuk fenn.

4.6. Primer idegsejt tenyészetek előállítás

A primer idegsejt tenyészeteket embrionális (E13,5) egér előagyból állítottuk elő (lásd Madarász és mtsai, 1984). Nagy vonalakban: Az idegszövet mechanikai disszociáltatásával keletkező sejtszuspenziót 43 µm pórusátmérőjű szitaszöveten szűrtük át. Az így keletkező sejtszuspenziót $2-5 \times 10^5$ sejt/cm² sűrűségben poli-L-lizinnel borított tenyésztőedényekbe helyeztük, 5% FCS-t (Gibco), 4 mM glutamint (Sigma), 40 µg/ml gentamicint (Chinoin) és 2,5 µg/ml amphotericin-t (Sigma) tartalmazó MEM (Sigma) tápoldatban. A tápoldatot kétnaponta cseréltük. A tenyészeteket 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó gázkörnyezetben tartottuk fenn.

4.7. NE-4C^{GFP}/NE-4C és NE-4C^{GFP}/primer idegsejt kokultúrák készítése

Az NE-4C^{GFP} sejteket (AG5 klón) 10^{-6} M RA-val indukáltuk. A differenciáció 4. napján a sejteket a tenyésztő aljzatról 1 mM EDTA-t tartalmazó PBS-sel felszedtük, majd idegsejtben gazdag (az indukció 10. napján járó), NE-4C tenyészetekre, vagy 13,5

napos embrióból származó primer idegsejt tenyészetekre helyeztük. Három, kokultúrában (MEM-5%FCS tápban) eltöltött nap után 4% PFA-t (paraformaldehid, TAAB Laboratories) tartalmazó PBS-ben fixáltuk a tenyészeteket.

4.8. Immuncitokémiai festés

A tenyészeteket PBS-ben oldott 4%-os PFA-oldattal fixáltuk 20 percig, szobahőmérsékleten. A GABA festés esetén egy 10 perces glutáraldehides (0,1%) (Sigma) fixálást is alkalmaztunk a PFA-val való fixálás után. A sejten belüli epitópok feltárásához PBS-ben oldott 0,1%-os Triton X-100 (Promega) oldatot használtunk 60 percig a magi (NeuN és BrdU) epitópok esetében, és 10 percig az egyéb epitópok esetében. A BrdU epitópok feltárásához 1N HCl oldattal kezeltük a tenyészeteket 37°C-on 30 percig.

Az előkészületek után, PBS-ben oldott 5%-os FCS oldattal (PBS-FCS) vagy 2% BSA-oldattal (Bovine serum albumin – marha szérum albumin - [Sigma]) 1 óráig, szobahőmérsékleten blokkoltuk az aspecifikus ellenanyagkötő helyeket. A tenyészeteket 4°C-on egy éjszakán keresztül inkubáltuk blokkoló oldatban hígított első réteg ellenanyaggal. A második illetve, biotinos erősítés esetén, a harmadik réteg ellenanyagokat 1-1 órán keresztül szobahőmérsékleten alkalmaztuk. A használt ellenanyagokat és a hígítási arányokat a 3. Táblázat tartalmazza.

DAB-el (3,3'-Diaminobenzidin) való előhívás esetén a biotinizált második réteg ellenanyag után, PBS-ben oldott ABC reagensekkel (Vector) inkubáltam a tenyészeteket 45 percig, a gyártó utasításai alapján. A peroxidáz reakciót PBS-ben oldott 0.55 mg/ml koncentrációjú DAB (Sigma) és 0.3% H₂O₂ (Sigma) oldatban 5-25 perces szobahőmérsékleten való inkubálással hívtuk elő. A reakciót 0.1%-os Na-azid-ot (Sigma) tartalmazó PBS mosással állítottuk le. Kettős DAB-es festés során az első immunreakció előhívását 0,1 M Ni²⁺-t is tartalmazó oldatban végeztük, melynek eredményeként a reakció terméke fekete színű csapadék volt. A második immunreakciót a korábban leírtakkal azonos módon végeztük el. A festett tenyészeteket fluoreszcens festés esetén biszbenzimid (Hoechst 33342 [Sigma]) magfestéket tartalmazó Mowiol-lal (Sigma) fedtük le. A Ni-DAB csapadékot is tartalmazó festéseket, a metszet felszálló alkoholsorral való víztelenítése után, Depex-szel (Serva) fedtük le.

A mikroszkópos felvételeket Zeiss Axiovert 200M mikroszkóppal készítettük.

3. Táblázat: Az immuncitokémiai festések során alkalmazott ellenanyagok

Ellenanyag	Gyártó	Hígítás
5-HT	Chemicon	1: 25 000
β III-tubulin	Exbio	1: 1000
BrdU	DAKO	1: 1000
GABA	Sigma	1: 1000
GFAP	DAKO / Sigma	1: 1000 IC / 1: 5000 WB
MAP2	Chemicon	1: 100
Nestin	Chemicon	1: 1000
NeuN	Chemicon	1: 1000
RC2	DSHB	1: 1000
SSEA-1	DSHB	1: 1000
TH	Chemicon	1: 500
VGAT	Synaptic Systems	1: 500 / 1: 2500 WB
VGlut2	Chemicon	1: 200
a-egér IgG Alexa488	Molecular Probes	1: 1000
a-nyúl IgG Alexa 488	Molecular Probes	1: 1000
a-egér IgG Alexa 594	Molecular Probes	1: 1000
a-nyúl IgG Alexa 350	Molecular Probes	1:1000
a-nyúl IgG Alexa 594	Molecular Probes	1: 1000
a-egér IgG AP	Jackson	1: 5000
a-nyúl IgG AP	Jackson	1: 5000
a-egér IgG biotin	Vector	1: 1000
a-nyúl IgG biotin	Vector	1: 1000
a-egér IgM biotin	Jackson	1: 1000
Avidin-Alexa488	Molecular Probes	1: 1000
Avidin-Alexa594	Molecular Probes	1: 1000

4.9. Az immuncitokémiai festések kiértékelése

A vizsgált markert tartalmazó sejtek összejtszámhoz viszonyított arányát képelemző szoftver segítségével és/vagy az immunopozitív sejtek számolásával határoztuk meg. A fluoreszcens festések esetén az össz-sejtszámot Hoechst magfestés segítségével határoztuk meg.

4.9.1. Fluoreszcencia intenzitás alapján történő értékelés

A Zeiss Axiovert 200M mikroszkóppal készült képeket Axiovision 4.5 szoftver segítségével elemeztük. A program az általunk beállított küszöbérték feletti fényintenzitással rendelkező képrészletek területét képenként (azaz látóterenként)

összegzi. Az értékeket legtöbb esetben, adott látóterén belül, a Hoechst festés összegzett területértékének (amely az össz sejtszámmal arányos) arányában adtuk meg.

4.9.2. Sejtszámolás alapján való kiértékelés

A Zeiss Axiovert 200M mikroszkóppal készült felvételeken az immunopozitív sejteket - az NIH (National Institutes of Health) által kifejlesztett, nyilvánosan elérhető-ImageJ program segítségével számoltuk. A sejtszámokat a Hoechst festéssel jelölt magok számolásával meghatározott összsejtszámmra vonatkoztattuk. Bizonyos esetekben, kettős immuncitokémiai festések esetén, a különböző markerekre immunopozitív sejtek számát egymásra vonatkoztatva adtuk meg.

A mérések/számolások során általában 3-3 párhuzamos tenyészet 10-10 mikroszkópos látóteréről (10x objektív) készült felvételeit analizáltunk. Az átlagot és a standard devianciát a 3 párhuzamos tenyészet látótereinek tenyészetenként átlagolt értékei alapján számítottuk (n=3).

4.10. Western blot analízis

Az NE-4C sejteket a tenyésztőaljazatról Ca^{2+} és Mg^{2+} -mentes, 1mM EDTA-t tartalmazó PBS-ben, proteáz inhibitorok jelenlétében szedték fel (Roche Complete, Protease Inhibitor Cocktail). A következő lépések jégen zajlottak. A sejteket 10 perc 200 g centrifugálás (4°C) után, proteáz inhibitorokat (Roche Complete, Protease Inhibitor Cocktail) tartalmazó lízis-pufferben (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100 a GFAP és 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100 a VGAT esetén, PH= 7.4), kézi homogenizátorral homogenizáltuk. 10 perc 2000 g centrifugálás után, a felülúszók fehérjetartalmát Bradford módszerrel (Bio-Rad; Bradford, 1976) mértük. Ezután, a mintákhoz azonos térfogatú Laemli puffert adtunk. 5 perc forralás után, 20-20 μg (GFAP-blott) ill 10-10 μg (VGAT-blott) fehérjét vittünk fel mintánként 7%-os SDS (sodium dodecyl sulfate) -poliakrilamid gélre (rotiphorese gel 30 [Roth]). A fehérjéket futtatás után PVDF membránra (Immobilon-P; Millipore) blottoltuk át. Az aspecifikus kötéseket 0,05% Tween-20-at és sovány tejport (3%) tartalmazó TBST (Tris puffer) oldattal blokkoltuk. A membránokat a blokkoló oldatba oldott első réteg ellenanyaggal (GFAP, 1: 5000 [Sigma]; VGAT, 1: 2500 [Synaptic Systems]) egy éjszakán keresztül, 4°C-on inkubáltuk. A festést TBST-be oldott, alkalikus foszfátáz konjugált másodlagos ellenanyaggal (1: 5000 [Jackson]) való inkubálás után, NBT-

BCIP oldattal (0.165 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate [Sigma] és 0.33 mg/ml Nitro Blue tetrazolium [Sigma]) hívtuk elő.

4.11. RT-PCR analízis

A sejteket RNS-tartalmát RNeasy Mini Kit-tel (Quiagen), vagy Trizolos (Sigma) tisztítási módszerrel izoláltuk, a gyártó utasításai alapján. A Trizolos tisztítás esetén, a mintákból a DNS-szennyeződést DNase I (Fermentas) kezeléssel távolítottuk el. A reverz transzkripciót 1,5µg RNS-ből „First strand cDNA synthesis Kit” (Fermentas) használatával végeztük. A polimeráz reakcióhoz (PCR) Hotstart Taq (Qiagen) polimerázt használtunk. A minták cDNS tartalmát a „háztartási” gén *hipoxantin guanin foszforibozil transzferáz (hprt)* PCR-termékek aránya alapján hígítottuk azonos szintre. A *hprt* primerek a 248bp hosszú cDNS mellett felismerik az 1086 bp hosszú genomiális szekvenciát is, ezért használatukkal a genomiális szennyezés kimutatható. A PCR primereket a Primer Premier 5 tervező programmal terveztük, az NCBI honlapján található mRNS-szekvenciák alapján. A primer párok specificitását az NCBI Nucleotide blast programjával ellenőriztük. A Gad65, Gad67, VGAT, VGlut2 primerek/ szekvenciák Dr. Szabó Gábortól (MTA-KOKI) származnak. A polimeráz lánc-reakció (PCR) paramétereit minden primer-pár esetén optimalizáltuk. A denaturáció és az annealáció időtartama minden esetben 30 illetve 40 s volt. Az elongációs idő <300 bp hosszúságú termék esetén 30 s, 300-600 bp termék esetén 40 s és >600 bp termék esetén 60 s volt. A reverz transzkripcióhoz és a PCR reakcióhoz a Techne TC-512 készülékét használtuk. A PCR reakciók termékeit 0,5 % Etidium Bromid (Promega) jelenlétében 1%-os agaróz (Promega) gélen futattuk, és UV-átvilágítással tettük láthatóvá, majd CCD kamerával fényképeztük. Az egyes gének kimutatásához használt primerek szekvenciáit, a PCR-reakció során keletkező produktumok hosszát az annealációs hőmérsékleteket, és a ciklusszámokat a 4. Táblázat táblázat tartalmazza.

4. Táblázat: Az RT-PCR reakciók során használt primerpárok

	Primer szekvencia	Annealációs hőmérséklet (C°)	Produktum hossza (bázispár)	Ciklusszám
Blbp	5'ACCCGAGTTCCTCCAGTTC3'- 5'CAAAAGCAAGTCCCATTCA3'	54	431	35

Bmp2	5'AGGCTGTGTGTCAGCACTTG3'- 5'GTCGAAGCTCTCCCACTGAC3'	58	960	35
Bmp4	5'GACAGTCCCCATGGCAGTAG3'- 5'TGATACCTGAGACCGGGAAG3'	58	947	35
Chat	5'GAAAGATAGTCAAAATGGCGTCC3'- 5'CCAGGCATAACCAGGCAGAT3'	55	171	35
Cntf	5'GATTTAGGGGATGGCTTTTCG3'- 5'CACACATATGCACAGCCAGA3'	51	787	35
Dbh	5'CATTACCACAACCCACGGAA3'- 5'AGTCATACAGAGCCTTGAGCATA3'	53	676	35
Dlx2	5'CAGGGTCCTTGGTCTCTTCA3'- 5'CTGCTGAGGTCACTGCTACG3'	58	600	35
Egfr	5'GGAGAGGAGAACTGCCAGAA3'- 5'GCATGGAGGTCAGTCCAGTT3'	56	650	35
Emx2	5'TGGTTTCAGAACCGGAGAAC3'- 5'TTGGCATTTGACTGACAGC3'	54	552	35
Emx2 5' UTR	5'CTGGGTCTACTGCACACGCTA3'- 5'CAGCTACTCGCTCTCGTCTTT3'	56	289	35
Gad65	5'GGCTCTGGCTTTTGGTCCTTC3'- 5'TGCCAATTCCCAATTATACTCTTGA3'	58	438	35
Gad67	5'GCTGGAAGGCATGGAAGGTTTTA3'- 5'TGAGCCCCATCACCGTAGCA3'	62	575	35
Gbx2	5'TTCGAAGTCAACACCAGCAG3'- 5'CCCCTTTAAGCCCGTCTAAT3'	53	156	38
Gfap	5'GACTATCGCCGCAACTGC3'- 5'CGTCCTTGTGCTCCTGCTTC3'	58	422	32
Glast	5'TGGGTTTTTCATTGGAGGGTTG3'- 5'CAGTACGTTGGTGGTGGTTCG3'	58	419	35
Hes3	5'AGAAGTCACTGCAAGGACTCTGG3'- 5'CTGGCAGTTTGATGCAGGTTG3'	51	334	35
Hoxb2	5'TCTTTGGTCCTTTCCGTCTG3'- 5'CCTGAGATTTTCGTTGGAAGG3'	53	159	35
Hprt	5'CACAGGACTAGAACACCTGC3'- 5'GCTGGTGAAAAGGACCTCT3'	56	248 cDNS/ 1086 gDNS	32
Int α 3	5'ACTACTCCTTACCTCTGCGCATGC3'- 5'CACTTGCCATTGGTAACCTTCATAG3'	58	771	35
Int α 6	5'GAGGAATATTCCAAACTGAACTAC3'- 5'GGAATGCTGTCATCGTACCTAGAG3'	52	398	35

Int α v	5'TTCAACCTGGACGTCGAAAG3'- 5'TATCCTGCTTTGACCTCAC3'	50	309	35
Int β 1	5'GATGCAATCATGCAGGTTGC3'- 5'TGTAGGCATCGATGATTAGC3'	50	369	35
Int β 3	5'CCCTCTCAGCAGGAAGAGTG3'- 5'GAGTAGCAAGGCCAATGAGC3'	56	696	35
Int β 5	5'ATGGACTATCCATCGCTTGC3'- 5'GTTCCATTCCCACTGCATCT3'	52	501	35
Int β 8	5'GCCCTTTATTCCTGACTT3'- 5'GAGATGGCAGTTCCGTC3'	56	395	35
Lmx1b	5'CTGATGCGAGTCAACGAGTC3'- 5'TGGAGTAGAGCCGGTCAATG3'	53	960	35
Mash1	5'CCAACAAGAAGAAGATGAGCAAGG3'- 5'TTCAAGTCGTTGGAGTAGTTGG3'	56	157	35
Math2	5'TGAGAATGGCTTGTCCAGAAGG3'- 5'TGGTAGGGTGGGTAGAATGTGG3'	56	406	35
Ngn2	5'AAGAGGACTATGGCGTGTGG3'- 5'ATGAAGCAATCCTCCCTCCT	56	649	35
Otx2	5'GGAAACAGCGAAGGGGAGGA3'- 5'CTGCTGCT TTGGCGGCACTT3'	56	165	35
Otx3	5'GCAGCTCCAGAAACAGAAGG3'- 5'GAGTCCTCTTCACGGTCCAG3'	55	163	35
Pax6	5'ACG AAA GAG AGG ATG CCT C3'- 5'CCC AAG CAA AGA TGG AAG	50	498	35
Phox2b	5'CTCCTACCCCTTTCCTACCC3'- 5'CAGCTCGGATCACTCAATCA3'	56	955	35
Pitx3	5'GTTATCGGACGCAGGCA3'- 5'TGAAGGCGAACGGGAAG3'	53	952	35
S100 β	5'TTCAAAGAACTCATGGCAGGC3'- 5'AGAGGACTCCAGCAGCAAAGG3'	58	307	35
Tph2	5'TCTCCAAACTCTACCCGACTC3'- 5'AACCCTGCTCCATACGC3'	54	460	35
V5 epitóp	5' CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG'- 5'ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT3'	58	988	35
Vgat	5'ACGAGGAGAACGAAGACGG3'- 5'ACGATGATGCCAATGGAGAT3'	50	428	35
Vglut1	5'TTGAGGGCTTTATTTGGAGGG3'- 5'CGTACACCAGAGCGTTTATTGG3'	53	822	35

Vglut2	5'TGGAAAATCCCTCGGACAGA3'- 5'TAGACGGGCATGGATGTGAA3'	56	879	
--------	---	----	-----	--

4.12. Tunel (TdT-dependent dUTP-biotin nick end labelling) reakció

Az apoptotizáló sejtek megjelölésére a Roche In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red kitjét használtuk. A jelölést a gyártó utasításai szerint végeztük.

4.13. BrdU-kezelés

A tenyészeteket a tenyésztőfolyadékban oldott 1 μ M BrdU-val (5-brome-2'-deoxyuridine) kezeltük a kívánt időtartamon keresztül (lásd Eredmények fejezet). A tenyészeteket rögtön a kezelést követően, vagy a kezelés utáni meghatározott időpontokban 4% PFA-t tartalmazó PBS-ben fixáltuk. A BrdU-jelölést immuncitokémiai festéssel tettük láthatóvá, az immuncitokémiai festést bemutató fejezetben leírtaknak megfelelően.

4.14. Retinsav mérés sejtblológiai („bioesszé”) módszerrel

Az NE-4C sejtek által termelt retinsav méréséhez az F9 embrionális karcinóma sejtvonalat használtuk. Az F9 sejtek egy retinsav érzékeny β -galaktozidáz riporter konstrukciót hordoznak (Sonneveld és mtsai, 1999), melyben a RAR β 2 gén promóterének cAMP és retinsav érzékeny (RARE) elemeit tartalmazó szekvencia szabályozza a β -galaktozidáz (lacZ) gén kifejeződését (RARE-LacZ). A riporter érzékeny az all-transz retinsavra, azonban egyéb biológiailag aktív retinoidok (pl. 9-cis, 13-cis és a 4-oxo RA) is képesek aktiválni.

Az F9 RARE-LacZ sejteket 10 % FCS-t és – az antibiotikum szelekciót biztosító - 400 μ g/ml geneticint tartalmazó DMEM tápoldatban (Dulbecco's Modified Eagle Medium [Sigma]) tartottuk fenn.

Az NE-4C tenyészetekről származó ún. „kondicionált médiumok” RA-tartalmának méréséhez, az F9 sejteket a mérés előtti napon MEM-5%FCS tápoldatba helyeztük át, 6×10^4 sejt/cm² sűrűségben. A mérés során az NE-4C sejtek által (48 órán keresztül) kondicionált tápoldatot 18 órán át tartottuk az F9 sejteken, majd 2%-os paraformaldehiddel 10 percig szobahőmérsékleten fixáltuk az F9 tenyészeteket.

A β -galaktozidáz enzimaktivitást 1mg/ml-es koncentrációjú X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside [Sigma]) oldattal (1mg/ml X-gal, 5mM K₃Fe(CN)₆, 5mM K₄Fe(CN)₆ és 1mM MgCl₂, PBS-ben oldva) 37°C-on „hívtuk elő”. A reakció kék csapadék képződését eredményezte. A mérés során, 10⁻¹⁰- 10⁻⁸ M RA-val kezelt F9 tenyészetek β -galaktozidáz aktivitásához viszonyítottuk az eredményeket.

4.15. A RA magi receptorainak gátlása

A pán-RAR (retinsav receptor) antagonistá AGN193109-et (Allergan Inc., Johnson és mtsai, 1995) a tápoldatba oldva, 10⁻⁷ M koncentrációban alkalmaztuk az NE-4C sejtek idegi differenciációjának meghatározott szakaszaiban. A tápoldatot az AGN193109 bomlékonysága miatt naponta cseréltük (a kontroll, kezeletlen tenyészeteken is). Az AGN193109 hatékonyságát RA-reszponzív F9 sejtek segítségével ellenőriztük. Az AGN193109-kezelés utolsó napján, az F9 sejteket az 6 x 10⁴ sejt/cm² sűrűségben az NE-4C tenyészetek tetejére ültettük, majd 20 óra múlva a tenyészeteket 2% PFA-t tartalmazó PBS oldattal fixáltuk. A β -galaktozidáz enzimaktivitást a fentebb leírtak szerint mutattuk ki.

4.16. RAREhsplacZ egértörzs

A RAREhsplacZ transzgén (Rossant és mtsai, 1991) a hsp68 gén promótere előtt három példányban tartalmazza a RAR β promóter RARE szekvenciáját. A RA-érzékeny promóter az Escherichia coli β -galaktozidáz (lacZ) génjének expresszióját hajtja meg. Így, a β -galaktozidáz aktivitás kimutatásával detektálhatóvá válnak azok a sejtek, melyek környezetében a RA megtalálható, és melyek érzékenyek is a RA-ra (tehát jelen vannak bennük a retinsav hatáshoz szükséges RA-receptorok és egyéb faktorok).

4.17. β -galaktozidáz aktivitás kimutatása RAREhsplacZ egerek agyában

A RAREhsplacZ E15 egér embriókat a méhből való eltávolítás után, 2 %-os PFA-t tartalmazó PBS-ben fixáltuk 2 órán keresztül. Ezután 0,12 M-os foszfát pufferben (PB) háromszor mostuk a preparátumokat, majd egy napon keresztül 15 % szacharózt tartalmazó PB-ben tartottuk az embriókat. Beágyazás előtt az embriókat 15 % szacharózt, 7,5 % zselatint tartalmazó, 37°C-os PB-ben tartottuk, míg az oldat aljára süllyedtek. Zselatinba való beágyazásuk után az embriókat izopentánban -45°C-on fagyasztottuk. Ezután MICROM HM 505E márkájú kriomikrotóm segítségével -22°C-on 16-18 μ m vastag metszeteket készítettünk, melyeket (előzőleg 0,1 mg/ml poli-L-

lizinnel borított) SuperFrost tárgylemezekre húztunk fel. Két óráig tartó szobahőn való szárítás után a zselatint 37°C-os PB-ben leolvasztottuk a metszetekről.

A β -galaktozidáz aktivitást X-gal festéssel tettük láthatóvá (lásd feljebb). A metszeteket 2 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk az előhívóoldatban. A preparátumokat Mowiollal (Sigma) fedtük le, és Nikon Eclipse TS100 fénymikroszkóp ill. Nikon Coolpix 950 digitális kamera segítségével fényképeztük.

5. EREDMÉNYEK

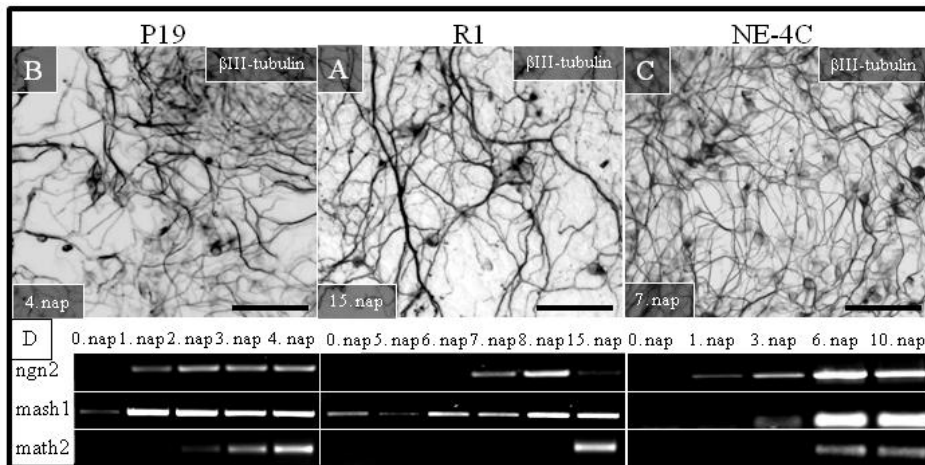
5.1. REGIONÁLIS ÉS NEUROTRANZMITTER SAJÁTSÁGOK ALAKULÁSA AZ IN VITRO IDEGI FEJLŐDÉS SORÁN

Doktori munkám egyik célja annak vizsgálata volt, hogy a kiinduláskor homogén őssejt-populációk *in vitro* idegi differenciációja során, hogyan aktiválódnak azok a gének, melyek az embrionális fejlődés során a progenitorok régió specifikus tulajdonságainak, régió specifikus differenciációs programjainak szabályozásáért felelősek. Ezzel összefüggésben, vizsgáltam az *in vitro* idegi differenciáció során kialakuló idegsejtek neurotranszmitter fenotípusát.

5.1.2. Az NE-4C, a P19 és az R1 sejtek idegi differenciációja során különböző idegrendszeri régiókra jellemző proneurális gének aktiválódnak

A proneurális *bHLH* transzkripciós faktorok az idegsejt irányú elköteleződés során aktiválódnak az idegi progenitorokban, és központi szerepet töltenek be az idegsejt képzés „általános” programjának szabályozásában. A *mash1* és *ngn2* proneurális gének azonban, a fejlődő idegrendszer nagy részén komplementer expressziós mintázatot mutatnak, és az általános idegsejt-tulajdonságok kialakításán kívül, az adott területre jellemző, régió-specifikus idegsejt sajátságok kialakításában (többek között a neurotranszmitter fenotípus meghatározásában) is szerepet játszanak (Hirsch és mtsai, 1998; Parras és mtsai, 2002; Pattyn és mtsai, 2004; Mattar és mtsai, 2008; Kele és mtsai, 2006).

Az NE-4C, a P19 és az R1 sejtek RA-val indukált idegi differenciációja során, mind a *mash1* mind a *ngn2* proneurális gén expressziója aktiválódott, a posztmitotikus neuronokra jellemző *math2* *bHLH* transzkripciós faktor expresszióját és az első *β III-tubulin* pozitív idegsejt előalakok megjelenését megelőzően (Varga és mtsai, 2008) (15. Ábra, 16. Ábra).



15. Ábra: Idegsejt képzés az NE-4C, P19 és R1 sejtek retinsav által indukált idegi differenciációja során. (A-C): Érett morfológiával rendelkező, βIII-tubulin pozitív idegsejtek (DAB-es festés) a P19, R1 és NE-4C tenyészetekben, a differenciáció 4., 15. ill. 7. napján. (D): A *mash1* és *ngn2* és a *math2* bHLH transzkripciós faktorok expressziós mintázata (RT-PCR). Mérték: 50 μm

Az, hogy a kezdeti idegsejt irányú elköteleződés időszakában, a *mash1* és *ngn2* proneurális gének együttesen expresszálódtak, felvetette azt a kérdést, hogy vajon az *in vitro* fenntartott idegi őssejtek rendelkeznek-e regionális sajátosságokkal.

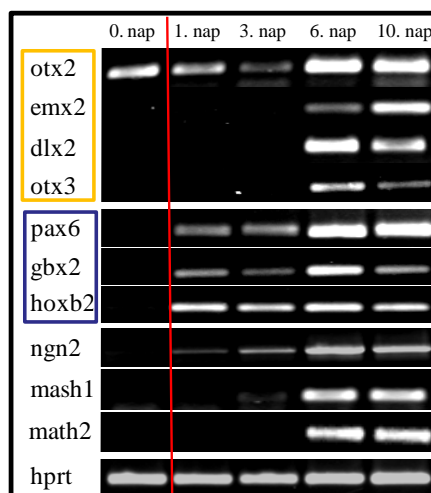
5.1.3. Az egy-sejt-eredetű őssejt populációk idegi fejlődése során, a központi idegrendszer regionalizációját szabályozó gének széles skálája aktiválódik

Az NE-4C sejtek idegi differenciációjának különböző stádiumaiban olyan *homeodomén* transzkripciós faktorok expresszióját vizsgáltunk, melyek *in vivo* a korai fejlődési stádiumoktól kezdve szerepet játszanak az idegrendszer regionalizációjában.

Az NE-4C sejtekből, indukálatlan állapotban, az általunk vizsgált gének közül, csak az *otx2* gén mRNS-e volt kimutatható (Varga és mtsai, 2008) (16. Ábra). Az *Otx2* az epiblaszt területén, már a velőlemez kialakulása előtt kimutatható (Acampora és mtsai, 2001), majd az idegrendszer fejlődése során a közép-utóagyi határtól (az Isthmus organizátortól) rostrálisan elhelyezkedő, tehát az NE-4C sejtek származási helyének megfelelő, területek fejlődésében játszik szerepet (Wurst és Bally-Cuif, 2001, Vieira és mtsai, 2009). A korai anterior neuroepitélre jellemző egyéb gének, illetve a poszterior idegrendszeri területek kialakulásában szerepet játszó gének azonban nem

expresszálódtak az indukátlan sejtekben. Ezek alapján úgy tűnik, hogy az NE-4C sejtek az idegrendszer-polaritás kialakulásának kezdeti szakaszán levő fejlődési állapotot reprezentálják.

Az *in vitro* differenciálódás megindulásával, számos régió specifikus gén aktiválódott az NE-4C tenyészetekben (Varga és mtsai, 2008). Az anterior neuroektodermára (prosencephalon, mesencephalon) korlátozó transzkripciós faktorok expressziója az aggregációs stádiumban, illetve azt követően vált kimutathatóvá. Ezek, az előagyi, köztiagyi területeken expresszáló *emx2* (Simeone és mtsai, 1992), a ventrális előagyi és köztiagyi *dlx2* (Bulfone és mtsai, 1993) és a köztiagyi, középagyi (a 11,5. embrionális napig, ui. utána expressziója az utóagyi területekre is kiterjed) *otx3* (Zhang és mtsai, 2002) gének. A dorzális előagyi, köztiagyi, és ventrális utóagyi, gerincvelői területeken egyaránt expresszáló *pax6* (Manuel és Price, 2005), a közép-utóagyi határon, illetve, ettől kaudálisan és a thalamus bizonyos részein kifejeződő *gbx2* (Bouillet és mtsai, 1995; Chen és mtsai, 2009; Vieira és mtsai, 2009), valamint a második rombomérától kaudálisan expresszáló *hoxb2* gének expressziója (Wilkinson és mtsai, 1989) már a differenciáció első napjától kimutatható volt (16. Ábra).



16. Ábra: Az NE-4C sejtek idegi differenciációja során, különböző idegrendszeri területekre jellemző transzkripciós faktorok aktiválódtak. (RT-PCR)

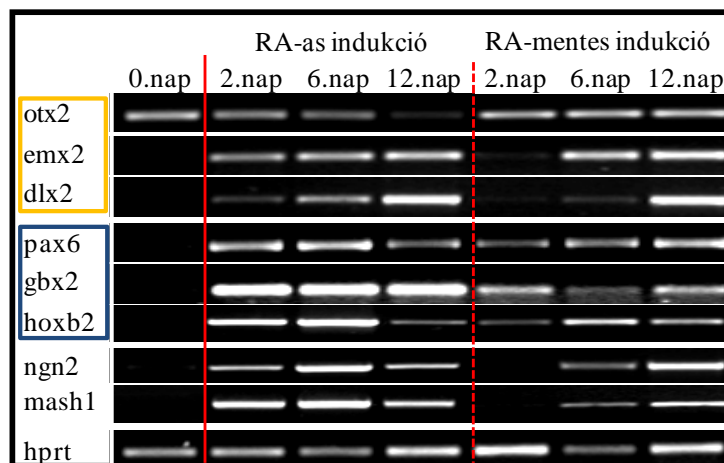
A sárgával jelölt gének kizárólag az anterior idegrendszeri területekre jellemzőek, míg a kézzel jelölt gének a középagy-utóagy határtól poszterior területeken (is) expresszálódnak. A 0. nap az indukátlan stádiumot jelöli. Az idegsejt képzés folyamatát génexpressziós szinten, a *mash1* és *ngn2* proneurális, és a posztmitotikus neuronokra jellemző *math2* gének expressziójával követtük nyomon.

A háztatrás gén HPRT (hipoxantin guanin foszforibozil transzferáz) PCR-termékének mennyisége arányos a minták össz cDNS-tartalmával.

A vizsgált gének közül tehát, azok, melyek a középagy-utóagy határtól kaudálisan elhelyezkedő idegrendszeri területek fejlődésében (is) szerepet játszanak, a RA-as indukció hatására szinte azonnal, a kizárólag anterior területekre jellemző transzkripciós faktorok expresszióját megelőzve aktiválódtak.

Mivel a RA „poszteriorizáló” hatással is rendelkezik (Avantaggiato és mtsai, 1996), továbbá ismert, hogy a *gbx2* ill *hoxb2* gének expresszióját a RA közvetlenül is képes indukálni (Bouillet és mtsai, 1995; Simeone és mtsai, 1990; Freemantle és mtsai, 2002), megvizsgáltuk, hogy a poszterior agyi területekre jellemző gének expressziója közvetlenül a RA hatására aktiválódott-e.

Az idegi differenciáció az NE-4C tenyészetekben (bár kisebb hatékonysággal) RA nélkül is kiváltható, a sejtek szérum mentes, MEM-F12-ITS definiált médiumba való helyezésével.



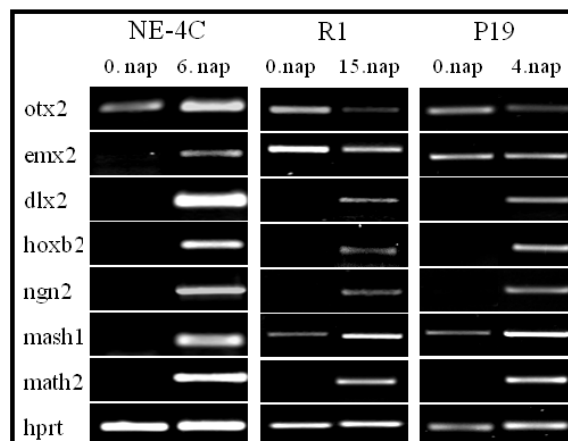
17. Ábra: A régió specifikus gének expressziós mintázata a RA-val illetve a RA nélkül indukált idegi differenciáció során. Az NE-4C sejteket szérum mentes, definiált médiumban (MEM-F12-ITS) indukáltuk retinsav jelenlétében illetve retinsav nélkül.

A különböző agyterületekre jellemző transzkripciós faktorok expressziója szérum mentes környezetben, mind a RA által indukált, mind a RA nélkül kiváltott differenciáció során aktiválódott (17. Ábra). Szérum mentes közegben, a RA által indukált differenciáció esetében az anterior területekre jellemző gének expressziója nem késett a kaudálisan (is) expresszálódó génekéhez képest. Elképzelhető azonban, hogy

nagyobb mintavételi frekvencia (azaz nagyobb időbeli felbontás) esetén megfigyelhettük volna a szérumos indukció esetén tapasztalt időbeli eltolódást.

Mindezeket összefoglalva tehát, az idegi fejlődés korai stádiumából származó, *in vitro* fenntartott NE-4C idegi őssejtek, nem mutattak regionális elkötelezettséget. A kiinduláskor homogén őssejt populációban, az idegrendszer különböző területeinek regionalizációjáért felelős gének expressziója indukálódott a differenciáció során.

Hogy lássuk, hogy a régió specifikus gének expressziójának terén megmutatkozó heterogenitás csupán az NE-4C sejtek *in vitro* idegi differenciációjára jellemző-e, a kísérleteket P19 illetve R1 sejtekkel is elvégeztük. Az RA-as indukciót megelőzően, az indukálatlan P19 és R1 sejtek, az *otx2* génen kívül, az *emx2* gént is kifejezték. Az idegi differenciáció során, a P19 és R1 tenyészetekben is különböző idegrendszeri területekre jellemző régió specifikus gének aktiválódtak (18. Ábra).



18. Ábra: Régió specifikus gének expressziója az R1 és P19 tenyészetekben. (RT-PCR).

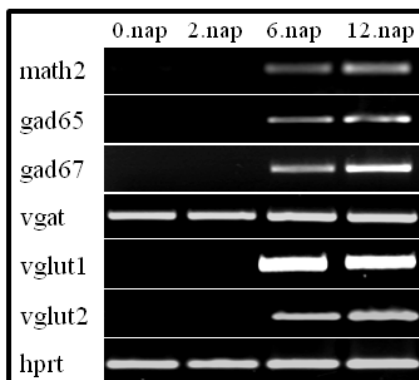
5.1.4. Az NE-4C őssejtekből különböző neurotranszmitter fenotípusú idegsejtek fejlődnek

Bár a progenitorok által expresszált régió specifikus transzkripciós faktorok, és a progenitorok által képzett idegsejtek típusa közötti kapcsolat sok esetben nem tisztázott, az idegsejtek típusát, ezen belül neurotranszmitter fenotípusát nagymértékben meghatározza az, hogy az adott idegsejt az idegrendszer mely területén „születik”. Néhány esetben ismert a régió specifikus transzkripciós faktorok, és az adott

neurotranszmitter fenotípusra jellemző gének expressziója közötti kapcsolat. A *Dlx2* transzkripciós faktor például, az előagyi GABA-erg sejtek kialakulásával hozható összefüggésbe, melynek során a *Dlx2* többek között, a *Gad67*, GABA szintetizáló enzim génjének expresszióját is indukálja (Anderson és mtsai, 1999; Schuurmans és Guillemot, 2002).

Következő kérdésünk tehát az volt, hogy a tenyészetekben expresszálódó régió specifikus transzkripciós faktorok heterogenitásának megfelelően, kialakulnak-e különböző neurotranszmitter fenotípussal rendelkező idegsejtek az NE-4C sejtek *in vitro* idegi fejlődése során.

Laboratóriumunk korábbi eredményei alapján tudtuk, hogy az NE-4C sejtek idegi fejlődése során kialakuló idegsejtek egy része erős GABA immunpozitivitást mutat (Jelitai és mtsai, 2004). Arról azonban nem volt információnk, hogy a GABA-t nem tartalmazó sejtek milyen neurotranszmitter fenotípussal rendelkeznek, illetve, hogy a GABA tartalmú sejtek más transzmitter fenotípusra jellemző markert is hordoznak-e.



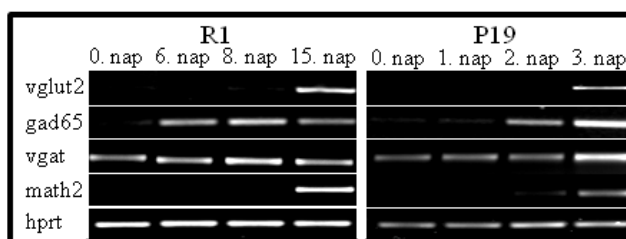
19. Ábra: GABA-erg és glutamaterg markerek expressziója az NE-4C sejtek idegi differenciációja során. (RT-PCR)

Az idegi differenciáció folyamán, RT-PCR módszerrel, génexpressziós szinten vizsgáltuk a *vgat* (vezikuláris GABA-transzporter) és *vglut2* (vezikuláris glutamát transzporter 2) vezikuláris transzportereket, illetve egyéb, GABA-erg (*gad-65*, *gad-67*) és glutamaterg (*vglut1*) markereket.

Az NE-4C sejtek RA-val indukált tenyészeiben, a posztmitotikus idegsejtekre jellemző *math2* génnel egy időben, mind a GABA-erg idegsejtekre jellemző GABA-szintetizáló enzimek (*gad65*, *gad67*) (Soghomonian és Martin, 1998), mind a

glutamaterg sejtekre jellemző *vglut1*, *vglut2* vezikuláris glutamát transzporterek expressziója megjelenik (Varga és mtsai, 2008) (19. Ábra).

A GABA-erg sejtekre jellemző *VGAT* (vezikuláris GABA transzporter) fehérje génje az indukátlan NE-4C tenyészetekben is kifejeződött, és az idegi fejlődés során végig aktív maradt. A következő fejezetben bemutatott eredmények alapján, a *VGAT* fehérje szinten is jelen volt az indukátlan NE-4C őssejtekben (lásd 32. Ábra). Oh és munkatársai már korábban leírták, hogy a *vgat* mRNS jelen van a P19 őssejtvonalban, ES sejtekből származtatott idegi őssejtekben, illetve a fejlődés során már a neuronok tömeges megjelenése előtt, az embrionális fejlődés 10. napján, kimutatható a fejlődő egér idegrendszerben (Oh és mtsai, 2005). Andäng és munkatársai (2008) az ES sejtekben és egyes idegi progenitor populációkban mutatták ki a *VGAT* jelenlétét. A *VGAT* őssejtekben betöltött funkciója azonban, még nem ismert. A *vgat* gén mRNS-e, vizsgálataink szerint is jelen volt az indukátlan P19 és R1 sejtekben, majd végig a RA-val indukált *in vitro* differenciáció során. A *math2* gént expresszáló P19 és R1 tenyészetekben a *vglut2* és a *gad65* gén is kifejeződött (20. Ábra).



20. Ábra: A P19 és R1 tenyészetekben a GABA-erg sejtekre jellemző *gad65* és a glutamaterg idegsejtekre jellemző *vglut2* markerek egyaránt aktiválódtak az idegi differenciáció során. (RT-PCR)

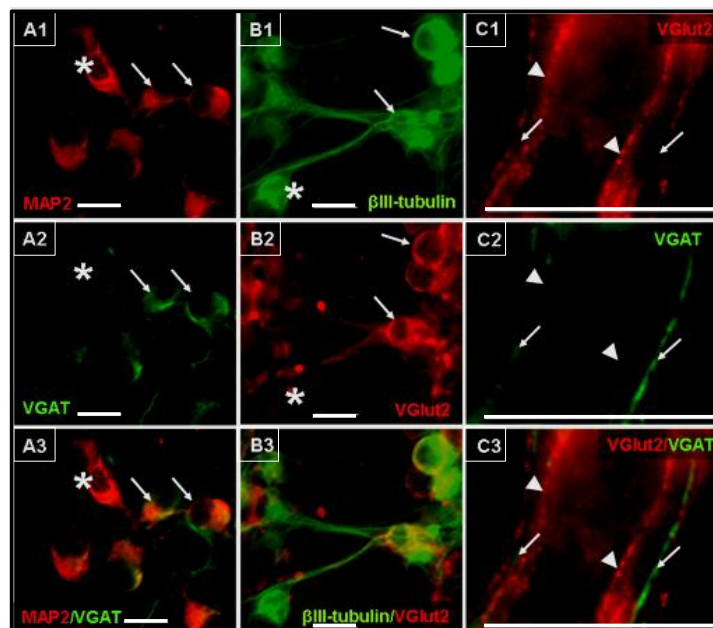
Az NE-4C sejtekből képződő idegsejtek neurotranszmitter fenotípusának további vizsgálatára, érett idegsejteket tartalmazó NE-4C tenyészeteken végeztünk immuncitokémiai festéseket.

A glutaminsav szinaptikus vezikulákba való transzportálásáért felelős vezikuláris glutamát transzporterek közül, a *VGlut1* (vezikuláris glutamát transzporter 1) *in vivo* csupán a születés utáni második héten jelenik meg jelentős mértékben az idegsejtekben, míg a *VGlut2* (vezikuláris glutamát transzporter 2) már az embrionális fejlődés során megjelenik az idegrendszerben (Boulland és mtsai, 2004). Az NE-4C tenyészetekben ezért, a glutamaterg idegsejtek kimutatására *VGlut2* ellenanyagot használtunk. A

GABA-erg sejteket GABA-tartalmuk mellett, *VGAT* (Ebihara és mtsai, 2003; Oh és mtsai, 2005) tartalmuk alapján azonosítottuk. A szerotonerg sejtek festésére 5-HT (szerotonin), a katekolaminerg sejtek festésére *TH* (*tirozin-hidroxiláz*) ellenanyagokat használtunk.

A differenciáció 14. napján, az NE-4C idegsejtek nagyjából fele-fele arányban voltak GABA ill. *VGlut2* pozitívak (56.6±9.1 %, ill. 44.2±1.6 %). Szerotonerg sejtek csak igen kis arányban (<1%) fordultak elő a tenyészetekben, míg *TH*-pozitív, katekolaminerg sejtek nem voltak kimutathatók az NE-4C idegsejtek között (Varga és mtsai, 2008).

A *VGlut2*/*VGAT* kettős festés esetén, a RA-val indukált differenciáció 14. napján, a két marker elkülönülő, egymással át nem fedő festési mintázatot mutatott (21. Ábra). Ez azt jelenti, hogy a tenyészetekben voltak kizárólag GABA-erg és kizárólag glutamaterg markerre festődő sejtek. Nem arról van tehát szó, hogy az in vitro fejlődés során, az in vivo jelen levő szabályozó folyamatok hiányában, egy azon sejten belül több neurotranszmitter fenotípusra jellemző differenciációs útvonal is aktiválódott volna.



21. Ábra: Az NE-4C sejtek differenciációja során különböző neurotranszmitter fenotípusú idegsejtek alakultak ki. (A): Kettős immuncitokémiai festés a *MAP2* (piros) általános idegsejt és *VGAT* (zöld) GABA-erg markerre. A *MAP2* pozitív sejtek között elkülöníthető volt egy *VGAT* negatív (csillag) és egy *VGAT* pozitív (nyilak) populáció. **(B):** *βIII-tubulin* (zöld), *VGlut2* (piros) kettős festés. A *Vglut2* negatív idegsejtek csillaggal, a *Vglut2* pozitív idegsejtek nyilakkal jelöltek. **(C):** *VGAT* (zöld), *VGlut2* (piros) kettős festés. A nyilak a *VGAT* pozitív, *Vglut2* negatív nyúlványokra, a nyílfejek a *VGlut2* pozitív *VGAT* negatív nyúlványokra mutatnak. Mérték: 10 µm

Az egy sejt eredetű őssejtek RA-val indukált *in vitro* differenciációja során tehát, a különböző régió specifikus gének expressziójával párhuzamosan, különböző idegsejt fejlődési programok indulhatnak el.

A regionális gén-expresszió és az idegi elköteleződés összefüggéseinek további vizsgálataira az NE-4C őssejtek *emx2* pozicionális gént expresszáló al-klónjait hoztuk létre.

5.2. AZ *EMX2* TRANSZKRIPCIÓS FAKTOR HATÁSA AZ ŐSSEJT FENOTÍPUSRA ÉS AZ IDEGI FEJLŐDÉS FOLYAMATÁRA

Az *Emx2* transzkripció faktor az idegrendszer-kezdemény formálódásának kezdeti lépéseitől, egérben nagyjából a 8,5. embrionális naptól fogva jelen van az anterior neuroektoderma területén (Simeone és mtsai, 1992), és az idegi fejlődés során meghatározó szerepet játszik a prosencephalikus területek regionalizációjában (Yoshida és mtsai, 1997; Mallamaci és mtsai, 2000; Bishop és mtsai, 2000, 2003; Kimura és mtsai, 2005).

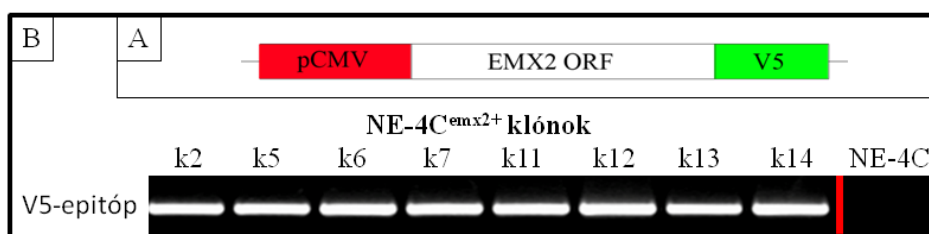
Az *Emx2* transzkripció faktornak az idegrendszer fejlődésében játszott szerepe eddig főleg az idegrendszeri régiók kialakulásának szintjén ismert, az *Emx2* sejtszintű hatásairól azonban keveset tudunk. Az *Emx2* sejtszintű funkcióinak vizsgálatára az NE-4C sejteknek olyan transzfektált klónjait hoztuk létre, melyek indukálatlan állapotban, majd végig az idegi differenciáció során folyamatosan expresszálják az *emx2* gént (22. Ábra, 29. Ábra).

5.2.1. *Emx2*-t túltermelő NE-4C klónok létrehozása

Az *emx2* gén az indukálatlan NE-4C sejtekben inaktív, és csak a sejtek idegi differenciációja során kezd el expresszálódni (16. Ábra).

Az indukálatlan NE-4C sejteket az *emx2* gén fehérje-kódoló régióját tartalmazó plazmiddal transzfektáltuk (Rosella Galli ajándéka). Az *emx2* szekvencia a konstitutívan aktív CMV (citomegalovírus) promoter irányítása alatt áll, így folyamatosan átíródik a sejtekben (22./A Ábra). A transzfektált sejteket antibiotikum rezisztencia alapján, Blastidicinnel (5µg/ml) szelektáltuk, majd a szekvenciát stabilan hordozó sejtekből

klónokat hoztunk létre. A klónok minden egyes sejtje egyazon transzfektált sejtből származott, ami azt jelentette, hogy az *emx2*-konstrukció egy klónon belül minden sejtben azonos helyen integrálódott a genomba. Az *emx2* transzgén kifejeződésének ellenőrzésére, a konstrukció egy virális eredetű, V5 epitóp szekvenciát tartalmazott az *emx2* kódoló szekvenciája után, így jelölte mind a transzgénről átíródott *emx2* mRNS-t, mind az erről lefordítódott *Emx2* fehérjét. Az általunk létrehozott klónok közül nyolc olyat találtunk, melyben konstitutívan kifejeződött az *emx2* transzgén (NE-4C^{*emx2*+} klónok) (22./B Ábra). Az NE-4C^{*emx2*+} klónok az NE-4C sejtekhez hasonlóan, epitél sejtalakkal rendelkeznek, az őssejt állapot fenntartását támogató körülmények mellett, folyamatosan osztódnak, és számos osztódási cikluson keresztül stabilan fenntarthatóak.



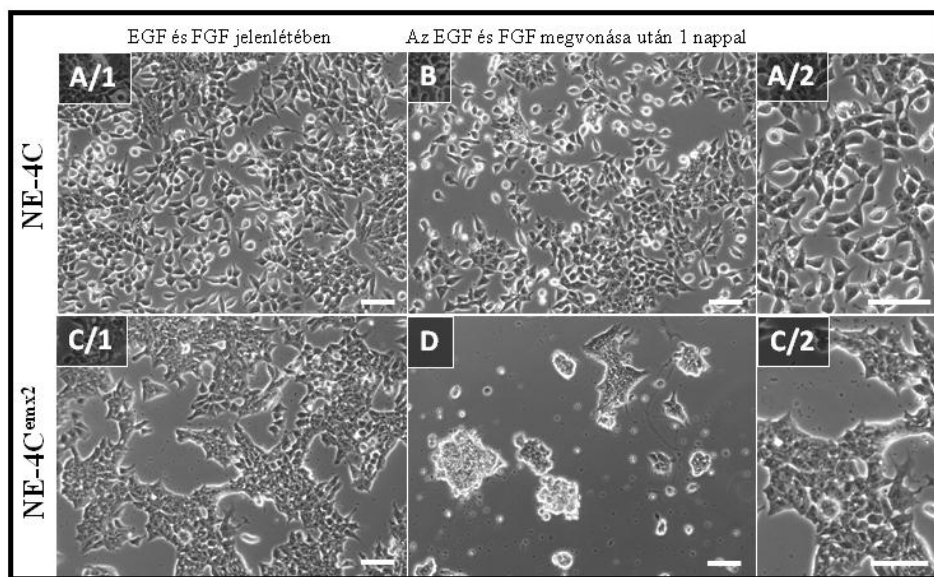
22. Ábra: Az *emx2*-t konstitutívan expresszáló, NE-4C^{*emx2*+} klónok létrehozása.

(A): Az általunk használt lentivírus alapú plazmid konstrukcióban, az *emx2* gén fehérjekódoló régiójának expresszióját a konstitutívan aktív CMV promóter hajtotta meg. Az *emx2*-t kódoló régió 3' végéhez a transzgén jelölésére szolgáló, V5 epitópot kódoló szakasz volt kapcsolva. (B): Az *emx2* konstrukciót hordozó klónok (k2-k14). A transzgénről való *emx2* expressziót a V5 epitópot kódoló szakaszra tervezett primerpárral mutattuk ki (RT-PCR).

A nyolc klón közül a további vizsgálatokra a k11-es jelű klónt (a továbbiakban NE-4C^{*emx2*+}) választottuk ki.

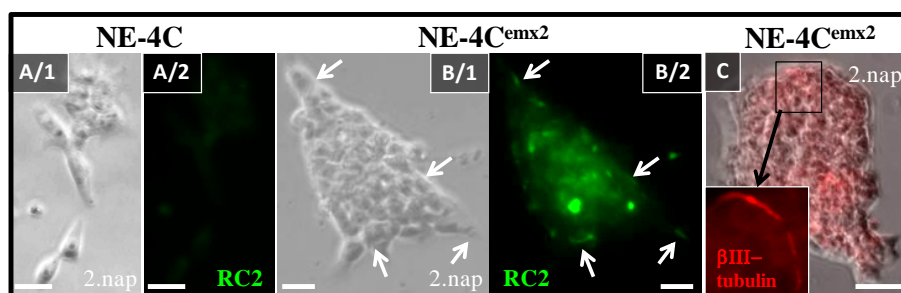
5.2.2. Az *emx2* transzkripciós faktor túlexpresszáltatása megváltoztatja az NE-4C sejtek adhéziós tulajdonságait

Az NE-4C sejtekkel ellentétben, melyek lazább sejtréteget alkottak, az NE-4C^{emx2+} sejtek aggregátum-szerű (de egy- sejt-réteget alkotó), tömött foltokban nőttek (23./A, C Ábra). Videomikroszkópos felvételek (be nem mutatott eredmények), (PLL aljzaton, 5% FCS-t tartalmazó tápoldatban), azt mutatták, hogy az NE-4C^{emx2+} sejtek osztódás után nagy valószínűséggel együtt maradnak, míg az NE-4C sejtek utódsejtjei egymástól eltávolodnak. Az NE-4C^{emx2+} sejtek az aljzaton való mozgás közben találkozási gyakrabban maradtak egymás mellett, mint az NE-4C sejtek. Az adhéziós különbség azt jelezte, hogy az NE-4C^{emx2+} sejtek feltételezhetően erősebb a sejt-sejt kapcsolatokat, és/vagy gyengébb a sejt-aljzat kapcsolatokat képeznek.



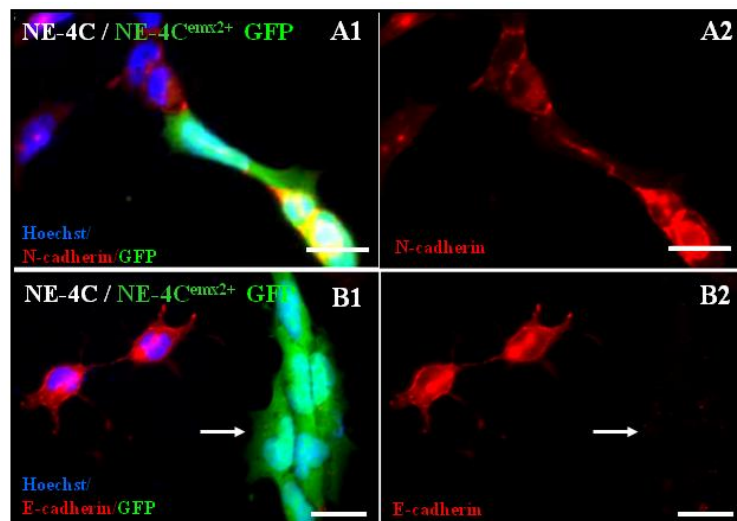
23. Ábra: Az *emx2* transzgén expressziójának hatására, az NE-4C sejtek adhéziós tulajdonságai megváltoztak. Az indukátlan NE-4C sejtek a tenyésztőaljzaton viszonylag egyenletesen helyezkednek el (A/1). Az NE-4C^{emx2+} sejtek ezzel ellentétben, aggregált, tömött foltokban nőnek (C/1). Az A/2 és C/2 képek az A/1 és C/1 képek egy-egy kinagyított területét mutatják. A szérum mentes, definiált közegben (MEM-F12-ITS), a differenciálatlan állapotot fenntartó növekedési faktorok (EGF, FGF2) megvonásával indukáltuk az idegi differenciációt. Az EGF és FGF2 megvonását követően, az idegi differenciáció első, morfológiailag megfigyelhető jele, az aggregátum képzés, az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben hamarabb megfigyelhető volt (D), mint az NE-4C sejtek esetén (B). Fénymikroszkópos, fáziskontraszt felvételek. Mérték: 50 μ m

Szérum mentes (MEM-F12-ITS) környezetben, az *EGF* és *FGF2* növekedési faktorok megvonásának hatására, az NE-4C^{emx2+} sejtek gyorsabban képeztek aggregátumokat, mint az NE-4C sejtek. Az *EGF* és *FGF2* megvonás után egy nappal, az NE-4C^{emx2+} sejtek már kompakt aggregátumokba tömörültek, míg az NE-4C tenyészetek morfológiája a növekedési faktorok jelenlétében fenntartott, indukátlan tenyészetekéhez képest nem mutatott különbséget (23./B, D Ábra). Az NE-4C sejtek differenciációjának első, morfológiailag is elkülöníthető lépése a sejtek aggregációja. Laboratóriumunk korábbi munkája alapján tudjuk, hogy ez a lépés elengedhetetlen az idegsejtek későbbi kialakulásához. (Tárnok és mtsai, 2002). Ennek megfelelően, az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben, az *EGF* és *FGF* növekedési faktorok megvonásának hatására gyorsabban bekövetkeztek a differenciációs lépések. Míg az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben 1,5-2 nap alatt megjelentek az RC2-pozitív sejtek és a *βIII-tubulin* pozitív idegsejtek, addig az NE-4C sejtek a növekedési faktor megvonás utáni második napon még egyöntetűen epithél morfológiával rendelkeztek, és a tenyészetekben sem RC2-pozitív sejtek, sem *βIII-tubulin* pozitív idegsejtek nem voltak jelen (24. Ábra).



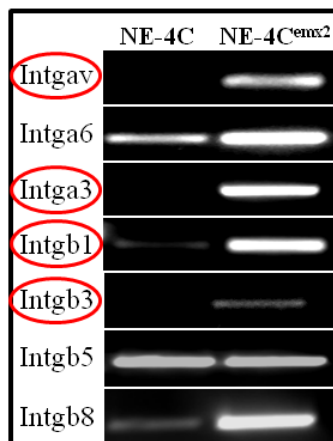
24. Ábra: A differenciálatlan állapotot fenntartó növekedési faktorok (*EGF*, *FGF2*) megvonásával indukált idegi differenciáció során, az *emx2* transzgén expresszáló sejtek tenyészetében hamarabb megjelentek az RC2-pozitív sejtek, és a *βIII-tubulin* pozitív idegsejt előalakok. (A): NE-4C sejtek, az *EGF* és *FGF2* megvonás utáni második napon. Fáziskontraszt kép (A1) és RC2 immuncitokémiai festés (zöld) (A2). Az ábrán látható, hogy az NE-4C sejtek a növekedési faktor megvonás utáni második napon még az indukátlan sejtekéhez hasonló morfológiát mutattak, és a tenyészetekben még nem jelentek meg az RC2-pozitív sejtek. NE-4C^{emx2+} tenyészetekben az *EGF* és *FGF* megvonását követő második napon már kialakultak az aggregátumok (B1, C), melyeknek a belsejében megjelentek az első RC2-pozitív (zöld) radiális glia szerű sejtek (B2), és *βIII-tubulin* pozitív (piros) (C) idegsejtek. A (B) ábrán, a radiális glia szerű sejtek RC2-re festődő (zöld), nyúlványait nyilak jelzik. A (C) ábrán, a fáziskontraszt kép és a *βIII-tubulin* fluoreszcens festés (piros) képe egymásra van vetítve. Az ábra bal alsó csücskében, a bekeretezett rész nagyítása látható, fáziskontraszt nélkül. Mérték: A és B esetén 20 μm, C esetén 50 μm

Az NE-4C^{emx2+} sejtek megváltozott adhéziós tulajdonságai alapján arra következtethettünk, hogy az *emx2* gén folyamatos expressziója hatással volt a sejtek adhéziós molekula készletére. Az indukátlan NE-4C sejtek, a sejt-sejt kapcsolatokban központi szerepet játszó klasszikus cadherin molekulák közül, *E-* és *N-cadherint* is hordoznak a felszínükön (Tárnok és mtsai, 2002, 25. Ábra). Az NE-4C^{emx2+} sejtek azonban, indukátlan állapotban *E-cadherint* nem hordoznak a felszínükön kimutatható mennyiségben (25. Ábra). Hasonló csökkenés figyelhető meg az NE-4C sejtek *E-cadherin* készletében RA-as indukció hatására (Tárnok és mtsai, 2002).



25. Ábra: Az NE-4C és az NE-4C^{emx2+} sejtek eltérő cadherin készlettel rendelkeznek. A festéseket NE-4C sejtek és a GFP-jelölt NE-4C^{emx2+} sejtek (zöld) kokultúrájában végeztük. *E-cadherin* (piros) (A) és *N-cadherin* (piros) (B) immuncitokémiai festések. A B2 ábrán a nyíl egy *E-cadherin*-negatív NE-4C^{emx2+GFP} sejtcsoportot jelez. Mérték: 20 μ m

Az indukátlan NE-4C^{emx2+} sejtek integrin-expressziója is változást mutatott az NE-4C sejtekéhez képest (26. Ábra). Míg a megváltozott integrin-expresszió a sejt-extracelluláris mátrix kapcsolatok, a sejtek cadherin készletében tapasztalt változások a sejt-sejt kapcsolatok megváltozásáért lehetnek felelősek.



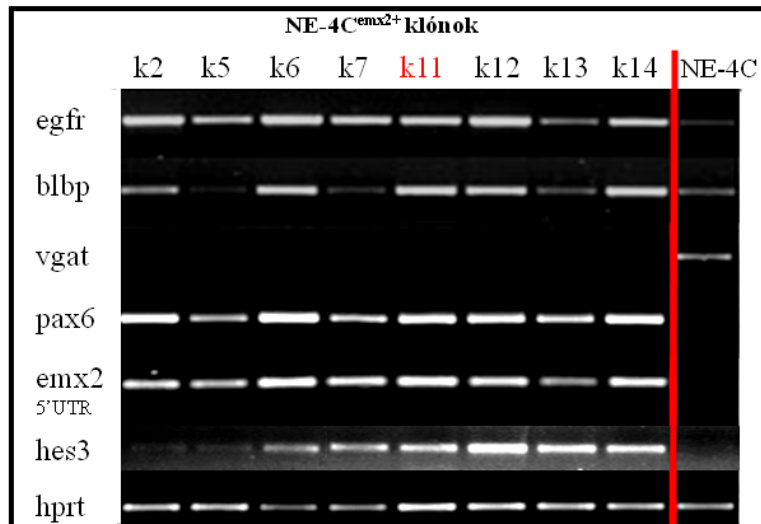
26. Ábra: Az *emx2* expresszió hatására, az NE-4C sejtek integrin-készlete megváltozott. (RT-PCR) A kísérlet során azoknak az integrineknek az expresszióját vizsgáltuk az indukálatlan NE-4C ill. NE-4C^{emx2+} tenyészetekben, melyek jellemzőek az embrionális és/vagy felnőtt központi idegrendszerre. Azoknak az integrineknek a nevét, melyek expressziójában jelentős (a szemikvantitatív RT-PCR módszerrel elemezhető) különbségeket tapasztaltunk az NE-4C és NE-4C^{emx2+} sejtek között, pirossal jelöltem.

5.2.3. Az *emx2* gén kifejeződésének hatására az indukálatlan NE-4C sejtekben számos, az idegi fejlődésben meghatározó szerepet játszó gén expressziója megváltozik

Az indukálatlan NE-4C sejtekben nincs jelen az *emx2* mRNS, és az *emx2* gén csak az idegi differenciációval aktiválódik (16. Ábra, 30. Ábra). Az indukálatlan NE-4C^{emx2+} sejtekben azonban az *emx2*-transzgén mellett, az endogén *emx2* gén is aktív (27. Ábra). Az endogén *emx2* génaktivitást az átíródó mRNS fehérjét nem kódoló részének (*emx2* 5'UTR –untranslated region-) kimutatásával vizsgáltuk. A transzgénről átíródó mRNS ezt a szakaszt nem tartalmazta. Az endogén *emx2* génaktivitás az összes NE-4C^{emx2+} klónban kimutatható volt (27. Ábra). Úgy tűnik tehát, hogy (közvetlenül vagy közvetve) az *Emx2* transzkripciós faktor képes a saját expresszióját pozitívan szabályozni.

Az indukálatlan NE-4C^{emx2+} sejtek a *pax6* régió specifikus transzkripciós faktort is expresszálják (27. Ábra), míg az NE-4C sejtekben csak az idegi differenciáció megindulásával kezd kimutathatóvá válni a *pax6* (16. Ábra, 31. Ábra). A dorzális előagy területén, a kérgi idegsejtek kialakulásának időszakában, a *pax6* gén a ventrikuláris zónában, a radiális glia sejtekben expresszálódik (Walther és Gruss, 1991), és fontos szerepet játszik többek között a radiális glia fenotípus fenntartásában.

A *pax6* gén mellett, a *blbp* radiális glia marker is emelkedett expressziós szintet mutatott az NE-4C^{emx2+} klónok többségében, köztük az általunk részletesebben vizsgált k11 klónban (27. Ábra).



27. Ábra: Az indukátlan NE-4C^{emx2+} sejtekben, számos, az idegi fejlődésben meghatározó szerepet játszó gén expressziója mutatott változást az NE-4C sejtekhez képest. (RT-PCR)

k2-k14: Az *emx2* transzgén konstítutívan expresszáló, NE-4C^{emx2+} klónok. Piros vonallal elválasztva, az indukátlan NE-4C sejtek expressziós mintázata látható.

emx2 5'-UTR: Az *emx2* mRNS fehérjévé át nem íródó (5'-UTR) részére tervezett primerpárral felszaporított PCR-termék (az endogén *emx2* gén termékének jelenlétét jelzi).

A *Hes* transzkripciós faktorok az őssejt fenotípus fenntartásáért felelősek. A korai neuroepitél nem expresszál *Hes* transzkripciós faktorokat. A fejlődés előrehaladtával, a (késői) neuroepitéliális őssejt, majd a radiális glia fenotípus fennmaradása *Hes*-függővé válik (Hatakeyama és mtsai, 2004). Az NE-4C sejtek indukátlan állapotban nem, vagy csak igen kis mértékben expresszálnak *hes* géneket. Az NE-4C sejtek idegi differenciációjával a *hes1*, *hes3* és *hes5* gének mRNS szintje jelentős mértékben nő (be nem mutatott eredmények). Az NE-4C^{emx2+} klónok sejtei azonban, az NE-4C sejtekkel ellentétben, indukátlan állapotban is expresszálják a *hes3* gént (27. Ábra).

Az NE-4C^{emx2+} klónokban az *EGF-receptor (egfr)* mRNS szintje is magasabb volt, mint az NE-4C sejtekben (27. Ábra). Az NE-4C sejtek esetén az *egfr* expresszió a kezdeti alacsony szint után, az idegi differenciáció során válik kifejezetté (be nem mutatott eredmények). Az egér idegrendszer fejlődése során az idegi őssejtek kezdetben

(körülbelül az embrionális fejlődés 8,5. napjától) az *FGF2* növekedési faktorra érzékenyek. Az *EGF* receptor csak a fejlődés későbbi stádiumaiban jelenik meg a felszínükön, és csak ezután válnak *EGF*-érzékennyé (Tropepe és mtsai, 1999).

A fentiek alapján, az $NE-4C^{emx2+}$ sejtek sok sajátosága nem az indukátlan $NE-4C$ sejtekkel, hanem a RA-val indukált, az idegi fejlődés „elköteleződési” stádiumában járó $NE-4C$ sejtekkel mutatnak hasonlóságot. Ezek alapján feltételezhető, hogy az $NE-4C$ sejtekhez képest a fejlődés előrehaladottabb stádiumában vannak. Az $NE-4C^{emx2+}$ sejtek azonban, az $NE-4C$ sejtekhez hasonlóan, epitel morfológiával rendelkeznek, és RC2-negatívak. Annak ellenére tehát, hogy az idegsejt képző radiális glia fenotípus fenntartásáért felelős *pax6* gént, és a radiális glia marker *blbp* gént is expresszálják, az $NE-4C^{emx2+}$ sejtek nem feleltethetőek meg az $NE-4C$ sejtek idegi fejlődése során megjelenő első, radiális glia szerű, RC2 pozitív sejtípusnak.

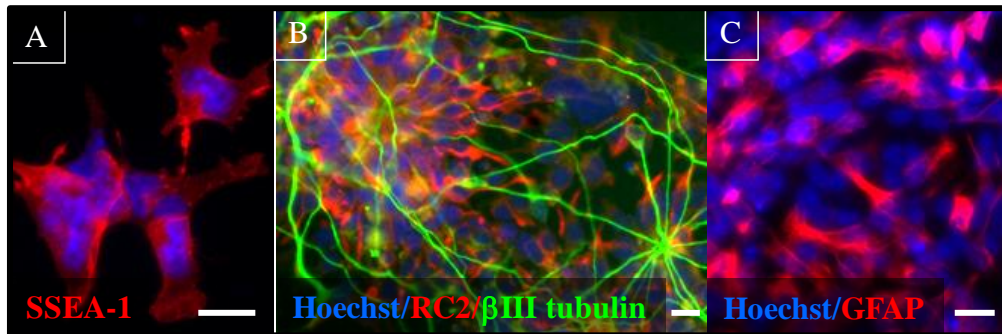
5.2.4. Az *emx2* túlexpresszálatása nem gátolta az ideg- illetve asztroglia sejtek kialakulását

Az előzőekben láthattuk, hogy az *emx2* transzgen megváltoztatta az $NE-4C$ sejtek adhéziós sajátosságait, és befolyásolta egyes fejlődést szabályozó gének expresszióját. Az eredmények arra engedtek következtetni, hogy az $NE-4C^{emx2+}$ sejtek az idegi fejlődésben „előrébb járó” fenotípust képviseltek, mint az $NE-4C$ sejtek, így elképzelhető volt, hogy az $NE-4C^{emx2+}$ sejtek a fejlődési potenciáljukban is különböznek az $NE-4C$ sejtektől.

Az idegrendszer fejlődése során, az *emx2* gén túlnyomórészt az idegi progenitorokban expresszálódik, azok differenciáltabb utódsejtjeiben, így a legtöbb idegsejtben, gliasejtben nem. Felmerült a kérdés, hogy ha az $NE-4C^{emx2+}$ sejtek idegi fejlődése során az *emx2* gén expressziója nem hallgatott el, akkor gátlódott-e az idegsejt illetve asztroglia képződés.

Az $NE-4C^{emx2+}$ sejtek, az $NE-4C$ sejtekhez hasonlóan, epitel morfológiájú, *nestin* és SSEA-1 idegi őssejt markerre immunopozitív sejtek. A $NE-4C^{emx2+}$ sejtek differenciációja során RC2-pozitív, radiális morfológiájú sejtek, idegsejtek majd asztroglia sejtek is kialakulnak, az $NE-4C$ sejtekhez hasonló arányban (28. Ábra). Csakúgy, mint az $NE-4C$ sejtek idegi fejlődése esetén, az $NE-4C^{emx2+}$ sejtek

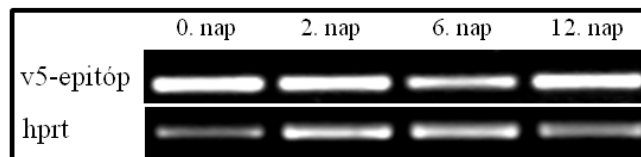
differenciációja során is fennmarad egy SSEA-1 pozitív őssejt populáció az idegsejteket és asztroglia sejteket is tartalmazó tenyészetekben (be nem mutatott eredmények). Az NE-4C^{emx2+} sejtek tehát, csakúgy, mint az NE-4C sejtek, idegi őssejt tulajdonságokkal rendelkeztek, az *emx2* túl-expresszáltatása az asztroglia és idegsejt képzés mértékét lényegesen nem befolyásolta.



28. Ábra: Az NE-4C^{emx2+} sejtek RC2-pozitív radiális glia szerű sejtek (B), idegsejtek (*βIII-tubulin*) (B) és asztroglia sejtek (*GFAP*) (C) létrehozására is képesek voltak. Az indukátlan NE-4C^{emx2+} sejtek festődtek az SSEA-1 őssejt markerre (A). (Immuncitokémiai festés)
A sejtmagokat Hoechst festéssel jelöltük.
Mérték: 20 μm

5.2.5. Az NE-4C^{emx2+} sejtek regionálisan elkötelezetlenek maradtak

Az NE-4C^{emx2+} sejtek RA-val indukált idegi differenciációja során, az *emx2* transzgén végig aktív maradt (29. Ábra).

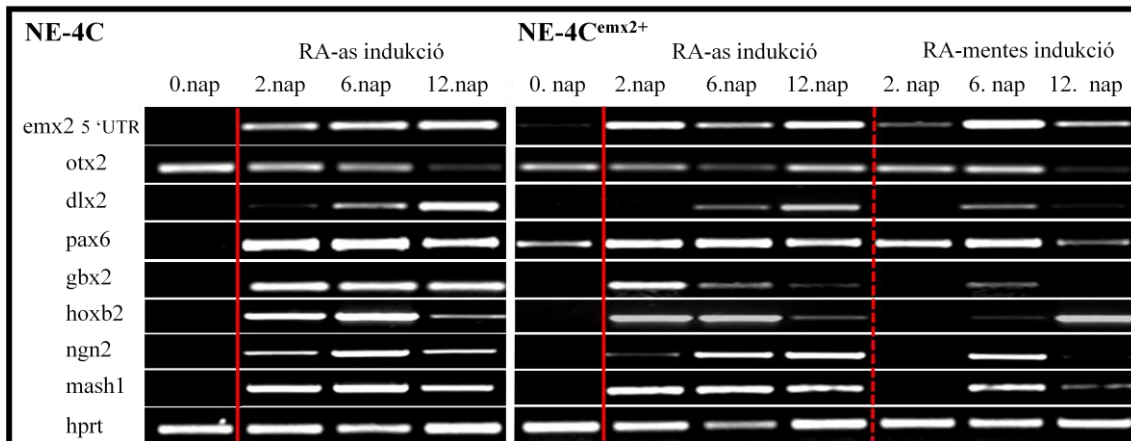


29. Ábra: Az NE-4C^{emx2+} sejtek retinsavval indukált idegi differenciációja során, az *emx2* transzgén végig aktív maradt. (RT-PCR) A transzgénről való *emx2* expressziót a V5 epitópot kódoló szakaszra tervezett primerpárral mutattuk ki.

A differenciáció során, a transzgén *emx2* mellett, az endogén *emx2* gén is aktív volt. (30. Ábra). Kizárhattuk tehát azt a lehetőséget, hogy az *emx2* transzgén expressziójának

hatására az endogén *emx2* gén expressziója leszabályzódott, és ez által a transzgén *emx2* szint kompenzálódhatott volna.

A folyamatosan aktív *emx2*-átírás ellenére, az NE-4C sejtekhez hasonlóan, az NE-4C^{*emx2*+} sejtek idegi fejlődése során is aktiválódtak különböző agyi régiók fejlődését szabályozó *dlx2*, *gbx2*, *hoxb2*, *ngn2* és *mash1* transzkripciós faktorok (30. Ábra).



30. Ábra: Az NE-4C sejtekhez hasonlóan, az NE-4C^{*emx2*+} sejtek retinsavval indukált differenciációja során is aktiválódtak a különböző központi idegrendszeri régiókra jellemző transzkripciós faktorok. (RT-PCR) Az NE-4C és NE-4C^{*emx2*+} sejteket, szérum mentes, definiált médiumban (MEM-F12-ITS), 48 órás retinsav kezeléssel, illetve RA-nélkül indukáltuk.

emx2 5'-UTR: Az *emx2* mRNS fehérjévé át nem íródó (5'-UTR) részére tervezett primerpárral felszaporított PCR-termék (az endogén *emx2* gén termékének jelenlétét jelzi)

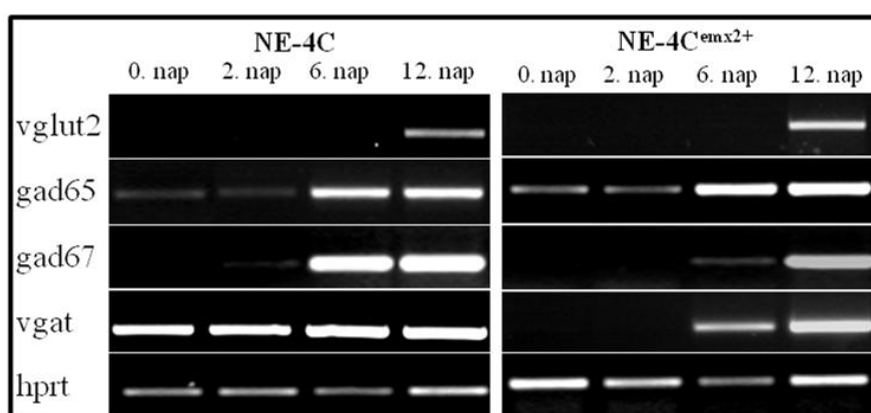
Az eredmények alapján elképzelhetőnek tartottuk, hogy bár az *emx2*-expresszió hatására az NE-4C sejtek regionális identitása anterior irányban tolódott el, a RA poszteriorizáló hatása ellensúlyozta az *emx2* hatást. Ezért megvizsgáltuk, hogy a RA nélkül indukált idegi fejlődés során hogyan alakul a különböző régió specifikus gének expressziója. A RA nélkül, növekedési faktor megvonással indukált idegi fejlődés során azonban, ugyanúgy aktiválódott az összes általunk vizsgált régió specifikus és proneurális gén, mint a RA-val indukált idegi differenciáció során. (30. Ábra)

Az NE-4C^{*emx2*+} sejtek tehát, annak ellenére, hogy (indukátlan állapotban is) expresszálják az az anterior neuroektoderma regionalizációjában kulcsfontosságú szerepet játszó *emx2*, *otx2* és *pax6* géneket, regionálisan elkötelezetlenek maradnak.

5.2.6 Az NE-4C^{emx2+} sejtek GABA-erg és glutamaterg idegsejtek képzésére is képesek maradtak

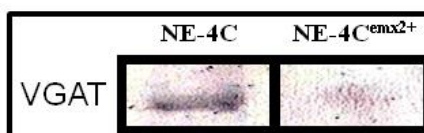
Bár az *Emx2* transzkripciós faktorról nem ismert, hogy az idegsejtek neurotransmitter fenotípusának kialakításában közvetlen szerepe lenne, regionális és időbeli expressziós mintázata alapján feltételezhető, hogy a kérgi glutamaterg neuronok neurotransmitter fenotípusának kialakulásában szerepet játszhat.

Felvetődött a kérdés: képesek-e az NE-4C^{emx2+} sejtek az NE-4C sejtekhez hasonlóan mind GABA-erg mind glutamaterg idegsejtek létrehozására?



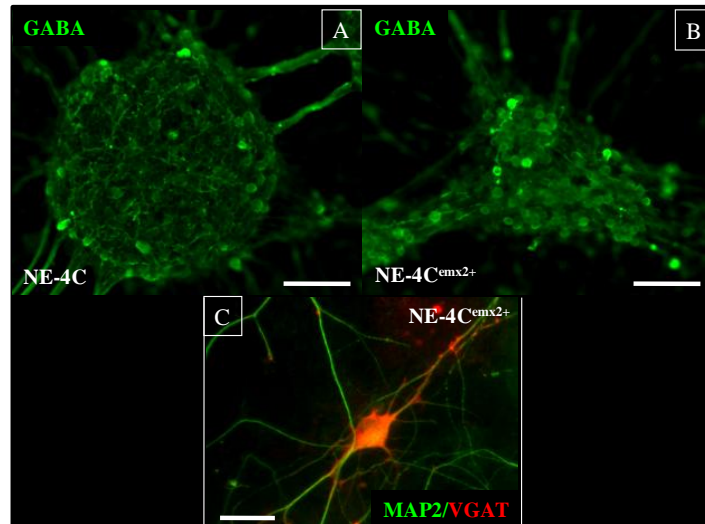
31. Ábra: GABA-erg és glutamaterg markerek expressziója az NE-4C és NE-4C^{emx2+} sejtek RA-val indukált idegi differenciációja során. (RT-PCR)

Az NE-4C^{emx2+} klónok, az NE-4C klónnal ellentétben, nem expresszálták a *vgat* vezikuláris GABA-transzporter gént, és ennek megfelelően nem tartalmazták a *VGAT* fehérjét sem (27. Ábra, 31. Ábra, 32. Ábra). Az NE-4C^{emx2+} sejtek idegi fejlődése során azonban, mind a *vgat* génnek mind a GABA-szintézis kulcsenzimeinek (*gad65* és *gad67*), az expressziója aktiválódott (31. Ábra).



32. Ábra: Az NE-4C sejtekkel ellentétben, az NE-4C^{emx2+} sejtekben indukátlan állapotban nem volt jelen a vezikuláris GABA transzporter (*VGAT*). (Western blot)

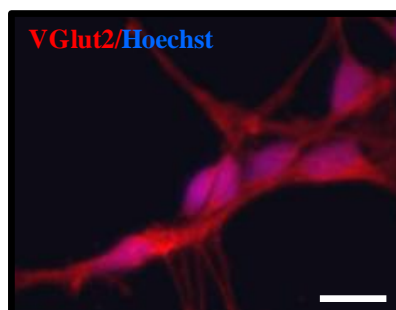
A RA-val indukált idegi differenciáció 12. napján az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben kimutathatóak voltak VGAT immunopozitív idegsejtek, és az NE-4C^{emx2+} idegsejtek jelentős hányada mutatott GABA immunopozitivitást (33. Ábra).



33. Ábra: Az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben GABA-erg markerekre pozitív idegsejtek akultak ki. A retinsavval indukált differenciáció 12. napján, az idegsejtek jelentős része festődött GABA-ra mind az NE-4C (A), mind az NE-4C^{emx2+} (B) sejtek esetén. (C): Az NE-4C^{emx2+} sejtek idegi differenciációja során kialakuló idegsejtek egy része VGAT-pozitív volt. Mérték: 80µm A és B esetén, 20 µm C esetén

Az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben a RA-val indukált idegi differenciáció 12. napján *Vglut2* pozitív immunopozitív idegsejteket, és a *vglut2* mRNS-t is kimutattuk (34. Ábra, 32. Ábra).

Az NE-4C^{emx2+} sejtek tehát az NE-4C sejtekhez hasonlóan, GABA-erg és glutamaterg idegsejtek létrehozására is képesek voltak.



34. Ábra: *Vglut2* pozitív idegsejtek NE-4C^{emx2+} sejtek idegi differenciációjának 12. napján. (Immuncitokémiai festés). A sejtmagokat Hoechst (kék) festéssel tettük láthatóvá. Mérték: 20 µm

5.2.7. A retinsavval indukált NE-4C^{emx2+} tenyészetekben katekolaminerg, szerotonerg és kolinerg markerek is kimutathatóak voltak

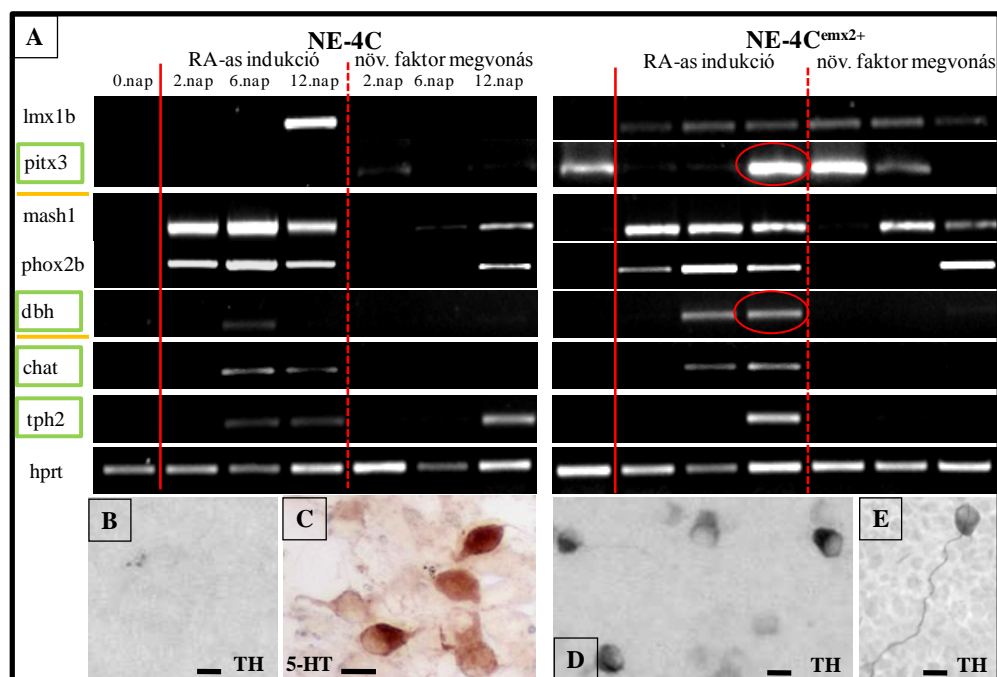
A szérum mentes körülmények között, RA-val indukált differenciáció során az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben *TH*-pozitív sejtek is kialakultak (35./D, E Ábra). A párhuzamosan kezelt NE-4C tenyészetekben ezzel szemben, nem találtunk *TH*-pozitív sejteket (Varga és mtsai, 2008) (35./B Ábra).

A *TH* az L-DOPA tirozinból való keletkezését katalizálja. Az L-DOPA az összes katekolamin (dopamin, noradrenalin, adrenalin) prekursora, így a *TH* a dopaminerg, noradrenerg és adrenerg idegsejtekben egyaránt jelen van. A noradrenerg és dopaminerg fenotípusok elkülönítésére ezért, további markereket kellett megvizsgálnunk.

A *Pitx3* a középagyi dopaminerg neuronokra jellemző transzkripciós faktor (Smidt és mtsai, 1997), amely a posztmitotikus idegsejtekben kezd el expresszálni. A *pitx3* gén expressziója kimutatható volt a RA-val indukált, idegsejteket tartalmazó, NE-4C^{emx2+} tenyészetekben. Az NE-4C sejtek nem expresszálták a *pitx3* gént a differenciáció során (35./ A Ábra).

Meglepő módon, a *pitx3* gén az indukálatlan NE-4C^{emx2+} sejtekben is expresszáldott. A *Pitx3* transzkripciós faktor idegi őssejtekben való jelenlétéről, és szerepéről azonban, tudomásunk szerint, eddig nem jelent meg publikáció.

A dopamin- β -hidroxiláz (*DBH*) enzim a noradrenalin dopaminból való képződését katalizálja. RA-as indukció esetén, a *dbh* expresszió aktiválódik az NE-4C^{emx2+} sejtek idegi differenciációja során. Az NE-4C sejtek differenciációja során, bár átmenetileg kimutatható *dbh* expresszió, ez a differenciáció előrehaladtával eltűnt (35./A Ábra).



35. Ábra: Monoaminerg és kolinerg markerek kifejeződése az NE-4C és NE-4C^{emx2+} sejtek RA-val ill, RA-nélkül indukált idegi differenciációja során. (A): Az idegi differenciáltatás céljából, az NE-4C és NE-4C^{emx2+} sejteket szérum mentes médiumba (MEM-F12-ITS) helyeztük. A retinsavas indukció esetén a differenciáció első 48 órájában RA-at is tartalmazott a tenyészmédium. (RT-PCR) A *lmx1b* és *pitx3* a dopaminerg, a *mash1*, *phox2b* és *dbh* a noradrenerg, a *chat* a kolinerg a *tph2* a szerotonerg fenotípushoz kapcsolható gének. Zölddel az érett idegsejtekre jellemző markerek vannak jelölve.

(B, D, E): TH-festés az NE-4C (B) és NE-4C^{emx2+} (D,E) tenyészeteken, a retinsavval indukált differenciáció 12. napján. (C): 5-HT-pozitív sejtek az NE-4C tenyészetekben, a retinsavas indukció 12. napján. (DAB-es immuncitokémiai festés)

Mérték: 10 μ m

A következőkben megvizsgáltuk néhány, a dopaminerg és noradrenerg neuronok kialakulásában kulcsszerepet játszó transzkripciós faktor expresszióját az NE-4C és az NE-4C^{emx2+} sejtek idegi differenciációja során.

Az *Lmx1b* LIM homeodomén transzkripciós faktor mind a dopaminerg mind a szerotonerg idegsejtek fejlődésében szerepet játszik. Az idegsejtek kialakulása során az idegi progenitorokban kezd el expresszálni, a posztmitotikus dopaminerg és szerotonerg neuronokra jellemző markereket megelőzően (Smidt és mtsai, 2000; Ding és mtsai, 2003). Az *lmx1b* gén mind az NE-4C mind az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben expresszálni a RA által indukált idegi fejlődés során, bár az NE-4C tenyészetekben csak az indukció 12. napján tudtuk kimutatni az *lmx1b* mRNS-t, míg az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben a differenciáció második napján már jelen volt (35./A Ábra).

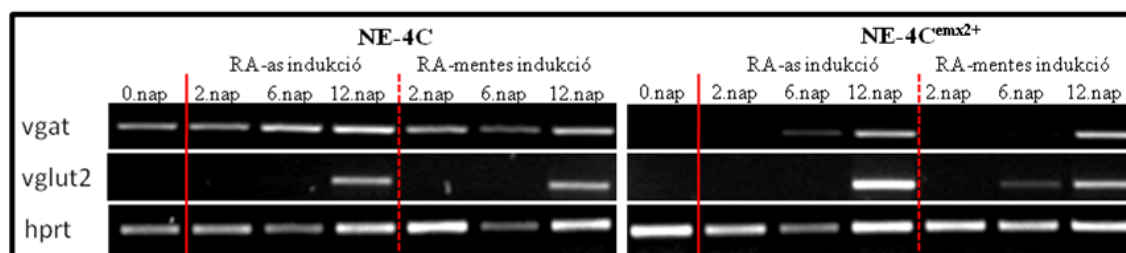
A *mash1* proneurális génnek a noradrenerg idegsejtek fejlődése során, az idegsejt képzés általános programjának szabályozásán kívül, a noradrenerg fenotípus kialakításában is fontos szerepe van (Hirsch és mtsai, 1998). A *phox2b* homeobox transzkripciós faktor a posztmitotikus noradrenerg idegsejtekben expresszálódik, és szerepet játszik a noradrenerg sajátosságok kialakításában (Pattyn és mtsai, 2000). A *mash1* és a *phox2* gén az NE-4C és az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben is aktiválódott (35./A Ábra).

Az NE-4C tenyészetekben tehát annak ellenére nem tudtuk kimutatni a katekolaminerg idegsejtekre jellemző markereket, hogy a kialakulásukat szabályozó faktorok expressziója bekapcsolt a differenciáció során (Varga és mtsai, 2008).

RA mentes differenciáltatási körülmények között az NE-4C és az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben sem alakultak ki TH-pozitív sejtek. A katekolaminerg idegsejtekre jellemző, és a kialakulásukat szabályozó gének expresszióját ezért RA mentes differenciáltatási körülmények között is megvizsgáltuk. A szérum megvonással, MEM-F12-ITS médiumban, indukált differenciáció során, az idegsejtek tartalmazó tenyészetekben az NE-4C és az NE-4C^{emx2+} sejtek estén sem expresszálódtak a *pitx3* és *dbh* gének (35./A Ábra). A *pitx3* mRNS, az NE-4C^{emx2+} tenyészetekből, a differenciáció előrehaladtával (és ezzel párhuzamosan a differenciálatlan sejtalakok számának csökkenésével) fokozatosan eltűnt (35./A Ábra). Az *lmx1b* az NE-4C^{emx2+} sejtek estén, a RA nélkül indukált tenyészetekben, a RA-as indukció esetén tapasztalhatóhoz hasonló expressziós mintázatot mutatott. Az NE-4C tenyészetekben azonban, a kezdeti RA-as kezelés hiányában, nem aktiválódott az *lmx1b* expressziója (35./A Ábra). A *mash1* és a *phox2b* gének az NE-4C és az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben is aktiválódtak a RA nélküli indukció során. Igaz, ez esetben a *mash1* és *phox2b* gének is később kapcsolnak be, mint a RA-as indukció esetén (35./A Ábra).

Az előzőek alapján tehát, a RA-val indukált NE-4C^{emx2+} tenyészetekben mind a dopaminerg (*TH*, *pitx3*) mind a noradrenerg (*TH*, *dbh*) sejtekre jellemző markerek kimutathatóak voltak. A génexpressziós adatok alapján azonban, bár az általunk vizsgált, katekolaminerg fejlődésben szerepet játszó transzkripciós faktorok (*lmx1b*, *mash1*, *phox2b*) aktiválódtak a RA nélküli differenciáció során is, úgy tűnt, hogy az érett katekolaminerg neuronok kialakulásához és / vagy túléléséhez, egy kezdeti, RA-as kezelésre volt szükség.

Elképzelhető-e, hogy RA-as kezelés hiányában az okozta a katekolaminerg sejtekre jellemző markerek hiányát, hogy ezek között a körülmények között nem alakultak ki érett neuronok? A *vgat* és *vglut2* GABA- illetve glutamaterg markerek azonban a RA nélküli differenciáció során is aktiválódtak (36. Ábra). A VGAT és VGlut2 immunocitokémiai módszerrel is kimutatható volt mind a RA-as mind a RA nélküli indukció esetén (be nem mutatott eredmények).



36. Ábra: NE-4C és NE-4C^{Emx2+} tenyészetekben a retinsav nélkül indukált idegi differenciáció során is kifejeződik a GABA-erg sejtekre jellemző *vgat* és glutamaterg sejtekre jellemző *vglut2* vezikuláris transzporter. (RT-PCR)

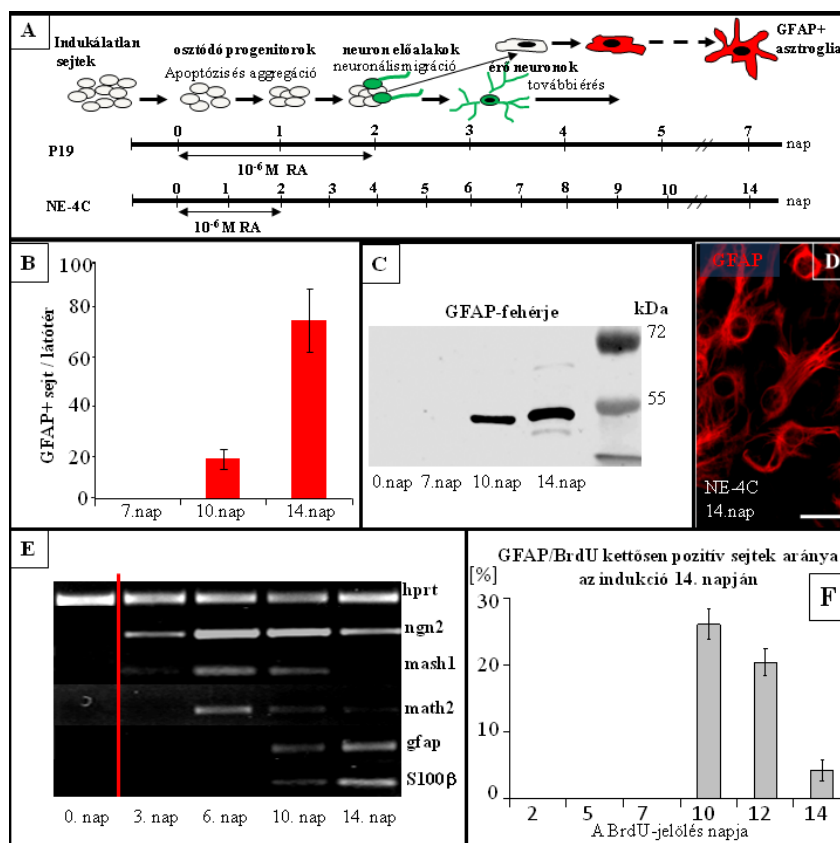
Adataink szerint tehát, az *Emx2* túltermeltetése és a RA-as kezelés együttesen a katekolaminerg idegsejt fenotípus megjelenését eredményezte az NE-4C tenyészetekben.

Az NE-4C sejtek szerotonin (5-HT) immunopozitív idegsejteket is képeznek (Varga és mtsai, 2008) (35./C Ábra). A *triptofán hidroxiláz enzim (Tph2)* szerotonin szintézis kezdő lépését katalizálja. A *tph2* expresszió az NE-4C és az NE-4C^{Emx2+} tenyészetekben is aktiválódott a RA-as indukció esetén. RA nélküli indukció esetén, csak az NE-4C tenyészetekben tudtunk *tph2* expressziót kimutatni (35./A Ábra).

Az acetilkolin neurotranszmitter szintéziséért felelős *kolin acetiltranszferáz enzim (Chat)* a kolinerg neuronokra jellemző. A *chat* gén az NE-4C és az NE-4C^{Emx2+} sejtek RA indukálta idegi fejlődése során is aktiválódott. A *chat* mRNS a RA nélküli indukció során is kimutatható volt az NE-4C illetve NE-4C^{Emx2+} tenyészetekből, igaz, a RA-as indukció esetén tapasztaltnál később jelent meg (35./A Ábra).

5.3. AZ ASZTROGLIA KÉPZÉS SZABÁLYOZÁSA AZ *IN VITRO* IDEGI FEJLŐDÉS SORÁN

A különböző neurotransmitter-fenotípussal rendelkező idegsejtek kialakulása mellett, az NE-4C és P19 sejtek indukált tenyészetekben is fennmaradnak látszólag differenciálatlan, progenitor sejt-populációk. Az idegsejt-képzés szakasza után, ezekből a populációkból fejlődnek az asztroglia sejtek.



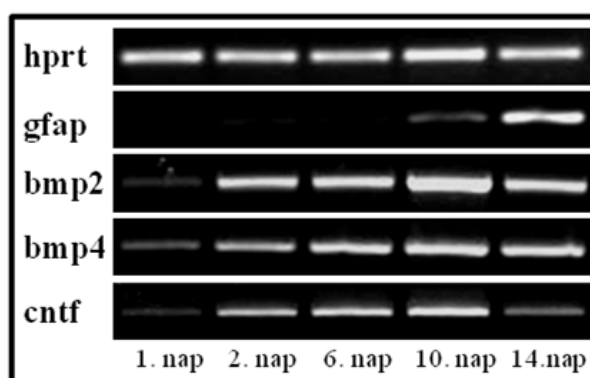
37. Ábra: Az NE-4C és P19 sejtek *in vitro* idegi differenciációja során, az idegsejtek képződése megelőzte az asztroglia sejtek kialakulását. (A): Az NE-4C és P19 sejtek retinsavval indukált idegi differenciációjának főbb szakaszai. **(B):** A GFAP-immunopozitív NE-4C sejtek a differenciáció második hetében jelentek meg. (3-3 párhuzamos tenyészet, 10-10 látótér) **(C):** A GFAP-fehérje (~55 kDa) az idegi differenciáció második hetétől volt kimutatható az NE-4C tenyészetekből. (Western-blot) **(D):** GFAP-immunopozitív (piros) asztroglia sejtek a differenciáció 14. napján. mérték: 20 µm **(E):** Az asztroglia sejtekre jellemző fehérjéket (GFAP és S100β) kódoló gének a proneurális *mash1* és *ngn2* gének expressziójának csökkenésével párhuzamosan, a posztmitotikus idegsejtekre jellemző *math2*-gént kifejező tenyészetekben kezdtek el expresszálódni. (RT-PCR) **(F):** Az osztódó NE-4C sejteket a differenciáció különböző időpontjaiban (2., 5., 7., 10., 12., vagy 14. nap) BrdU-val jelöltük. A 14. napon meghatároztuk a GFAP-re és BrdU-ra egyaránt immunopozitív sejtek százalékos arányát a GFAP-pozitív sejtek (100%) között. (n=4)

A *GFAP* intermediér filamentum az asztroglia sejtek általánosan elfogadott markere, ezért kísérleteink során az asztroglia sejteket *GFAP*-pozitivitásuk alapján azonosítottuk.

Az asztroglia sejtek tömeges képződése a fejlődő központi idegrendszer egész területén az idegsejt képzési szakaszt követően kezdődik el. Ez az időrendiség az általunk vizsgált P19 és NE-4C sejtek *in vitro* idegi differenciációja során is megfigyelhető. A P19 sejtek esetén az első idegsejtek a differenciáció második, az első asztrogliasejtek a differenciáció ötödik napján jelennek meg. Az NE-4C sejtek esetén az első idegsejtek a negyedik, az első asztrogliasejtek a tizedik napon (37. Ábra/A, B, D Ábra) mutathatók ki. Az NE-4C tenyészetekben a *GFAP* mRNS és fehérje, valamint egy másik asztroglia marker, az *S100 β* kalciumkötő fehérje mRNS-e az idegsejtek érésével egy időben mutatható ki először (37. Ábra/C, E Ábra) (Hádinger és mtsai, 2009). Ezt az időszakot a proneurális *mash1* és *ngn2* gének expressziójának csökkenése és a posztmitotikus neuronokra jellemző *math2* gén expressziójának jelenléte jellemzi (37. Ábra/E Ábra). A *GFAP* fehérje megjelenése azonban nem feltétlenül esik egybe az asztrogliasejtek keletkezésének időpontjával. Hogy meghatározzuk az asztrogliasejtek születésének időszakát, az differenciáció különböző időpontjaiban BrdU-val (5-bróm-2'-deoxiuridin) kezeltük a tenyészeteket (6 órán keresztül), majd a második hét végén, amikor az asztrogliasejtek már nagy számban voltak jelen, *GFAP* fehérje illetve BrdU elleni ellenanyaggal festettük őket (37. Ábra/F Ábra). Ha az asztroglia progenitorok a fixálást megelőző utolsó osztódás során kapják a BrdU jelölést, az a *GFAP*-pozitív asztroglia sejtekben jelen marad. Ha azonban a progenitorok, melyek a BrdU-t beépítik a DNS-ükbe, még számos osztódáson keresztülmennek a fixálás időpontjáig, a BrdU-jel kihígul, és nem lesz látható az asztroglia sejtekben. Nem találtunk kettősen pozitív sejteket azokban a tenyészetekben, ahol a BrdU kezelés az indukció első hetében történt. Az indukció második hete során kezelt tenyészetekben minden esetben jelentős számú kettősen pozitív sejtet találtunk. Mindez azt jelenti, hogy az asztroglia sajátosságok a második hét során keletkezett utódsejtekben jelennek meg. Az, hogy abban az esetben is találtunk *GFAP*/BrdU kettősen pozitív sejteket (~5%), ha a BrdU-kezelés után azonnal lefixáltuk a tenyészeteket, azt mutatja, hogy a *GFAP*-pozitív sejtek egy része megtartotta osztódó képességét (37. Ábra/F Ábra).

Vajon mi okozza azt, hogy amíg az idegsejtek kialakulása a RA kezelést követően szinte azonnal megindul, az asztroglia sejtek csak napokkal később jelennek meg, akkor, amikor az idegsejtek nagy része már kialakult?

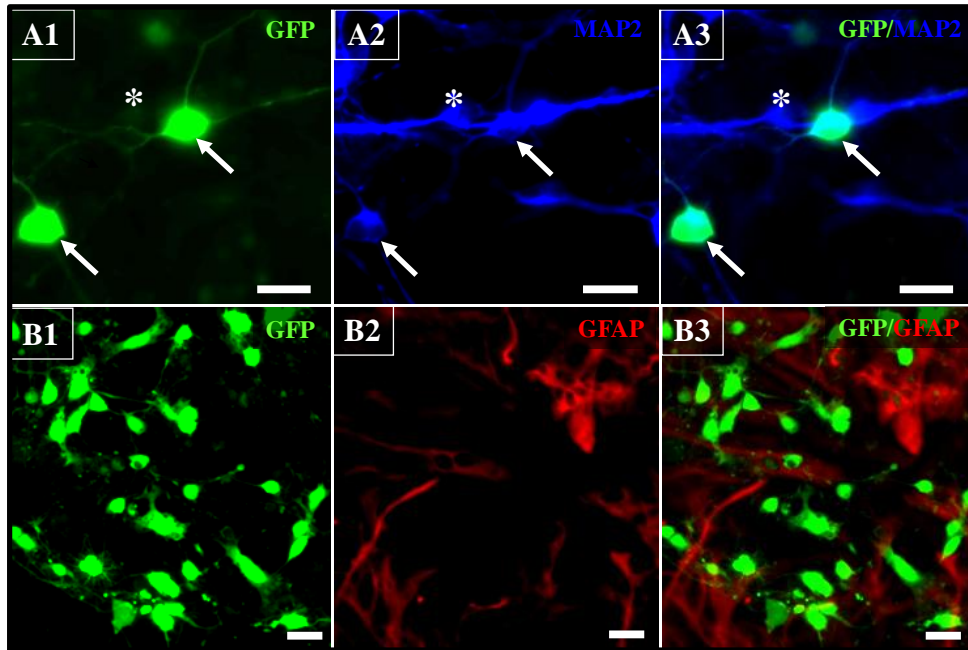
Az egyik kézenfekvő magyarázat az lenne, hogy az asztroglia sejtek differenciációjához szükséges faktorok hiányoznak az idegsejt képződés időszakában. Azonban, több asztroglia képzést serkentő faktor (*CNTF*, *BMP2*, *BMP4*) (Rajan és McKay, 1998) génje is folyamatosan aktív a differenciáció során az NE-4C tenyészetekben (Hádinger és mtsai, 2009) (38. Ábra).



38. Ábra: Az asztroglia sejtek kialakulásához szükséges faktorok (*bmp2*, *bmp4*, *cntf*) génjei már jóval a *gfap* gén aktivációját megelőzően expresszálódtak az NE-4C tenyészetekben. RT-PCR

5.3.1 Az idegsejtek hatása az asztroglia kézésre

Mivel az asztroglia sejtek képződése az idegsejt éréssel párhuzamosan zajlik, és az idegsejtek által termelt anyagok, például a *CT-I*, segíthetik az asztroglia irányú differenciációt (Barnabé-Heider és mtsai, 2005), feltételeztük, hogy az érett idegsejtek hiánya okozhatja az asztroglia sejtek késleltetett megjelenését az NE-4C tenyészetekben. A RA-val indukált differenciáció negyedik napján, az idegsejt képzés stádiumában, a *GFP*-t expresszáló NE-4C sejteket (AG5 sejtek) az aljzatról felszedtük, és érett idegsejtekben gazdag tenyészetek (az indukció tizedik napjánál járó NE-4C tenyészetek, illetve 13,5 napos egér embrióból származó primer idegsejt tenyészetek) tetejére ültettük. Három, kokultúrában eltöltött nap után a sejteket lefixáltuk. Míg az AG5 sejtek jelentős hányada festődött a neuron specifikus β III-tubulin fehérjére, azaz idegsejt-irányban differenciálódott, egyikük sem mutatott *GFAP*-pozitivitást (39. Ábra).



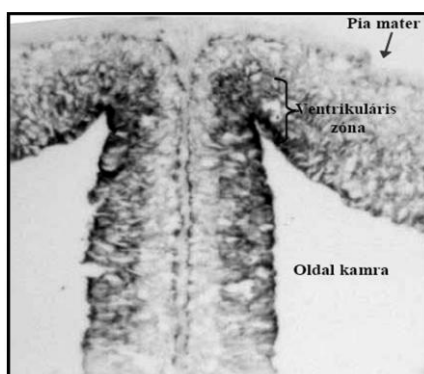
39. Ábra: Az érett idegsejtek közelsége nem indukált idő előtti asztroglia képződést. A differenciáció 4. napján az aljzatról felszedett, *GFP*-t expresszáló NE-4C sejteket (AG5) idegsejtekben gazdag, 10-napos, *GFP*-t nem expresszáló NE-4C tenyészetekre (A), vagy 13,5 napos embrióból származó primer neurális tenyészetekre (B) helyeztük. 3. kokultúrában eltöltött nap után fixáltuk a sejteket, és MAP2-re (idegsejt marker, kék) (A) és GFAP-re (asztroglia marker, piros) (B) festettük őket. Nem találtunk *GFAP-GFP* kettősen pozitív sejteket a tenyészetekben. nyíl: *MAP2/GFP* kettősen pozitív sejtek. csillag: *MAP2*-pozitív *GFP*-negatív sejtek. Mérték: 20 μ m

Annak ellenőrzésére, hogy a sejtek aljzatról való felszedése megzavarhatta-e az asztroglia képzést, az AG5 tenyészeteket az aljzatról felszedtük majd (PLL-nel kezelt tenyésztőedénybe visszatéve) tovább tenyésztettük. A tenyészetekben a differenciáció tízedik napján – a megszokott fejlődésmenetnek megfelelően - megjelentek a *GFAP*-pozitív sejtek.

Az idegsejtek jelenléte tehát nem váltott ki idő előtti asztroglia irányú differenciációt az idegsejt képző stádiumból származó progenitorokban.

Miután a korai idegsejt-képző stádiumban az asztroglia képzéshez nélkülözhetetlen faktorok termelődése nem gátolt és az érett idegsejtek hiánya sem magyarázza a késleltetett asztroglia képződést, fel kellett tételeznünk valamilyen, az asztroglia képzést aktívan gátló faktor jelenlétét a differenciáció kezdeti szakaszában.

Saját (40. Ábra), és irodalmi adatok (Luo és mtsai, 2004) azt mutatják, hogy a RA jelen van a fejlődő idegrendszer germinatív zónáiban az idegsejt képzés stádiumában, és az idegi progenitorokban az osztódás módját szimmetrikusról önsokszorozó osztódásról aszimmetrikus, idegsejt-képző irányba tolja el (Siegenthaler és mtsai, 2009). Mivel tudtuk, hogy a RA az idegsejt irányú differenciációt támogatja, és hogy a progenitorok környezetében a korai, idegsejt képző stádiumokban jelen van, felmerült bennünk a kérdést: kihat-e a retinsav szabályozó szerepe az asztroglia irányú fejlődésre is?

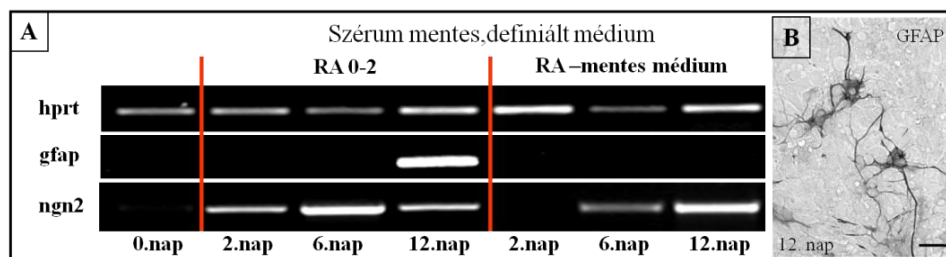


40. Ábra: A retinsav jelen van az előagy germinatív zónájában az idegsejt képzés időszakában. 15-napos, RA-érzékeny promoterről vezérelt *béta-galaktoszidáz* (RAREhsplacZ) génkonstrukciót hordozó transzgenikus embrió (Rossant és mtsai., 1991) előagyának szagittális metszete. A RA jelenlétét a *béta-galaktoszidáz* specifikus X-gal enzimreakció jelzi.

5.3.2. Az *all-transz* retinsav szerepe az asztroglia képzés szabályozásában

5.3.2.1. A retinsav korai jelenléte szükséges az asztroglia sejtek *in vitro* kialakulásához

Az NE-4C sejtek idegsejt irányú differenciálódása kiváltható RA hozzáadása nélkül is. RA nélkül, szérum mentes médiumban (MEM-F12-ITS) nagy számban képződtek idegsejtek, de GFAP-pozitív sejtek nem alakultak ki, és a gfap mRNS sem volt kimutatható a tenyészetekben (41./A Ábra). Ha azonban a szérum mentes médiumot 10^{-6} M RA-val egészítettük ki a differenciáció első 48 órájában, a GFAP-pozitív sejtek megjelentek az idegsejtek kialakulását követően (Hádinger és mtsai, 2009) (41. Ábra). Az elkötelezetlen idegi őssejtek RA-as indukciója tehát, legalábbis *in vitro*, szükséges ahhoz, hogy az időben jelentősen késleltetett asztroglia képzés megindulhasson.

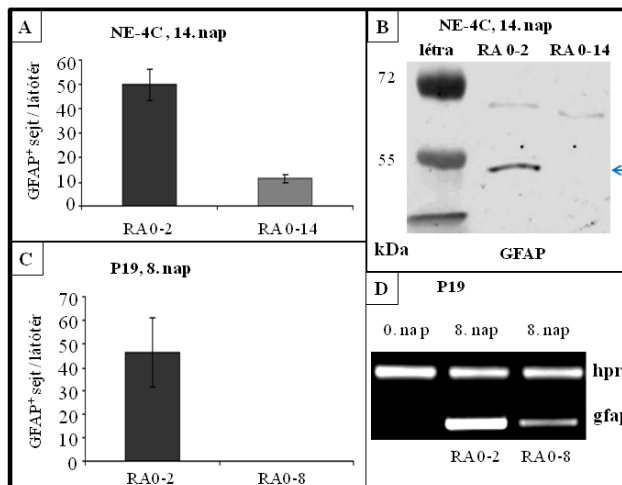


41. Ábra: Egy kezdeti, rövid retinsavas indukció szükséges az asztrogliasejtek mintegy tíz nappal későbbi megjelenéséhez. (A): Pusztán a növekedési faktorokat tartalmazó szérum megvonása a médiumból elég volt az NE-4C sejtek idegsejt irányú differenciációjához. A proneurális gén *ngn2* a RA-as és RA mentes indukció során is expresszálódott. A *gfap*-mRNS (A), és GFAP-pozitív sejtek (DAB-es előhívás) (B) csak a RA-val indukált tenyészetekben voltak kimutathatók.

RA 0-2: A RA-as kezelés időtartama, Mérték: 20 μ m

5.3.2.2. A retinsav az idegi differenciáció későbbi (asztroglia képző) szakaszában gátolja az asztroglia sejtek kialakulását

10⁻⁶M RA hosszú-távú (P19 esetén 6 nap illetve NE-4C esetén 12 nap) jelenléte jelentősen (100 ill 80%-kal) csökkentette a képződő asztroglia sejtek számát, és ezzel a GFAP-fehérje és *gfap*-mRNS mennyiségét (Hádinger és mtsai, 2009) (42. Ábra).

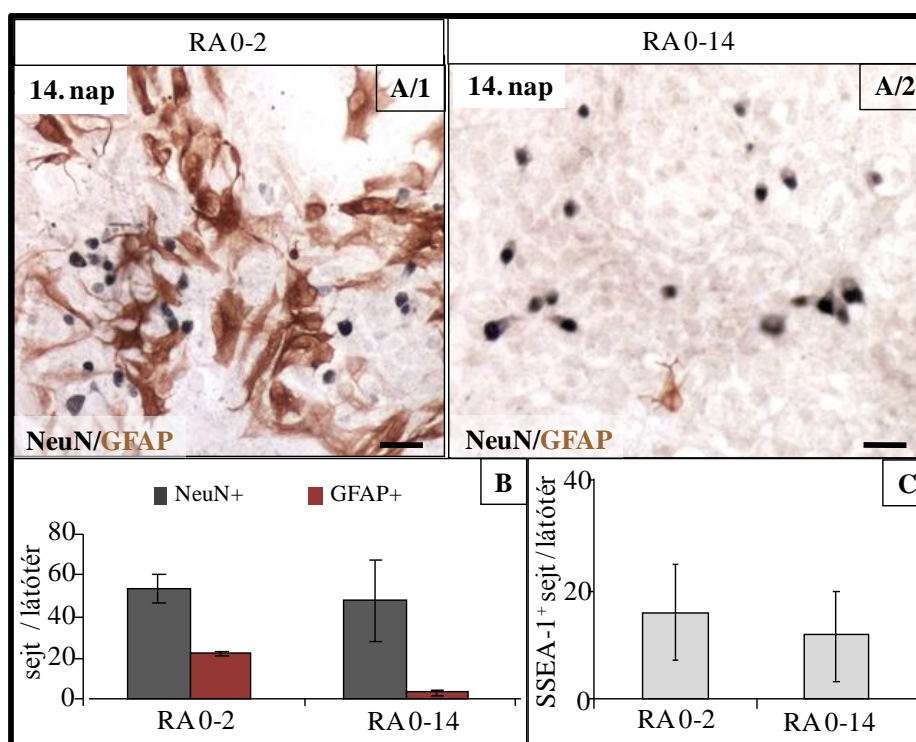


42. Ábra: A RA folyamatos (0-14 nap illetve 0-8 nap) jelenléte szignifikánsan csökkentette a GFAP-pozitív sejtek számát (A) és a GFAP-fehérje (~55 kDa, kék nyíl) mennyiségét (Western-blot) (B) a 14-napos NE-4C tenyészetekben (A), valamint a GFAP-pozitív sejtek számát (C) és a *gfap*-mRNS expresszióját (RT-PCR) (D) a 8-napos P19 tenyészetekben.

RA x-y: A RA-as kezelés időtartama; A, C: 3-3 párhuzamos tenyészet, 10-10 látótér

Mivel a RA támogatja az idegsejt irányba való differenciációt, megvizsgáltuk, hogy az asztroglia képzést gátló hatása nem abból adódik-e, hogy a progenitor sejteket az

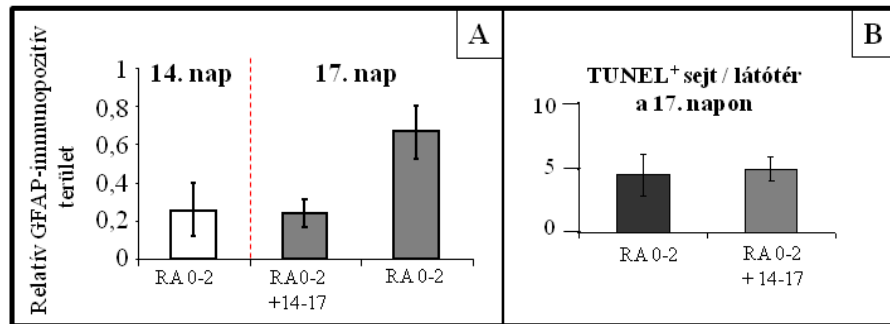
asztroglia irányú differenciáció rovására idegsejt irányba differenciáltatja. Az NE-4C tenyészetek 14 napig tartó RA-as kezelése azonban nem okozott változást sem a képződő idegsejtek számában, sem a tenyészetekben fennmaradó SSEA⁺ progenitorok számában a kontroll (kezdeti 48 órás) RA kezeléshez képest (Hádinger és mtsai, 2009) (43. Ábra).



43. Ábra: A hosszú távú (0-14 nap) RA kezelés nem befolyásolta az NE-4C tenyészetekben kialakuló idegsejtek számát (A és B), illetve a differenciáció során fennmaradó SSEA-1 pozitív progenitorok számát (C). A kontroll (RA 0-2) és a folyamatosan RA-val kezelt (RA 0-14) tenyészeteket a differenciáció 14. napján fixáltuk, majd *GFAP* (DAB, barna), idegsejt specifikus *NeuN* (Ni-DAB, fekete) fehérjékre és SSEA-1 epitópra festettük őket. Mérték: 50 μ m

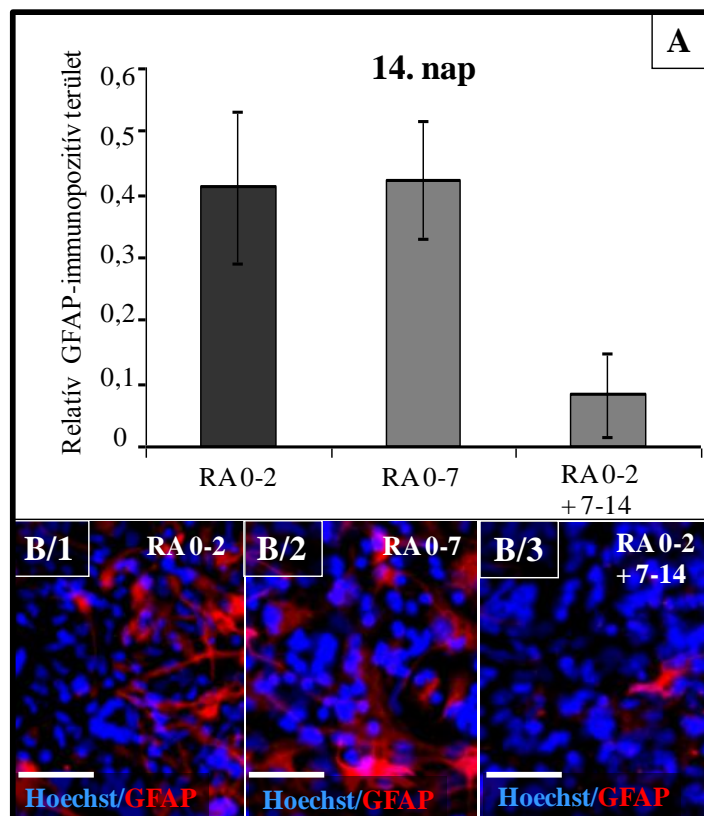
RA x-y: A RA-as kezelés időtartama; B, C: 3-3 párhuzamos tenyészet, 10-10 látótér

Ha tizennégy napos, *GFAP*-pozitív sejtekben gazdag tenyészeteket három napon keresztül RA-val kezeltünk, a TUNEL-pozitív, apoptotikus sejtek számában nem tapasztaltunk változást (Hádinger és mtsai, 2009). A RA tehát nem volt toxikus a már kialakult asztroglia sejtekre (44. Ábra). Mindezek alapján tehát úgy tűnik, a RA közvetlenül az asztroglia sejtek képződését gátolja.



44. Ábra: A retinsav nem az apoptotikus sejtek számának növelésén keresztül csökkentette az asztroglia sejtek számát. A RA a késői, *GFAP*-pozitív sejtekben gazdag (14-17 nap) tenyészetekben is gátolta az asztroglia sejtek további képződését (A), de a TUNEL-pozitív apoptotikus sejtek számát nem növelte szignifikánsan (B). A kontrol tenyészeteket (RA 0-2) a 14. (A, B) illetve, 17. (B), a RA-val 14-17 nap között kezelt tenyészeteket (RA 0-2 + 7-14) a 17. (A, B) napon fixáltuk. A *GFAP* festés esetén a *GFAP*-immunopozitív területet a Hoechst-pozitív területre vonatkoztatva adtuk meg. (3-3 párhuzamos tenyészet, 10-10 látótér)
RA x-y: A RA-as kezelés időtartama

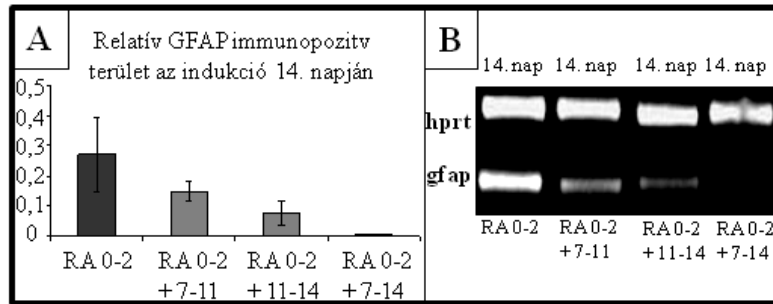
A következőkben megvizsgáltuk, hogy a RA az idegi differenciáció melyik szakaszában fejt ki asztroglia képzést gátló hatását. Ha az NE-4C sejteket a differenciáció első hetében, tehát az idegsejt képzés szakaszában kezeltük RA-val, nem tapasztaltunk csökkenést a kialakuló asztroglia sejtek számában. Ha azonban a RA-at, a kezdeti két napos kezelésen túl, a második hét során adtuk a tenyészfolyadékhoz, az asztroglia sejtek száma nagymértékben (mintegy 80%-kal) csökkent (Hádinger és mtsai, 2009). A RA tehát a differenciáció második hetében, az asztroglia fenotípus megjelenésének időszakában (37. Ábra/F Ábra) fejt ki gátló hatását (45. Ábra).



45. Ábra: A retinsav az idegsejt képző szakaszt követő időszakban alkalmazva gátolta az asztroglia képződést. Ha a RA a differenciáció első hetében, az idegsejt képzés időszakában volt jelen (RA 0-7), nem okozott szignifikáns változást a képződő asztroglia sejtek számában (A, B/2) a kontroll (RA0-2) tenyészetekhez (A, B/1) képest. Az asztroglia sejtek képződésének szakaszában, a második héten, a RA folyamatos jelenléte (RA 0-2 + 7-14) szignifikáns csökkenést okozott a képződő asztroglia sejtek számában (A, B/3). A tenyészeteket a 14. napon fixáltuk és *GFAP*-re festettük. Az (A) ábrán a *GFAP*-immunpozitív területet a Hoechst-pozitív területre vonatkoztatva adtuk meg. (3-3 párhuzamos tenyészet, 10-10 látótér), Mérték: 50 μ m
RA x-y: A RA-as kezelés időtartama

Ha a tenyészeteket a differenciáció második hetének első vagy második felében kezeltük RA-val, mindkét esetben csökkent (45% ill. 72%-kal) a tenyészetek *GFAP*-tartalma a kontroll tenyészetekhez képest (Hádinger és mtsai, 2009). A RA tehát a differenciáció második hetében folyamatosan zajló asztroglia képződés egész szakaszában gátolja a *GFAP*-pozitív asztroglia sejtek kialakulását (46. Ábra).

Mindezek alapján, a RA valószínűleg az asztroglia irányú fejlődésre képes progenitorok asztroglia irányú elköteleződését és/vagy az érett asztroglia fenotípus kialakulását gátolja

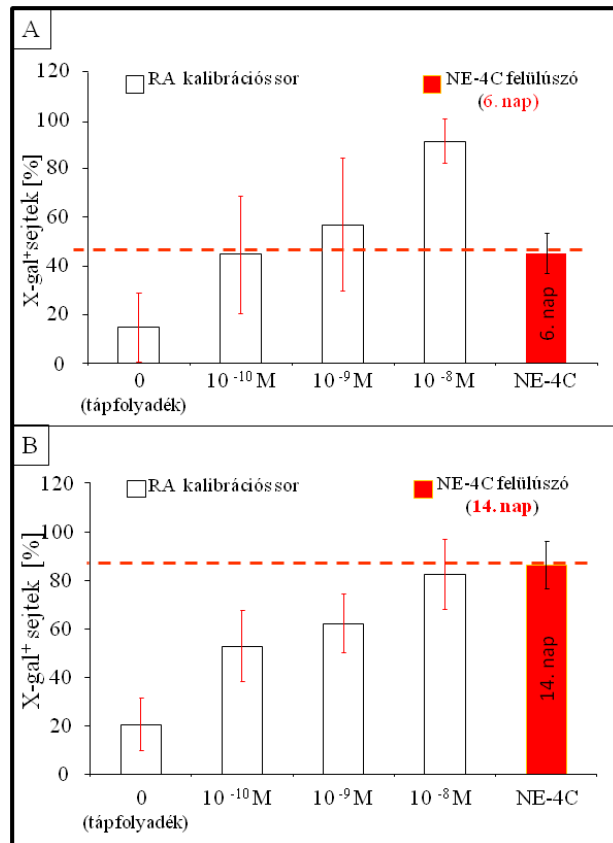


46. Ábra: A retinsav az asztroglia sejtek születésének egész időszaka alatt gátolta az asztroglia sejtek kialakulását. Ha az NE-4C tenyészeteket a differenciáció második hetének első (RA 0-2 + 7-11) illetve második (RA 0-2 + 11-14) felében kezeltük RA-val, mindkét esetben jelentős, de a 7-napos kezelés (RA 0-2 + 7-14) esetén tapasztaltnál csekélyebb csökkenés volt tapasztalható a *GFAP*-pozitív sejtek számában (**A**), illetve a *gfap*-mRNS mennyiségében (**B**). A *GFAP*-pozitív sejtek számát, és a *gfap*-expresszió mértékét a 14-napos tenyészetekben határoztuk meg. Az (**A**) ábrán a *GFAP*-immunopozitív területet a Hoechst-pozitív területre vonatkoztatva adtuk meg. (3-3 párhuzamos tenyészet, 10-10 látótér)
RA x-y: A retinsavas kezelés időtartama

5.3.2.3. A differenciálódó NE-4C sejtek retinsavat termelnek, mely szabályozza a kialakuló asztroglia sejtek mennyiségét

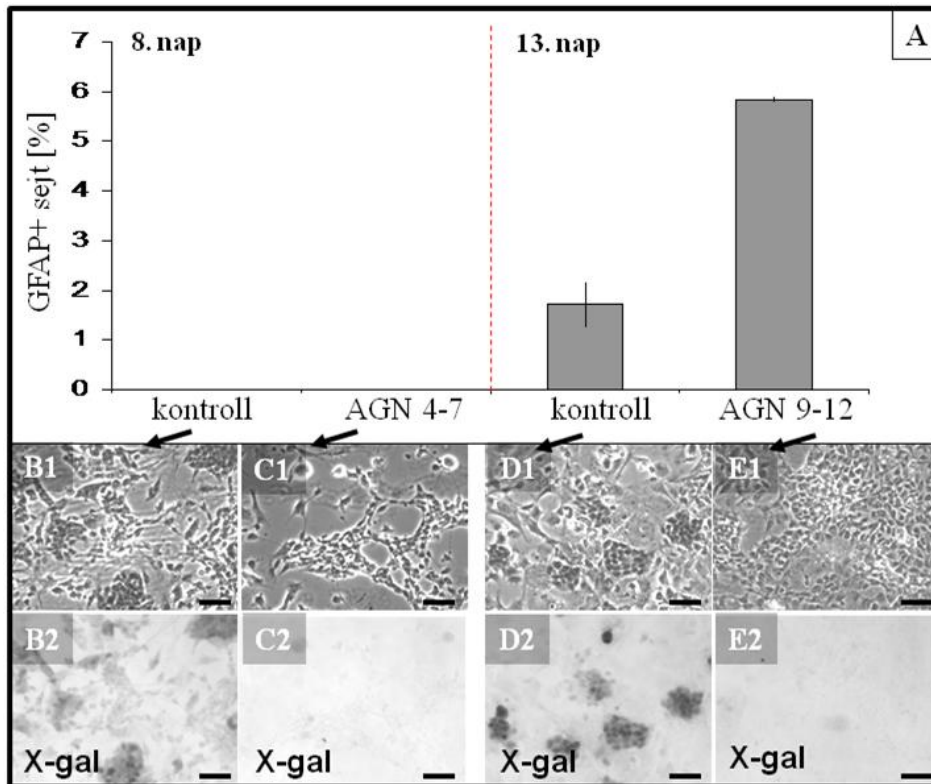
Miután láttuk, hogy a RA az *in vitro* idegi differenciáció során gátolta az asztroglia sejtek kialakulását, kíváncsiak voltunk, hogy maguk a differenciálódó sejtek termelnek-e RA-at.

Az NE-4C sejtek differenciációjának különböző stádiumaiban mintát vettünk tenyészmédiumból (kondicionált médium), és a minták RA tartalmát a RA-riporter F9 sejtvonal segítségével mértük. Az F9 karcinóma sejtek RA-érzékeny promoterről vezérelt *béta-galaktoszidáz* (RARE-LacZ) génkonstrukciót hordoznak (Sonneveld és mtsai, 1999). A *béta-galaktoszidáz* gén expressziójának mértéke, így az enzim mennyisége az F9 sejtekben a környezet RA-tartalmával nő. Az enzimaktivitás XGal szubsztráttal (kék festődés) mutatható ki. A differenciálatlan NE-4C sejtekről tudtuk, hogy nem termeltek jelentős mennyiségű RA-at (Környei és mtsai, 2007). A differenciáció során azonban növekvő mértékű RA termelés volt megfigyelhető (Hádinger és mtsai, 2009) (47. Ábra).



47. Ábra: A differenciálódó NE-4C sejtek retinsavat termeltek. Az NE-4C sejtek által termelt RA koncentrációja az idegsejt képzés stádiumához viszonyítva (**A**), az asztroglia képzés stádiumában (**B**) magasabb volt. A meghatározott RA-koncentrációjú tápoldatokat (RA kalibrációs sor), illetve az NE-4C tenyészetek felülűszoját az F9 riportersejtekhez adtuk. Az F9 sejtek RA érzékeny promóter által meghajtott béta-galaktoszidáz konstrukciót tartalmaznak. A béta-galaktoszidáz aktivitást X-gal festéssel tettük láthatóvá, majd meghatároztuk az X-gallal festődött sejtek százalékos arányát. 100% = F9 sejtek száma. (2-3 párhuzamosan kezelt tenyészet, 20-20 látótér)

Az NE-4C sejtek által termelt RA hatását egy, a magi RA-receptorokat (RAR) gátló (pán-RAR) antagonistával, az AGN193109 (Johnson és mtsai, 1995) (innentől AGN) (10^{-7} M) gátoltuk. Ha a sejteket az idegsejt-képző szakaszban (4.-7. nap) kezeltük AGN-nel, a differenciáció nyolcadik napján sem a kezelt, sem a kontroll tenyészetek nem tartalmaztak *GFAP*-pozitív sejteket. Ha azonban az asztroglia képzés időszakában (9.-12. nap) alkalmaztuk az AGN-kezelést, a kezelt tenyészetekben mintegy háromszoros növekedés volt megfigyelhető a *GFAP*-pozitív sejtek számában a kontroll tenyészetekhez képest (48. Ábra).



48. Ábra: Az NE-4C sejtek által termelt retinsav az asztroglia képzés stádiumában csökkentette a keletkező asztroglia sejtek számát, de nem az endogén retinsav volt felelős az asztroglia sejteknek az idegsejtképzéshez viszonyított, késleltetett megjelenéséért. A RA magi receptorokon keresztül való hatását a pán-RAR antagonistá AGN193109-cel (AGN) gátoltuk. **(A):** A differenciáció idegsejt képző (4-7 nap) valamint asztroglia képző (9-12) stádiumában 10^{-7} M AGN-nel kezeltük a tenyészeteket. A kezelés végén (8. ill. 13. nap) a GFAP-immunpozitív sejtek százalékos arányát meghatároztuk. 100% = az összes sejt száma. (3-3 párhuzamos tenyészet, 7-7 látótér) **(B):** Az AGN gátló hatását RA érzékeny F9 riporter sejtekkel ellenőriztük. Az F9 sejtek RA érzékeny promóter által meghajtott *béta-galaktoszidáz* konstrukciót tartalmaznak. Az AGN-kezelés utolsó napján a kontroll és az AGN-kezelt NE-4C tenyészetekre F9 sejteket ültettünk, majd 20 óra elteltével a tenyészeteket fixáltuk. A *béta-galaktoszidáz* aktivitást X-gal festéssel tettük láthatóvá. Mérték: $50\mu\text{m}$

Az exogén és a differenciálódó NE-4C sejtek által termelt endogén RA tehát nem játszik szerepet az asztroglia képzés korai, neuron képzés szakaszában történő gátlásban. A differenciáció későbbi stádiumában azonban a RA jelentős mértékben szabályozza a keletkező asztroglia sejtek számát.

6. MEGBESZÉLÉS

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

Doktori munkám során, az idegszöveti fejlődés irányába már elkötelezett, de többféle idegszöveti sejté fejlődni tudó, korai neuroektodermális NE-4C őssejtek idegi differenciációs folyamatait vizsgáltam.

A korai embrionális fejlődési stádiumokból származó idegi őssejtek általában nehezen tarthatóak fenn *in vitro* körülmények között, mivel a tenyésztés során „érettebb” progenitor típusokká alakulnak (Conti és Cattaneo, 2010). A radiális glia sejtek kialakulását megelőző fejlődési stádiumból (E9,5) származó NE-4C sejt vonal, (a vonal hosszú távú, stabil fenntarthatóságát biztosítandó), *p53* tumorszupresszor deficiens (*p53*^{-/-}) embriók idegszövetéből származik (Schlett és Madarász, 1997). Kísérleteink egy részét egyéb, idegi irányba differenciáltható őssejt populációkon (P19 embrionális karcinóma sejteken [McBurney és Rogers, 1982] és R1 embrionális őssejteken –ES- [Nagy és mtsai, 1993]) is elvégeztük.

Az NE-4C sejt vonal egy sejt eredetét, az idegszövetből való izolálás utáni többszörös klónozással biztosították (Schlett és Madarász, 1997). Így, indukátlan állapotban az NE-4C populációk geno- és fenotípusosan homogének. Az idegi differenciáció során lezajló folyamatok azonban heterogén sejtösszetételű populációk kialakulását eredményezik. A RA-val indukált differenciáció során RC-2 pozitív, radiális glia morfológiájú sejtek, majd idegsejtek, végül asztroglia sejtek alakulnak ki. Mindeközben, a differenciáció során mindvégig fennmarad egy, az indukátlan NE-4C sejtekhez hasonló őssejt populáció (Varga és mtsai, 2008).

6.1. Az NE-4C sejtek differenciációja során a régió specifikus gének széles skálája aktiválódik

A homeodomén transzkripciós faktorok kulcsfontosságú szerepet játszanak az idegi regionalizációs folyamatokban, és az általános idegsejt (illetve asztroglia) képző mechanizmusokkal együttműködve, nagyban befolyásolják a kialakuló sejtek fenotípusát.

Az NE-4C sejtek indukátlan állapotban, az epiblaszt területén már a velőlemez kialakulását megelőzően expresszálandó (Acampora és mtsai, 2001) *otx2* génen kívül más, általunk vizsgált régió specifikus transzkripciós faktort nem expresszáltak. Az *otx2*, *emx2*, *dlx2*, *pax6*, *otx3*, *gbx2*, *hoxb2* homeodomén DNS-kötő szakasszal rendelkező transzkripciós faktorok a fejlődő idegrendszer területén a korai fejlődési stádiumoktól fogva jelen vannak (Kimura és mtsai, 2005; Bulfone és mtsai, 1993; Zhang és mtsai, 2002, Bouillet és mtsai, 1995; Wilkinson és mtsai, 1989). Expressziójuk a KIR különböző területeire jellemző, bár expressziós területeik a fejlődés előrehaladtával változnak, és bizonyos mértékben átfedhetnek.

Az *in vitro* differenciáció során az NE-4C tenyészetekben összes általunk vizsgált régió specifikus gén aktiválódott.

A szérumos közegben (MEM-5% FCS), RA-val indukált differenciáció során, a központi idegrendszer Isthmustól poszterior területeire jellemző gének (*hoxb2*, *gbx2*) szinte azonnal aktiválódtak, azokat a géneket megelőzve, melyek a fejlődő KIR területén a korai fejlődési stádiumokban kizárólag az Isthmustól anterior mesencephalikus ill prosencephalikus területeken expresszálandóknak (*emx2*, *dlx2*, *otx3*). A RA *in vivo* fontos szerepet játszik a kaudális idegrendszeri területek identitásának kialakulásában. Ismert továbbá, hogy a *gbx2* ill *hoxb2* gének expresszióját a RA közvetlenül is képes indukálni (Bouillet és mtsai, 1995; Simeone és mtsai, 1990; Freemantle és mtsai, 2002). Elképzelhetőnek tartottuk ezért, hogy az anterior idegrendszeri területről származó NE-4C sejtekben a kaudális idegrendszeri területekre jellemző gének közvetlenül a RA, és nem a differenciációs folyamatok hatására aktiválódtak. A RA nélküli (szérum/növekedési faktor megvonásával történő) differenciáltatás során azonban, a retinsavas indukcióhoz hasonlóan, az összes általunk

vizsgált régió specifikus transzkripciós faktor expressziója aktiválódott. Mi több, a régió specifikus gének aktiválódásának a sorrendje is igen hasonló volt a RA-as és RA-menets differenciáció esetén. Az *emx2*, *dlx2* és *otx3* gének késleltetett expressziója valószínűleg nem abból eredt, hogy az indukció első 48 órájában jelen levő RA közvetlenül gátolta volna a kifejeződésüket, mivel a retinsav folyamatos (168h) jelenléte mellett is megfigyelhettük ezeknek a géneknek az aktivációját (be nem mutatott adatok). Mivel az NE-4C sejtek maguk is termelnek aktív retinoidokat differenciációjuk során, az endogén retinsav-hatása nem zárható ki a régió specifikus transzkripciós faktorok expressziójának szabályozásában, „időzítésében”.

Az NE-4C sejtek differenciációja során a KIR nagy részén komplementer expressziós mintázatot mutató *mash1* és *ngn2* proneurális gén egyaránt aktiválódott.

A régió specifikus homeodomén és a proneurális gének expressziója alapján tehát, az NE-4C sejtek regionálisan elkötelezetlenek.

6.2. Az NE-4C sejtek különböző idegsejt fenotípusok létrehozására képesek

A régió specifikusan expresszálódó homeodomént tartalmazó és proneurális (*bHLH*) transzkripciós faktorok központi szerepet játszanak az adott idegrendszeri területen (és adott fejlődési stádiumban) kialakuló idegsejtek fenotípusának meghatározódásában (Kageyama és mtsai, 2005, Mattar és mtsai, 2008). Az NE-4C sejtek differenciációja során a tenyészetekben az idegi sejtorsot befolyásoló transzkripciós faktorok széles palettája aktiválódott. Ezzel párhuzamosan, az NE-4C tenyészetekben különböző neurotransmitter fenotípusokra (glutamaterg, GABA-erg, szerotonerg, kolinerg) jellemző markereket (*VGlut1*, *VGlut2*, *Gad65*, *Gad67*, *VGAT*, *GABA*, *5-HT*, *chat*) mutattunk ki génexpressziós, és/vagy fehérje szinten. Megmutattuk továbbá, hogy a glutamaterg (*Vglut2*) és GABA-erg (*VGAT*) markerek nem azonos sejtekben jelennek meg: két különböző idegsejt-populációt jelölnek. Az idegsejtek nagy része *VGAT* vagy *VGlut2* pozitív volt, míg szerotonin tartalmú idegsejteket csak elvétve (<1%) találtunk. Katekolaminerg markereket (*TH*-immunopozitivitás, *pitx3* ill. *dbh* expresszió) azonban nem tudtunk kimutatni a tenyészetekben annak ellenére, hogy a dopaminerg fenotípus

kialakulásában szerepet játszó *lmx1b* (Smidt és mtsai, 2000) és a noradrenerg sejtek kialakulásában szerepet játszó *phox2b* és *mash1* (Pattyn és mtsai, 2000; Hirsch és mtsai, 1998) gének kifejeződtek az indukált tenyészetekben.

Az NE-4C sejtek tehát, indukátlan állapotban (az *otx2*-n kívül) nem expresszálják egyik általunk vizsgált, korai neuroepitélre jellemző regionális transzkripciós faktort sem. Differenciációjuk során azonban, a tenyészetek (az azokat felépítő sejttypusok szempontjából való) heterogénné válásával párhuzamosan, a tenyészeteken belüli sejt-sejt kölcsönhatások következtében, különböző idegi sejt sorsokat meghatározó gének aktiválódnak, és a neuronokat tartalmazó tenyészetekben különböző idegsejt fenotypusok alakulnak ki.

Mivel a régió specifikus transzkripciós faktorok expresszióját RT-PCR módszerrel csak tenyészet szinten tudtuk megmutatni, nem tudjuk, hogy a régió specifikus gének egy sejten belül vannak-e jelen. RG tulajdonságokkal rendelkező klónok vizsgálata során tapasztalt eredményeink (Markó és mtsai, előkészületben), és irodalmi adatok (Hack és mtsai, 2004) arra utalnak, hogy *in vitro* körülmények között egy sejten belül kifejeződhetnek az *in vivo* együtt nem expresszáló gének. A GABA-erg és glutamaterg fenotypusok elkülönülése azonban a különböző idegsejt sorsokat meghatározó szabályozó útvonalak szétválására utal az *in vitro* idegsejt képzés során is.

Eredményeink azt mutatják, hogy az NE-4C sejtek regionálisan nem elkötelezettek. Ez adódhat abból, hogy a sejt vonal egy olyan korai embrionális sejt populációból származik, mely még nem expresszál finomabb regionális identitást meghatározó transzkripciós faktorokat. Valószínűbb azonban, hogy a korai neuroepitélből származó sejtek az *in vitro* fenntartási körülmények között elvesztik regionális meghatározottságukat. E szerint, a nem-neurális szövetekből származó faktorok és az idegrendszeri struktúra hiányában elvész a pozicionális meghatározottság. Számos közlemény számol be arról, hogy az *in vitro* fenntartás során megváltozhat a régió specifikus gének expressziós mintázata az idegi progenitorokban (Hack és mtsai, 2004; Machon és mtsai, 2005; Pollard és mtsai, 2006). Az idegsejt képzés kezdete utáni stádiumokból származó progenitor populációk azonban általában legalább részben megőrzik regionális elkötelezettségüket (Sun és mtsai, 2008; Conti és Cattaneo, 2010). A regionális elköteleződés korai rugalmasságára, majd beszűkülésére utalnak bizonyos

implantációs kísérletek is, melyek során az *in vitro* vagy *in vivo* idegi fejlődés korai stádiumaiból származó progenitorok képesek a befogadó embrionális szövetnek megfelelő sejtek létrehozására, a későbbi stádiumból származó progenitorok azonban elvesztik érzékenységüket a környezetből származó regionalizáló faktorokra (Baizabal és Covarrubias, 2009; Baizabal, 2011).

Összegezve tehát úgy tűnik, hogy bár az idegi progenitorok *in vivo* már a korai fejlődési stádiumoktól fogva mutatnak pozicionális génexpressziós különbségeket, a regionális elköteleződés csak fokozatosan, a sejt-típus specifikus differenciálódás során történik meg.

Az NE-4C sejtek fejlődési potenciáljának bizonyos, korai beszűkültségére utalhat azonban, hogy a sejtek idegi differenciációja során nem képződnek katekolaminerg idegsejtek. Valószínűsíthető, hogy a katekolaminerg idegsejtek kialakulásához, vagy fennmaradásához fontos szekretált faktorok (pl. *FGF8*, *Shh* és *BMP* fehérjék Goridis és Rohrer, 2002) koncentrációja nem elegendő az NE-4C tenyészetekben. Hogy e faktorok hozzáadásával indukálható lenne-e az NE-4C eredetű katekolaminerg idegsejtek kialakulása, további vizsgálatok tárgya. Mindenestre tudjuk, hogy az ES sejtek és a ventrális előagyi területekről (a dopaminerg sejtek születési helyéről) származó progenitor sejtek dopaminerg irányú differenciációját nagyban elősegíti a tenyészetek *Shh*-gal, *FGF8*-cal való kezelése (Lee és mtsai, 2000; Yan és mtsai, 2001).

6.3. A P19 és az R1 sejtek RA-val indukált idegi differenciációja során különböző *in vivo* expressziós területtel jellemzhető homeobox gének expressziója indukálódik, és az idegsejteket tartalmazó tenyészetekben mind GABA-erg mind glutamaterg markerek kimutathatóak

A P19 és R1 (ES) sejtek esetében, az *otx2* mellett az *emx2* homeobox gén, valamint a *mash1* proneurális gén is expresszálódott indukálatlan állapotban. A *mash1* lokusz aktiválódása az ES illetve P19 sejtekben az idegi irányú differenciációhoz kötött (Williams és mtsai, 2006; Dai és mtsai, 2010). A *mash1* jelenlétéért ezekben a populációkban ezért a sejtek bizonyos mértékű „spontán” idegi irányú differenciálódása lehet felelős. Az *emx2* jelenlétét tudomásunk szerint eddig nem mutatták ki az indukálatlan P19 ill. R1 sejtekben. Az *Emx2* transzkripció faktor az idegszövet

fejlődésén kívül egyéb szövetek fejlődésének szabályozásában is részt vesz (Pellegrini és mtsai, 1997), így attól függően, hogy milyen molekuláris környezetben expresszálódik, más és más fejlődési folyamatokat szabályozhat. Jelenléte az indukálatlan R1 ill P19 sejtekben így valószínűleg nem az általunk vizsgált regionalizációs folyamatokhoz köthető.

A P19 és R1 sejtek RA-val indukált idegi differenciációja során, csakúgy, mint az NE-4C sejtek esetén, különböző expressziós mintázattal rendelkező homeobox (*emx2*, *dlx2*, *hoxb2*) és proneurális (*mash1*, *ngn2*) gének expresszálódtak. Ezzel párhuzamosan, glutamaterg (*vglut2*) és GABA-erg (*gad65*, *vgat*) markerek expressziója is kimutatható volt a tenyészetekben.

Az indukálatlan NE-4C sejtekhez hasonlóan (melyekben a VGAT transzportert fehérje szinten is kimutattuk), a *vgat* gén expressziója, az irodalmi adatoknak megfelelően (Andäng és mtsai, 2008; Oh és mtsai, 2005) az indukálatlan P19 és R1 sejtekben is kimutatható volt. A GABA a szinaptikus jelátvitelben betöltött funkcióján kívül, az embrionális fejlődés különböző folyamatainak (pl. a különböző őssejt populációk osztódásának és az idegi progenitorok migrációjának [Jelitai és mtsai, 2005; Andäng és mtsai, 2008]) szabályozásában vesz részt. Lehetséges, hogy a VGAT az ezekben a folyamatokban szerepet játszó nem szinaptikus GABA-felszabadulásban is részt vesz. A fejlődő idegrendszerben való eloszlása és működésének mechanizmusa a progenitor populációkban azonban nem ismert.

A P19 és R1 sejteken végzett kísérletek tehát alátámasztották, hogy az egy sej eredetű őssejtpopulációk *in vitro* idegi differenciációja során, kizárólag a tenyészeteken belül kialakuló kölcsönhatások következtében, számos regionális identitást és idegsejt sorsot meghatározó gén expressziója indukálódhat, és ezzel párhuzamosan különböző idegsejt típusok alakulhatnak ki.

6.4. Az *Emx2* homeodomén transzkripciós faktor túlexpresszáltatása megváltoztatja az NE-4C neuroektodermális őssejtek fenotípusát, és differenciációs kapacitását

Munkánk következő lépéseként megvizsgáltuk, milyen változást okoz az *emx2* régió specifikus homeobox gén expressziója a regionálisan elkötelezetlen NE-4C sejtek fenotípusában és differenciációjában. Ennek vizsgálatára az NE-4C vonal *emx2*-túltermelő (NE-4C^{*emx2+*}) al-klónjait hoztuk létre.

Az *Emx2* transzkripciós faktor expressziója az idegi fejlődés során a prosencephalikus régiókra korlátozódik. Az idegi fejlődés korai stádiumaiban, a főbb idegrendszeri régiók elkülönülésének idején, a peritectumtól az archipalliumig tartó területek identitásának kialakításában vesz részt (Kimura és mtsai, 2005). A fejlődés későbbi stádiumaiban, az idegrendszeri régiók kialakulásának idején, az *emx2* expressziója nagyrészt a dorzális előagyi (pallialis) területekre korlátozódik (Kimura és mtsai, 2005). Az *Emx2* a kérgi régiók megfelelő elhelyezkedésének, méretének (Bishop és mtsai, 2000), a talamokortikális beidegzés kialakulásának és a kérgi rétegződés kialakulásának szabályozásában vesz részt (Bishop és mtsai, 2003). Az *Emx2* transzkripciós faktornak az idegrendszer fejlődésére gyakorolt hatásai eddig főleg idegrendszeri régió szinten ismertek. Keveset tudunk azonban arról, melyek azok a sejt szintű folyamatok, melyeket az *Emx2* szabályoz.

6.4.1. Az NE-4C^{emx2+} sejtek megtartják idegi őssejt tulajdonságaikat, de úgy tűnik, az NE-4C alapvonalhoz képest egy későbbi fejlődési stádiumot képviselnek

Az NE-4C^{*emx2+*} klónok, az NE-4C klónhoz hasonlóan hosszú távon stabilan fenntartható, folyamatosan osztódó, homogén populációt képeztek. Az *emx2* transzkripciós faktor a fejlődő idegrendszerben a VZ progenitorokban (neuroepitéliális majd radiális glia sejtek) expresszáldik, és az idegsejt utódokban (néhány kivételtől eltekintve) nincsen jelen. Egyes irodalmi adatok alapján, az *Emx2* (a kísérletes körülményektől és a progenitor stádiumtól függően) a differenciálatlan állapot fenntartásában illetve az idegsejt képzés asztrogliá képzés rovására való serkentésében játszik szerepet (Brancaccio és mtsai, 2010). Az *emx2* transzgén folyamatos

expressziója azonban nem gátolja az NE-4C sejteknél korábban megfigyelt differenciációs folyamatok lezajlását. A kezdeti aggregációval párhuzamosan megjelennek az RC2 pozitív sejtek majd az idegsejt előalakok, illetve a *GFAP*-pozitív asztroglia sejtek, miközben a differenciáció során mindvégig fennmaradt egy SSEA-1 pozitív progenitor populáció.

Bár a sejtek önszaporító és az idegsejt- illetve asztroglia képző képességét nem befolyásolta az *emx2* túlexpresszáltatása, az NE-4C^{*emx2*+} sejtek számos szempontból a RA-val indukált NE-4C sejtekkel mutattak hasonlóságot. Ezen tulajdonságaik alapján úgy tűnik, egy „érettebb” progenitor populációt képviseltek, mint az NE-4C alapvonal.

A késői neuroepiteliális / radiális glia progenitor stádiumhoz köthető *hes3*, *pax6*, *blbp*, és *egfr* gének az NE-4C sejtek esetén csak az idegi differenciáció kiváltásával aktiválódnak, az NE-4C^{*emx2*+} sejtekben azonban, már indukátlan állapotban is expresszálódnak (A 11 NE-4C^{*emx2*+} klón expressziós mintázatának összehasonlításával kiszűrhetjük a transzgen random integrációjából - és nem az *emx2* gén működéséből - adódó hatásokat).

A *pax6* az elő- és köztiagyi területeken az *emx2* génével átfedő expressziós mintázatot mutat. A korai idegi fejlődés során a *Pax6* és *Emx2* transzkripciós faktorok együttműködnek a kaudális prosencephalikus területek regionális identitásának meghatározásában (Kimura és mtsai, 2005). A fejlődés során *in vivo* az *emx2* a *pax6* gént megelőzően kezd el expresszálódni (3 ill. 4 szomitás stádium). Suda és munkatársai (2001) eredményei alapján az *emx2* gén expressziójának területén a *pax6* gén expressziója közvetlenül vagy közvetve az *Emx2* szabályozása alatt áll. Elképzelhető, hogy az NE-4C^{*emx2*+} klónok esetén is közvetlen szabályozó kapcsolat áll fenn az *Emx2* és *Pax6* között.

A *Pax6* transzkripciós faktor szerepet játszik a kérgi radiális glia fenotípus kialakításában (Götz és mtsai, 1998) és szükséges a kérgi radiális glia sejtek idegsejt képzéséhez (Heins és mtsai, 2002). Az ES sejtekből való radiális glia képzéshez is a *pax6* gén aktiválódására van szükség (Suter és mtsai, 2009). Bár az NE-4C^{*emx2*+} klónok nagyobb része a radiális glia sejtekre jellemző *blbp*-t az NE-4C sejtekhez képest nagyobb mértékben expresszálta, NE-4C^{*emx2*+} sejtek nem mutattak sem a radiális glia sejtekre jellemző, megnyúlt morfológiát, sem RC2 immunopozitivitást.

Hatakeyama és munkatársainak *in vivo* eredményei alapján (Hatakeyama és mtsai, 2004) a neuroepitélialis sejtek fennmaradása kezdetben *Hes*-független, majd a fejlődés előrehaladtával a késői neuroepitélialis és a radiális glia sejtek fennmaradása *Hes*-aktivitás (*Hes1* és *Hes3* később *Hes1* és *Hes5*) függővé válik. Az NE-4C sejtek indukátlan állapotban nem, vagy csak kis mértékben expresszálták a *hes3* gént, és a *hes* gének (*hes1*, *hes3*, *hes5*) expressziója csak az idegi differenciációval növekedett meg az NE-4C tenyészetekben (be nem mutatott adatok).

Az NE-4C^{*emx2+*} klónokra jellemző volt az *EGF*-receptor génjének megnövekedett expressziója. Az NE-4C sejtek indukátlan állapotban alacsony *egfr* expressziós szintet mutattak, majd a RA-val indukált differenciációjuk során megnövekedett az *egfr* mRNS szintje a tenyészetekben (be nem mutatott adatok). Az idegrendszer fejlődése során az idegi progenitorok kezdetben nem érzékenyek az *EGF* növekedési faktorra, és az *EGF* receptor csak a fejlődés későbbi stádiumaiban jelenik meg az őssejtek felszínén (Tropepe és mtsai, 1999, Ciccolini, 2001).

Az endogén *emx2* lokusz átíródása az NE-4C^{*emx2+*} klónokban azt jelzi, hogy az *Emx2* képes (közvetlenül vagy közvetve) saját expressziójának serkentésére.

Az NE-4C^{*emx2+*} sejtek, adhézios tulajdonságaik tekintetében is az indukált NE-4C sejtekkel mutattak hasonlóságot. Szemben a lazább sejtrétegben növő NE-4C sejtekkel, az NE-4C^{*emx2+*} sejtek aggregált (de egy- sejt-réteget alkotó), tömött foltokban nőnek. Ehhez hasonló (bár még kifejezettebb) aggregáció jellemzi az NE-4C sejteket is, közvetlenül a RA-as kezelés után.

Az *emx2* expresszió hatására megváltozott mind az NE-4C^{*emx2+*} sejtek sejt-sejt kapcsolatokért felelős *cadherin*, mind a sejt-extracelluláris mátrix kapcsolat kialakításáért felelős *integrin* molekula készlete. Az indukátlan NE-4C sejtek felszínén az *N-* és *E-cadherin* molekulák is kimutathatóak voltak (Tárnok és mtsai, 2002). Az *emx2* expresszió hatására azonban, az NE-4C sejtek felszínén az *E-cadherin* molekulák mennyisége lecsökkent. Hasonló csökkenés volt tapasztalható, laboratóriumunk korábbi munkái során, az NE-4C sejtek *E-cadherin* immunpozitivitásában a retinsvas indukció hatására, a kezdeti aggregációval párhuzamosan (Tárnok és mtsai, 2002). Az *in vivo* idegi fejlődés során az *E-cadherin* szint csökkenése és ezzel egyidejűleg az *N-cadherin* szint növekedése a neuroepitélialis

sejtek „érésével” hozható párhuzamba (Aaku-Saraste és mtsai, 1996). Bár az *E-cadherin* nem tűnik el teljesen az idegi őssejtek adherens kapcsolataiból (Rasin és mtsai, 2007), a velőcső záródásával szerepét egyre inkább az *N-cadherin* veszi át.

Az *emx2* expresszió hatására, az NE-4C^{*emx2+*} sejtek az NE-4C sejtekben expresszálódnak *integrin* alegységeken kívül, olyan alegységeket is expresszáltak (αv , $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 8$), melyek az NE-4C sejtekben csak az idegi differenciáció során kezdtek el kifejeződni.

Azt, hogy az NE-4C^{*emx2+*} sejtek az NE-4C alapvonalhoz képest az idegi differenciáció előrehaladottabb stádiumában vannak, alátámasztja, hogy az indukátlan állapotot fenntartó növekedési faktorok megvonásának hatására a differenciációs lépések az NE-4C^{*emx2+*} sejtek esetén gyorsabban következnek be.

Az NE-4C és NE-4C^{*emx2+*} sejtek differenciálódása a sejtek fenntartásához használt körülmények között gátolt, a sejtek folyamatosan osztódó állapotban tarthatók. A differenciálatlan, osztódó állapot fenntartását támogató faktorok jelen vannak az NE-4C sejtek hosszú távú fenntartásához használt tápoldat borjú szérum komponensében. Bár az idegi őssejtek növekedési faktor igénye a fejlődés során változik, az idegi őssejtek hosszú távú fenntartására legáltalánosabban *EGF*-et és *FGF2*-t tartalmazó, definiált médiumot alkalmaznak (Conti és mtsai, 2005; Pollard és mtsai, 2006). Az NE-4C sejtekhez hasonlóan, az NE-4C^{*emx2+*} sejtek is folyamatosan osztódnak, és megőrzik differenciálatlan állapotukat 20 ng/ml *EGF*-et és 10 ng/ml *FGF2*-t tartalmazó MEM-F12-ITS oldatban.

Ha az *EGF*- és *FGF2*-mentes definiált tápba helyezzük a sejteket, az NE-4C^{*emx2+*} sejtek 12 órán belül gyors aggregációt mutatnak, és a kompakt aggregátumokban már 48 órán belül megjelennek az RC2 immunopozitív radiális glia szerű sejtek, és a βIII -*tubulin* pozitív idegsejt előalakok. Az NE-4C sejtek azonban, bár az *FGF2* és *EGF* faktorok megvonásával differenciálthatóak, a mitogén megvonás utáni második napon még az indukátlan sejtekkel megegyező morfológiával rendelkeztek, és tenyészetükben sem RC2 sem βIII -*tubulin* immunpozitivitás nem volt kimutatható.

A növekedési faktor megvonásra hamarabb bekövetkező differenciációs lépések háttérében lehetséges, hogy részben az NE-4C^{*emx2+*} sejtek megváltozott adhéziós sajátosságai állnak. Laboratóriumunk korábbi eredményei alapján (Tárnok és mtsai, 2002) az NE-4C sejtek idegsejt-képzésének előfeltétele a szoros sejt-sejt kapcsolatok létrejötte

(aggregáció). Mivel az NE-4C^{emx2+} sejtek indukátlan állapotban is aggregált foltokban nőttek, és adhézións molekula készletük ahhoz volt hasonló, ami az NE-4C sejtekben a RA-kezelés hatására alakult ki, elképzelhető, hogy ez a megnövekedett aggregációs készség okozta az RC2 illetve *βIII-tubulin* pozitív sejtek gyorsabb megjelenését az az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben. A differenciációs folyamatok „felgyorsulásában” szerepet játszhatott emellett az is, hogy, mint azt az előzőekben láthattuk, az NE-4C^{emx2+} sejtek indukátlan állapotban több olyan fejlődést szabályozó gént is expresszáltak, melyek aktivációjához az NE-4C sejtekben differenciáltató lépésre (RA-kezelés vagy EGF és FGF2 megvonás) volt szükség. Így, elképzelhető, hogy az idegi differenciáció egy lépést (progenitor stádiumot) átugorva indulhatott meg az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben.

6.4.2. Az emx2 transzgén expressziója nem változtatja meg jelentős mértékben az NE-4C sejtek regionális „elkötelezettségét”, de hatással van a kialakuló idegsejtek fenotípusára

Az *emx2* gén a fejlődő idegrendszerben a prosencephalikus, majd ezen belül is a dorzális előagyi területeken fejeződik ki, és e területek regionális identitásának meghatározásában jelentős szerepet játszik. Feltételezhető volt tehát, hogy az *Emx2* a regionálisan elkötelezetlen NE-4C sejtek fenotípusát a fejlődő idegrendszeren belül való expressziós területének irányába tolja el. Az idegi differenciáció során azonban, az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben az NE-4C sejtekhez hasonlóan aktiválódtak a különböző régió specifikus homeobox és proneurális gének.

Az *Emx2* nem determinálta az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben kialakuló idegsejtek fenotípusát sem. Az *Emx2* az idegsejt képzés idején *in vivo* döntően a kérgi glutamaterg neuronokat képező dorzális előagyi VZ progenitoraiban expresszálódik. Feltételezhető volt ezért, hogy szerepet játszhat a glutamaterg idegsejt fenotípus kialakításában és ezáltal az egyéb idegsejt fenotípusok kialakulásának gátlásában. Az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben azonban, csakúgy, mint az NE-4C tenyészetekben, a glutamaterg markerek mellett a GABA-erg, szerotonerg és kolinerg markerek is megjelentek.

Bár az *emx2* transzgén expressziója nem gátolta az NE-4C tenyészetekben kialakuló GABA-erg fenotípus létrejöttét, érdekes módon, az indukátlan NE-4C^{emx2+} tenyészetekben (közvetlenül vagy közvetve) gátolta a vezikuláris *GABA-transzporter*

kifejeződését. Bár a *VGAT* jelenlétét már több kutatócsoport kimutatta különböző őssejt típusokon (Oh és mtsai, 2005; Andäng és mtsai, 2008), pontos funkciójának kiderítése az idegi progenitorokban további vizsgálatokat igényel.

Az NE-4C sejtekkel ellentétben, melyek a vizsgált körülmények között nem képeztek katekolaminerg idegsejteket, az NE-4C^{emx2+} sejtek RA-val indukált differenciációja során kialakultak *TH*-pozitív katekolaminerg idegsejtek. RT-PCR adatok alapján, az NE-4C^{emx2+} tenyészetekben a noradrenerg és adrenerg sejtekre jellemző *DBH* enzim és a posztmitotikus középagyú dopaminerg sejtekre jellemző *Pitx3* homeodomén transzkripciós faktor génje is kifejeződött.

Mivel az *Emx2* transzkripciós faktor jellemzően nem a katekolaminerg idegsejtek kialakulásának területén expresszálódik (Kimura és mtsai, 2005), valószínűleg közvetlenül nem vett részt a katekolaminerg idegsejtek differenciációs programjában. Erre utal az a megfigyelésünk is, hogy bár GABA és glutamaterg idegsejtek a differenciálatlan állapotot fenntartó faktorok megvonásának hatására is kialakultak, a katekolaminerg sejtek kialakulásához retinsavas kezelésre volt szükség. A disszertációban be nem mutatott eredményeink szerint, az NE-4C^{emx2+} sejtek az NE-4C sejtekhez képest megváltozott *retinsav receptor* alegység és retinsav termelő enzim – *Raldh*- készlettel rendelkeztek. A *RARβ* és a *raldh1* megnövekedett expressziót mutatnak az NE-4C^{emx2+} klónokban. Bizonyos, humán neuroblasztóma sejtek idegi fejlődésének vizsgálatából származó irodalmi adatok arra utalnak, hogy a RA-szignalizáció közvetlenül befolyásolhatja a katekolaminerg sejtek kialakulását (Jeong és mtsai, 2006).

A katekolaminerg idegsejtek kialakulásához szükséges transzkripciós faktorok közül többnek az expressziója kimutatható volt az NE-4C sejtek differenciációja során is, és bár kis mértékben, de átmenetileg a *DBH* enzim génje is expresszálódott az NE-4C tenyészetekben. Elképzelhető ezért, hogy bár a posztmitotikus idegsejtek kialakulnak, a katekolaminerg idegsejtek éréséhez és/vagy túléléséhez szükséges faktorok hiányoznak az NE-4C tenyészetekből. Lehetséges, hogy az *emx2* expressziója a katekolaminerg idegsejtek éréséhez, fennmaradásához szükséges körülmények kialakulását, és nem a progenitorok katekolaminerg irányba való elköteleződését indukálja.

Bár az *emx2* expressziója az irodalmi adatok szerint nem jellemző a katekolaminerg sejteket kialakító idegrendszeri területekre, az NE-4C^{emx2+} klónokban indukálódó *pax6*

expresszióját kimutatták bizonyos katekolaminerg idegsejt csoportokban (Vitalis és mtsai, 2000). Zebraalon és egéren végzett kísérletek alapján, a *Pax6* szerepet játszhat bizonyos köztiagyi, ventrális előagyi és szaglógumó (bulbus olfactorius) *TH*-pozitív idegsejtek kialakulásában (Vitalis és mtsai, 2000; Mastick és Andrews, 2001; Wullimann és Rink, 2001, Kohwi és mtsai, 2005).

Bár az *emx2* gén az NE-4C sejtek differenciációja során is kifejeződött, ezekben a tenyészetekben mégsem alakultak ki katekolaminerg idegek. Lehetséges, hogy mivel az *emx2* NE-4C^{*emx2*+} sejtekben folyamatosan expresszálódott, egy sejten belül fordulhatott elő olyan transzkripciós faktorokkal, melyekkel az NE-4C tenyészetekben esetleg nem expresszálódott együtt egyazon sejten belül, és melyekkel együttműködve támogatta a katekolaminerg sejtek létrejöttét/ fennmaradását.

A retinsavas indukció szükségessége azonban arra utal, hogy az *emx2* katekolaminerg sejtek kialakulását/ túlélését serkentő hatásához szükséges, hogy az *emx2* az idegi differenciáció kezdeti stádiumában expresszálódjon.

6.5. A retinsav fejlődési stádium függően szabályozza az asztroglia képzés folyamatát

A retinsavval indukált P19 és NE-4C őssejtek *in vitro* idegi differenciálódása során, az *in vivo* folyamatokhoz hasonlóan, *GFAP*-pozitív asztroglia sejtek csak az idegsejtek többségének kialakulása után, ezek érésével párhuzamosan alakulnak ki annak ellenére, hogy bizonyos, az asztroglia képzést serkentő faktorok génjei (*cntf*, *bmp*) már a korai differenciációs szakaszokban is kifejeződnek a tenyészetekben. Bizonyos adatok szerint, a posztmitotikus idegsejtek által termelt faktorok szerepet játszanak az asztroglia irányú differenciáció serkentésében, ezért az asztroglia képzés megindulásához megfelelő számú idegsejt jelenlétére van szükség (Namihira és mtsai, 2009; Barnabe-Heider és mtsai, 2005). Az elköteleződés korai fázisában levő NE-4C progenitorok azonban, idegsejtekben gazdag környezetbe helyezve sem képeztek „idő előtt” asztroglia sejteket.

Mindezek alapján feltételeztük, hogy az idegi differenciáció korai stádiumaiban jelenhetnek olyan faktorok, melyek az asztroglia képzést közvetlenül gátolják.

Saját eredményeink és irodalmi (Luo és mtsai, 2004) adatok alapján, a RA az idegsejt képzés szakaszában jelen van a dorzális előagyi progenitorok környezetében, melyeknek az idegsejt irányba való differenciációját támogatja (Siegenthaler és mtsai, 2009). Az azonban, hogy a RA ezzel párhuzamosan hogyan hat az asztroglia képzésre, kevésbé ismert.

Adataink szerint, az NE-4C és P19 sejtek indukálására használt kezdeti, 48 órás RA-as indukció nem gátolta a később fejlődő asztroglia sejtek kialakulását. Sőt, míg bizonyos mértékű idegsejt képzés RA-as indukció nélkül, a differenciálatlan állapotot fenntartó növekedési faktorok megvonásával is kiváltható volt az NE-4C tenyészetekben, az asztroglia sejtek kialakulásához szükség volt a kezdeti RA-as kezelésre. A RA folyamatos jelenléte az idegsejt képzés időszakában sem gátolta a későbbiekben - az idegsejt képzés után- bekövetkező asztroglia képződést.

A differenciáció fő idegsejt képző szakasza után, az asztroglia képző stádiumaiban adott RA azonban, jelentősen csökkentette a kialakuló *GFAP*-pozitív sejtek számát, mind a P19 mind az NE-4C tenyészetekben. A RA-as kezelés ugyanakkor, nem növelte a képződő idegsejtek, illetve nem csökkentette az SSEA-1 pozitív progenitorok számát, és a tenyészetekben a RA megvonását követően, szinte azonnal megjelentek a *GFAP*-pozitív asztroglia sejtek (be nem mutatott eredmények). A RA tehát nem azáltal csökkentette a kialakuló asztroglia sejtek mennyiségét, hogy a tenyészetekben fennmaradt progenitorok idegsejt irányú differenciációját okozta. Nem tapasztaltunk jelentős változást az apoptotikus sejtek számában, illetve az asztroglia képzést serkentő *CNTF* és *BMP* faktorok expressziós szintjében (be nem mutatott eredmények) sem.

Asztroglia sejtekben gazdag tenyészeteket RA-val kezelve, nem tapasztaltunk csökkenést a *GFAP* immun-pozitivitás mértékében (be nem mutatott eredmények). Nem arról van szó tehát, hogy a RA a *gfap* promoteren hatva csupán a *GFAP* fehérje mennyiségét szabályozza az asztroglia sejtekben.

A RA tehát közvetlenül és csak jelenléte alatt gátolta a *GFAP* pozitív asztroglia sejtek kialakulását.

Az NE-4C sejtek által termelt, endogén RA transzkripciót szabályozó hatását az asztroglia képző szakaszban a pán-RAR antagonistá AGN193109-cel (Johnson és mtsai, 1995) gátolva jelentősen nőtt a *GFAP* pozitív sejtek száma. Az idegsejt képzés szakaszában alkalmazott AGN kezelés azonban nem okozott idő előtti asztroglia képzést. Az idegsejt képző szakaszban tehát, a differenciálódó NE-4C sejtek által termelt retinsav magreceptorokon át érvényesülő hatása nem lehet felelős az asztroglia irányú differenciáció gátlásáért. Később azonban, az endogén retinsav szerepet játszik a *GFAP*-pozitív sejtek mennyiségének szabályozásában.

Eredményeink nem igazolták, hogy a RA közvetlenül gátolná az asztroglia képzést az idegsejt képzés időszakában, és így közvetlenül részt venne az „idegsejtképzés először – asztroglia képzés csak ezt követően” mechanizmus szabályozásában. Mivel a RA a korai őssejt/ progenitor populációkban idegsejt irányú differenciációt okoz, elképzelhető, hogy ezáltal, szerepet játszik az asztroglia képzés (átmeneti) háttérbe szorulásában.

Adataink azt bizonyítják, hogy a RA az idegi fejlődés eltérő stádiumaiban más-más sejsors meghatározó folyamatokat szabályoz. A differenciálatlan NE-4C és P19 őssejtekben idegsejt irányú fejlődést indukál, ugyanakkor egyes fejlődő sejtpopulációkban megalapozza a későbbi asztroglia képzés lehetőségét. Az idegsejt képzés lezajlása után pedig az asztroglia irányú differenciáció mértékét szabályozza.

Kutatásainkkal egy időben két másik munkacsoport is megfigyelte a retinsav gliagenezist szabályozó hatását (Faigle és mtsai 2008, Asano és mtsai, 2009). Faigle és munkatársai *CNTF* kezeléssel indukáltak asztroglia képzést primer idegi tenyészetekben. Eredményeik azt mutatták, hogy a *CNTF* kezelést megelőző retinsavas előkezelés a korai (E13) kérgi progenitorokban gátolta, míg a késői (E17) progenitorokban segítette a *CNTF* asztroglia képzést indukáló hatását. Asano és munkatársai a retinsav *LIF*-ral indukált asztroglia képzést támogató hatását írták le a korai idegsejt képző stádiumából (E14,5) származó kérgi progenitorokban.

A RA-szignalizációnak az asztroglia képzést serkentő útvonalakkal való kapcsolata mára részben feltérképezett. Az idegsejt képzés szakaszában az asztroglia specifikus gének (lásd Bevezetés) és a citokinek által aktivált jelpálya (JAK/STAT útvonal)

elemeit kódoló gének promóter régiói metiláltak. Az idegsejt képzés előrehaladtával, a keletkező idegsejtek által aktivált Notch jelátviteli útvonal a fent említett gének promotereinek demetilációját okozza (4. Ábra). Ezt követően, a progenitorok környezetében jelenlevő citokinek (*LIF*, *CNTF*, *CT-1*) a JAK-STAT útvonalat aktiválják, mely a *BMP* fehérjék által aktivált útvonallal együttműködve, a *RAR α* retinsav receptor kifejeződését serkenti. A *RAR α* a retinsav kötődést követően a citokin és *BMP* útvonalak által aktivált *Stat3-p300/CBP-Smad* transzkripciót aktiváló komplexhez kötődik, növelve annak aktivitását. A *Stat3-p300/CBP-Smad-RAR α* komplex, többek között hiszton acetiláz aktivitásán keresztül, az asztroglia sejtekre jellemző gének kifejeződését serkenti (Asano és mtsai, 2009, Herrera és mtsai, 2010). Mindezek alapján tehát, a retinsav asztroglia képzést serkentő hatásához az asztroglia specifikus és a citokinek által aktivált jelátviteli útvonalak génjeinek demetilált állapota, a *BMP* és citokin faktorok és a *RAR α* retinsav receptor együttes jelenléte szükséges.

A retinsav asztroglia képzést gátló mechanizmusa azonban nem tisztázott. Faigle és mtsai (2008) eredményei szerint, a gátló hatáshoz a *RAR α* és/vagy *RAR β* , míg az asztroglia képzést serkentő retinsav hatáshoz *RAR α* és/vagy *RAR γ* receptorok és *CNTF* jelenléte szükséges. Kísérleteinkben a *RAR β* expressziójának csökkenését figyelték meg a késői (E17) kérgi progenitorokban, a korai idegsejt képző stádiumból származó (E13) kérgi progenitorokhoz képest. Ezt tették felelőssé a retinsav hatás irányában bekövetkező váltásért.

Az NE-4C sejtek indukátlan állapotban a *RAR α* és *RAR γ* receptorokat expresszálják. A *RAR β* receptor expressziója nem mutatható ki az indukátlan NE-4C tenyészetekben, de az idegi differenciáció megindulásával jelentős mértékűvé válik, és a differenciáció folyamán végig (az idegsejt képző szakaszban és az azt követő asztroglia képző szakaszban egyaránt) jelen van a tenyészetekben (be nem mutatott eredmények).

A retinsav receptorok eloszlása a differenciáció különböző stádiumában álló sejtekben, az asztroglia képzést serkentő jelátviteli útvonalak működési állapota és az asztroglia specifikus gének promotereinek epigenetikai állapota az NE-4C tenyészetekben egyelőre nem ismert. Eredményeink és az irodalmi adatok alapján azonban elképzelhető, hogy az *RAR α* és *RAR γ* receptorokat expresszáló NE-4C

sejtekben a kezdeti retinsavas kezelés az asztroglia specifikus promóterek „részleges aktivációját” okozta. A retinsavas indukció hatására megnövekedett *RAR β* expresszió, a differenciáció későbbi szakaszaiban, a gliagenezist gátló irányba tolhatta el a retinsav hatást. Faigle és munkatársainak munkájával ellentétben, nem tapasztaltunk csökkenést a *RAR β* expressziós szintjében (legalábbis, tenyészet szinten nem) az NE-4C sejtek idegi differenciációja során. Ez magyarázhatja, hogy az általuk leírt, asztroglia képzést serkentő hatást sem tapasztaltuk az idegi differenciáció késői szakaszaiban.

Figyelembe kell azonban venni, hogy a két *in vitro* differenciációs modell alapvetően különbözik: az általunk vizsgált NE-4C differenciációs korai neuroepitél stádiumú progenitor sejtekből indul, míg Faigle és munkatársai már előagyi elkötelezettséggel bíró, érettebb progenitorok fejlődési útvonalaikat elemezték. A különböző kísérleti eredmények azonban egybehangzóan bizonyítják, hogy a retinsav fejlődési időablakonként eltérő hatásokat vált ki.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

A kiinduláskor homogén őssejt populációk *in vitro* idegi differenciációját vizsgáló Doktori munkám eredményei alapján a következő megállapítások tehetők:

8. A korai idegi fejlődési stádiumból származó NE-4C őssejtek *in vitro* körülmények között regionálisan elkötelezetlenek.

9. Az egy sejt eredetű őssejtpopulációk (NE-4C idegi őssejtek, R1 embrionális őssejtek illetve P19 teratokarcinoma sejtek) *in vitro* idegi differenciációja során a tenyészeteken belül kialakuló kölcsönhatások következtében, számos regionális identitást és idegsejt sorsot meghatározó gén expressziója indukálódhat, és ezzel párhuzamosan különböző idegsejt típusok alakulhatnak ki.

10. Az idegsejtekben gazdag NE-4C tenyészetekben glutamaterg, GABA-erg, szerotonerg és kolinerg idegsejt markerek is kimutathatók, katekolaminerg sejtek azonban, a vizsgált körülmények között, nem alakulnak ki.

11. Az elő-és köztiagyi regionalizációs folyamatokat szabályozó *Emx2* transzkripciós faktor túlexpresszáltatása megváltoztatta az NE-4C idegi őssejtek fenotípusát, és differenciációs kapacitását.

- Az NE-4C^{*emx2*+} sejtek bár megtartották idegi őssejt potenciáljukat, az NE-4C alapvonalhoz képest egy későbbi fejlődési stádiumot képviselnek. Indukátlan állapotban expresszálnak olyan, progenitor fenotípust szabályozó géneket, melyek az NE-4C alapvonalban csak az idegi differenciációval aktiválódnak, fokozottabb aggregációs képességgel rendelkeznek, és a differenciálatlan állapotot fenntartó körülmények megszűnésére gyorsabban reagálnak.

- Az *emx2* transzgén kifejeződésének ellenére, az NE-4C^{*emx2*+} sejtek regionálisan elkötelezetlenek maradtak.

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

• Az NE-4C sejtek, az asztroglia irányú differenciációt serkentő körülmények (*cntf*, *bmp* expresszió illetve idegsejt-gazdag környezet) jelenlétének ellenére sem

képeznek asztroglia sejteket a differenciáció korai stádiumaiban. A GFAP-pozitív sejtek csak később, az idegsejt képzést követően jelennek meg.

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

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

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkám során azokat az *in vitro* idegi differenciációs folyamatokat vizsgáltam, melyek során a kiinduláskor homogén őssejt-populációkból heterogén, különböző idegsejt-típusokat és asztrogliá sejteket tartalmazó tenyészetek alakulnak ki.

Az idegi őssejtek *in vivo* már a fejlődés korai stádiumaitól kezdve eltérő transzkripciós faktor készlettel rendelkeznek annak megfelelően, hogy az idegrendszer kezdemény mely területén helyezkednek el. Ezek a kezdeti regionális különbségek a későbbiekben a különböző idegrendszeri régiók, és ezen belül a különböző idegsejt típusok kialakulásában nyilvánulnak meg. Munkám során arra kerestem a választ, hogy *in vitro* körülmények között rendelkeznek-e regionális meghatározottsággal az idegi (NE-4C), illetve idegi irányba differenciáltható (P19, R1) őssejtek. Az *in vitro* indukált differenciáció során, a különböző idegrendszeri régiók fejlődésében szerepet játszó transzkripciós faktorok széles skálája expresszáldott, és többféle idegsejt típus is kialakult a tenyészetekben. Az általunk vizsgált őssejt populációk tehát nem rendelkeznek egy adott idegrendszeri régióknak megfelelő regionális elkötelezettséggel.

A következőkben azt vizsgáltam, hogyan befolyásolja a regionálisan elkötelezetlen NE-4C sejtek fenotípusát és differenciációs képességét egy, az elülső idegrendszeri területek kialakulását szabályozó transzkripciós faktor, az *Emx2*, túltermeltetése. Bár az *emx2*-t túlexpresszáldó sejtek regionálisan elkötelezetlenek maradtak, az *Emx2* túltermeltetése változásokat okozott az őssejtek fenotípusában és differenciációs kapacitásában. Eredményeink szerint, az *emx2*-t túlexpresszáldó sejtek az NE-4C alapvonalnál az idegi fejlődésben előrehaladottabb progenitor stádiumot képviselnek és az NE-4C sejtekkel ellentétben, katekolaminerg markereket hordozó idegsejtek kialakítására is képesek voltak kísérleti körülményeink között.

Doktori munkám további részében az *in vitro* idegsejt képzés elősegítésére széleskörűen használt *all-transz* retinsav hatását vizsgáltam az asztrogliá képzés folyamatára. Eredményeink szerint, míg a differenciáció kezdetén alkalmazott retinsav elengedhetetlen volt a későbbi asztrogliá képzéshez, az asztrogliá sejtek képződésének időszakában alkalmazott retinsav gátolta a *GFAP*-pozitív asztrogliá sejtek kialakulását.

9. SUMMARY

In the present work establishment of cellular heterogeneity was investigated during the *in vitro* neural differentiation of initially homogeneous stem cells populations.

The forming neural tissue is divided from the early developmental stages into regions in which neural stem cells express defined sets of transcription factors. The regulatory effects of these “region specific transcription factors“ results in restricted activation of neuron subtype specific differentiation programs and leads to the production of neuron phenotypes specific for the given brain area. The aim of my work was to investigate if stem cells (NE-4C neural stem cells, P19 embryonic carcinoma cells and R1 embryonic stem cells) maintained and induced to differentiate *in vitro* have any regional commitment. During the *in vitro* induced neural differentiation, broad range of region specific transcription factors, specific for different brain areas *in vivo*, got activated. Accordingly, neurons with various neurotransmitter phenotypes were generated. Investigated stem cells therefore, seem to be regionally uncommitted. Next, we overexpressed the transcription factor *Emx2*, one of the key regulators of prosencephalic regionalisation processes *in vivo*, in NE-4C cells. Despite the continuous expression of *emx2*, NE-4C^{*emx2*+} cells seem to retain their regionally uncommitted state. However *emx2*-overexpression caused changes in the progenitor phenotype and differentiation potential. Although NE-4C^{*emx2*+} cells retain stem cell potential, they represent a more advanced progenitor phenotype than NE-4C cells, according to their gene expression pattern, adhesion properties, and their responsiveness for mitogen retrieval. In contrast to NE-4C cells which did not produce catecholaminergic cells between the given conditions, NE-4C^{*emx2*+} cells gave rise to tyrosine hydroxylase positive neurons, and expressed several catecholaminergic markers in the neuron rich cultures.

During my work I also investigated the effect of *all trans retinoic acid* - a well-known inducer of neuronal differentiation *in vivo* and *in vitro* – on the *in vitro* astroglia forming processes. According to our data, retinoic acid exerts developmental stage dependent effects on *in vitro* astroglia genesis: while it is needed for committing neural progenitors for a future production of astrocytes, it inhibits the formation of GFAP-positive astroglial cells during astroglia forming period.

10. HIVATKOZÁSOK

- Aaku-Saraste E, Hellwig A, Huttner WB., Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev Biol.* 180(2):664-79. (1996)
- Acampora D, Gulisano M, Broccoli V, Simeone A, Otx genes in brain morphogenesis. *Prog Neurobiol.* 64(1):69-95. (2001)
- Akimoto J, Itoh H, Miwa T, Ikeda K. Immunohistochemical study of glutamine synthetase expression in early glial development. *Brain Res Dev Brain Res.*, 72(1):9-14. (1993)
- Andäng M, Hjerling-Leffler J, Moliner A, Lundgren TK, Castelo-Branco G, Nanou E, Pozas E, Bryja V, Halliez S, Nishimaru H, Wilbertz J, Arenas E, Koltzenburg M, Charnay P, El Manira A, Ibañez CF, Ernfors P, Histone H2AX-dependent GABA(A) receptor regulation of stem cell proliferation. *Nature* 451(7177):460-4. (2008)
- Anderson S, Mione M, Yun K, Rubenstein JL, Differential origins of neocortical projection and local circuit neurons: role of Dlx genes in neocortical interneuronogenesis. *Cereb Cortex* 9(6):646-54. (1999)
- Anderová M, Kubinová S, Jelítai M, Neprasová H, Glogarová K, Prajerová I, Urdzíková L, Chvátal A, Syková E, Transplantation of embryonic neuroectodermal progenitor cells into the site of a photochemical lesion: immunohistochemical and electrophysiological analysis. *J Neurobiol.* 66(10):1084-100. (2006)
- Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N, Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 41(6):881-90. (2004)
- Anthony TE, Heintz N, Genetic lineage tracing defines distinct neurogenic and gliogenic stages of ventral telencephalic radial glial development, *Neural Dev.* 3:30. (2008)
- Asano H, Aonuma M, Sanosaka T, Kohyama J, Namihira M, Nakashima K, Astrocyte differentiation of neural precursor cells is enhanced by retinoic acid through a change in epigenetic modification. *Stem Cells* 27(11):2744-52. (2009)
- Avantaggiato V, Acampora D, Tuorto F, Simeone A, Retinoic acid induces stage-specific repatterning of the rostral central nervous system. *Dev Biol.* 175(2):347-57. (1996)
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI, Embryonic stem cells express neural properties in vitro. *Dev Biol.* 168(2):342-57. (1995)
- Baizabal JM, Covarrubias L, The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Dev Biol.* 325(1):49-59. (2009)

- Baizabal JM, Valencia C, Guerrero-Flores G, Covarrubias L, Telencephalic neural precursor cells show transient competence to interpret the dopaminergic niche of the embryonic midbrain. *Dev Biol.* 349(2):192-203. (2011)
- Barnabé-Heider F, Wasylnka JA, Fernandes KJ, Porsche C, Sendtner M, Kaplan DR, Miller FD, Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1. *Neuron* 48(2):253-65. (2005)
- Barry D és McDermott K, Differentiation of radial glia from radial precursor cells and transformation into astrocytes in the developing rat spinal cord. *Glia* 50(3):187-97. (2005)
- Bishop KM, Goudreau G, O'Leary DD, Regulation of area identity in the mammalian neocortex by *Emx2* and *Pax6*. *Science* 288(5464):344-9. (2000)
- Bishop KM, Garel S, Nakagawa Y, Rubenstein JL, O'Leary DD, *Emx1* and *Emx2* cooperate to regulate cortical size, lamination, neuronal differentiation, development of cortical efferents, and thalamocortical pathfinding. *J Comp Neurol.* 457(4):345-60. (2003)
- Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, Stahl N, Yancopoulos GD, Greenberg ME, Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 278(5337):477-83. (1997)
- Boulland JL, Qureshi T, Seal RP, Rafiki A, Gundersen V, Bergersen LH, Fremeau RT Jr, Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA, Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J Comp Neurol.* 480(3):264-80. (2004)
- Bouillet P, Chazaud C, Oulad-Abdelghani M, Dollé P, Chambon P, Sequence and expression pattern of the *Stra7* (*Gbx-2*) homeobox-containing gene induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells. *Dev Dyn.* 204(4):372-82. (1995)
- Brancaccio M, Pivetta C, Granzotto M, Filippis C, Mallamaci A, *Emx2* and *Foxg1* inhibit gliogenesis and promote neuronogenesis. *Stem Cells* 28(7):1206-18. (2010)
- Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54. (1976)
- Brodmann K, Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. J. A, Barth, Leipzig (1909)
- Bulfone A, Kim HJ, Puelles L, Porteus MH, Grippo JF, Rubenstein JL, The mouse *Dlx-2* (*Tes-1*) gene is expressed in spatially restricted domains of the forebrain, face and limbs in midgestation mouse embryos. *Mech Dev.* 40(3):129-40. (1993)
- Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, Muhr J, Vertebrate neurogenesis is counteracted by *Sox1-3* activity. *Nat Neurosci.* 6(11):1162-8. (2003)
- Cameron RS, Rakic P, Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia* 4(2):124-37. (1991)

- Capela A és Temple S, LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35(5):865-75. (2002)
- Capela A és Temple S, LeX is expressed by principle progenitor cells in the embryonic nervous system, is secreted into their environment and binds Wnt-1. *Dev Biol.* 291(2):300-13. (2006)
- Casper KB és McCarthy KD, GFAP-positive progenitor cells produce neurons and oligodendrocytes throughout the CNS. *Mol Cell Neurosci.* 31(4):676-84. (2006)
- Caviness VS Jr., Architectonic map of neocortex of the normal mouse. *J Comp Neurol.* 164(2):247-63. (1975)
- Chen L, Guo Q, Li JY, Transcription factor Gbx2 acts cell-nonautonomously to regulate the formation of lineage-restriction boundaries of the thalamus. *Development* 136(8):1317-26. (2009)
- Chizhikov VV, Millen KJ, Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system. *Dev Biol.* 277(2):287-95. (2005)
- Ciccolini F, Identification of two distinct types of multipotent neural precursors that appear sequentially during CNS development. *Mol Cell Neurosci.* 17(5):895-907. (2001)
- Conti L, Pollard SM, Gorba T, Reitano E, Toselli M, Biella G, Sun Y, Sanzone S, Ying QL, Cattaneo E, Smith A, Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol.* 3(9):e283 (2005)
- Conti L, Cattaneo E, Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nat Rev Neurosci.* 11(3):176-87. (2010)
- Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U, Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U, *Brain Res Dev Brain Res.* 84(1):109-29. (1995)
- Dai JP, Lu JY, Zhang Y, Shen YF, Jmjd3 activates Mash1 gene in RA-induced neuronal differentiation of P19 cells. *J Cell Biochem.* 110(6):1457-63. (2010)
- De Marco García NV, Karayannis T, Fishell G, Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. *Nature* 472(7343):351-5. (2011)
- Dessaud E, McMahon AP, Briscoe J, Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* 135(15):2489-503. (2008)
- Ding YQ, Marklund U, Yuan W, Yin J, Wegman L, Ericson J, Deneris E, Johnson RL, Chen ZF, Lmx1b is essential for the development of serotonergic neurons. *Nat Neurosci.* 6(9):933-8. (2003)
- Downs KM és Davies T, Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* 118(4):1255-66. (1993)

- Ebihara S, Obata K, Yanagawa Y, Mouse vesicular GABA transporter gene: genomic organization, transcriptional regulation and chromosomal localization. *Brain Res Mol Brain Res.* 110(1):126-39. (2003)
- Echevarría D, Vieira C, Gimeno L, Martínez S, Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 43(2):179-91. (2003)
- Elkabetz Y, Panagiotakos G, Al Shamy G, Socci ND, Tabar V, Studer L, Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev.* 22(2):152-65. (2008)
- Ericson J, Muhr J, Placzek M, Lints T, Jessell TM, Edlund T, Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 81(5):747-56. (1995)
- Faigle R, Liu L, Cundiff P, Funa K, Xia Z, Opposing effects of retinoid signaling on astrogliogenesis in embryonic day 13 and 17 cortical progenitor cells. *J Neurochem.* 106(4):1681-98. (2008)
- Feng L, Hatten ME, Heintz N, Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12(4):895-908. (1994)
- Fox N, Damjanov I, Martinez-Hernandez A, Knowles BB, Solter D, Immunohistochemical localization of the early embryonic antigen (SSEA-1) in postimplantation mouse embryos and fetal and adult tissues. *Dev Biol.* 83(2):391-8. (1981)
- Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J, In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci.* 108 (Pt 10):3181-8. (1995)
- Freemantle SJ, Kerley JS, Olsen SL, Gross RH, Spinella MJ, Developmentally-related candidate retinoic acid target genes regulated early during neuronal differentiation of human embryonal carcinoma. *Oncogene* 21(18):2880-9. (2002)
- Fukuchi-Shimogori T, Grove EA, Emx2 patterns the neocortex by regulating FGF positional signaling. *Nat Neurosci.* 6(8):825-31. (2003)
- Fukuda S, Abematsu M, Mori H, Yanagisawa M, Kagawa T, Nakashima K, Yoshimura A, Taga T, Potentiation of astrogliogenesis by STAT3-mediated activation of bone morphogenetic protein-Smad signaling in neural stem cells. *Mol Cell Biol.* 27(13):4931-7. (2007)
- Gadisseux JF, Evrard P., Glial-neuronal relationship in the developing central nervous system. A histochemical-electron microscope study of radial cell particulate glycogen in normal and reeler mice and the human fetus. *Dev Neurosci.* 7(1):12-32. (1985)

- Galli R, Fiocco R, De Filippis L, Muzio L, Gritti A, Mercurio S, Broccoli V, Pellegrini M, Mallamaci A, Vescovi AL, Emx2 regulates the proliferation of stem cells of the adult mammalian central nervous system. *Development* 129(7):1633-44. (2002)
- Gangemi RM, Daga A, Marubbi D, Rosatto N, Capra MC, Corte G, Emx2 in adult neural precursor cells. *Mech Dev.* 109(2):323-9. (2001)
- Gilbert SF, *Developmental Biology*, 8th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 373-405. (2006)
- Gomperts M, Garcia-Castro M, Wylie C, Heasman J, Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development* 120(1):135-41. (1994)
- Goridis C, Rohrer H, Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci.* 3(7):531-41. (2002)
- Gottlieb DI, Large-scale sources of neural stem cells. *Annu Rev Neurosci.* 25:381-407. (2002)
- Götz M, Stoykova A, Gruss P, Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex., *Neuron*, 21(5):1031-44. (1998)
- Götz M és Huttner WB, The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(10):777-88. (2005)
- Gross RE, Mehler MF, Mabie PC, Zang Z, Santschi L, Kessler JA, Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* 17(4):595-606. (1996)
- Gudas LJ, Wagner JA, Retinoids regulate stem cell differentiation. *J Cell Physiol.* 226(2):322-30. (2011)
- Hack MA, Sugimori M, Lundberg C, Nakafuku M, Götz M, Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6. *Mol Cell Neurosci.* 25(4):664-78. (2004)
- Hamasaki T, Leingärtner A, Ringstedt T, O'Leary DD, EMX2 regulates sizes and positioning of the primary sensory and motor areas in neocortex by direct specification of cortical progenitors. *Neuron* 43(3):359-72. (2004)
- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Götz M, Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol.* 229(1):15-30. (2001)
- Hatakeyama J, Bessho Y, Katoh K, Ookawara S, Fujioka M, Guillemot F, Kageyama R, Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* 131(22):5539-50. (2004)
- Hatten ME, Riding the glial monorail: a common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *Trends Neurosci.* 13(5):179-84. (1990)

- Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB, Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9):3196-201. (2004)
- Heins N, Cremisi F, Malatesta P, Gangemi RM, Corte G, Price J, Goudreau G, Gruss P, Götz M., Emx2 promotes symmetric cell divisions and a multipotential fate in precursors from the cerebral cortex. *Mol Cell Neurosci.* 18(5):485-502. (2001)
- Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde YA, Götz M, Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci.* 5(4):308-15. (2002)
- Herberth B, Pataki A, Jelitai M, Schlett K, Deák F, Spät A, Madarász E, Changes of KCl sensitivity of proliferating neural progenitors during in vitro neurogenesis. *J Neurosci Res.* 67(5):574-82. (2002)
- Herrera F, Chen Q, Schubert D, Synergistic effect of retinoic acid and cytokines on the regulation of glial fibrillary acidic protein expression. *J Biol Chem.* 285(50):38915-22. (2010)
- Hirabayashi Y, Suzuki N, Tsuboi M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J, Koseki H, Vidal M, Gotoh Y, Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition. *Neuron* 63(5):600-13. (2009)
- Hirsch MR, Tiveron MC, Guillemot F, Brunet JF, Goridis C, Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. *Development* 125(4):599-608. (1998)
- Hirth F, Therianos S, Loop T, Gehring WJ, Reichert H, Furukubo-Tokunaga K, Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes orthodenticle and empty spiracles in *Drosophila*. *Neuron* 15(4):769-78. (1995)
- Hitoshi S, Seaberg RM, Kosciuk C, Alexson T, Kusunoki S, Kanazawa I, Tsuji S, van der Kooy D, Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes Dev.* 18(15):1806-11. (2004)
- Hughes SM, Lillien LE, Raff MC, Rohrer H, Sendtner M, Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. *Nature* 335(6185):70-3., (1988)
- Huttner WB és Brand M, Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Curr Opin Neurobiol.* 7(1):29-39. (1997)
- Jandial R, Singec I, Ames CP, Snyder EY, Genetic modification of neural stem cells. *Mol Ther.* 16(3):450-7. (2008)
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM, Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418(6893):41-9. (2002)

- Jelitai M, Anderová M, Chvátal A, Madarász E, Electrophysiological characterization of neural stem/progenitor cells during in vitro differentiation: study with an immortalized neuroectodermal cell line. *J Neurosci Res.* 85(8):1606-17. (2007)
- Jelitai M, Anderová M, Markó K, Kékesi K, Koncz P, Syková E, Madarász E, Role of gamma-aminobutyric acid in early neuronal development: studies with an embryonic neuroectodermal stem cell clone. *J Neurosci Res.* 76(6):801-11. (2004)
- Jelitai M és Madarasz E, The role of GABA in the early neuronal development. *Int Rev Neurobiol.* 71:27-62. (2005)
- Jelitai M, Schlett K, Varju P, Eisel U, Madarász E, Regulated appearance of NMDA receptor subunits and channel functions during in vitro neuronal differentiation. *J Neurobiol.* 51(1):54-65. (2002)
- Jeong H, Kim MS, Kim SW, Kim KS, Seol W, Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression by retinoic acid receptor. *J Neurochem.* 98(2):386-94. (2006)
- Jessell TM, Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet.* 1(1):20-9. (2000)
- Johnson AT, Klein ES, Gillett SJ, Wang L, Song TK, Pino ME, Chandraratna RA, Synthesis and characterization of a highly potent and effective antagonist of retinoic acid receptors. *J Med Chem.* 38(24):4764-7. (1995)
- Jones-Villeneuve EM, McBurney MW, Rogers KA, Kalnins VI, Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol.* 94(2):253-62. (1982)
- Kageyama R és Nakanishi S, Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Genet Dev.* 7(5):659-65. (1997)
- Kageyama R, Ohtsuka T, Hatakeyama J, Ohsawa R, Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res.* 306(2):343-8. (2005)
- Kele J, Simplicio N, Ferri AL, Mira H, Guillemot F, Arenas E, Ang SL, Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* 133(3):495-505. (2006)
- Kimura J, Suda Y, Kurokawa D, Hossain ZM, Nakamura M, Takahashi M, Hara A, Aizawa S, Emx2 and Pax6 function in cooperation with Otx2 and Otx1 to develop caudal forebrain primordium that includes future archipallium. *J Neurosci.* 25(21):5097-108. (2005)
- Kohwi M, Osumi N, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A, Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci.* 25(30):6997-7003. (2005)
- Környei Z, Gócza E, Rühl R, Orsolits B, Vörös E, Szabó B, Vágovits B, Madarász E, Astroglia-derived retinoic acid is a key factor in glia-induced neurogenesis. *FASEB J.* 21(10):2496-509. (2007)

- Kriegstein A és Alvarez-Buylla A, The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci.* 32:149-84. (2009)
- Latasa MJ, Cisneros E, Frade JM, Cell cycle control of Notch signaling and the functional regionalization of the neuroepithelium during vertebrate neurogenesis. *Int J Dev Biol.* 53(7):895-908. (2009)
- Leingärtner A, Richards LJ, Dyck RH, Akazawa C, O'Leary DD, Cloning and cortical expression of rat *Emx2* and adenovirus-mediated overexpression to assess its regulation of area-specific targeting of thalamocortical axons. *Cereb Cortex,* 13(6):648-60. (2003)
- Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD, Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 18(6):675-9. (2000)
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD, CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60(4):585-95. (1990)
- Levitt P és Rakic P, Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol.* 193(3):815-40. (1980)
- Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD, Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 70(6):923-35. (1992)
- Lloret-Vilaspa F, Jansen HJ, de Roos K, Chandraratna RA, Zile MH, Stern CD, Durston AJ, Retinoid signalling is required for information transfer from mesoderm to neuroectoderm during gastrulation. *Int J Dev Biol.* 54(4):599-608. (2010)
- Lumsden A, Krumlauf R, Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274(5290):1109-15. (1996)
- Luo T, Wagner E, Grün F, Dräger UC., Retinoic acid signaling in the brain marks formation of optic projections, maturation of the dorsal telencephalon, and function of limbic sites. *J Comp Neurol.* 470(3):297-316. (2004)
- Machon O, Backman M, Krauss S, Kozmik Z, The cellular fate of cortical progenitors is not maintained in neurosphere cultures. *Mol Cell Neurosci.* 30(3):388-97. (2005)
- Madarasz E, Kiss J, Bartok I, Cell production and morphological pattern formation in primary brain cell cultures. I. Pattern formation within the basal layer(s). *Brain Res.* 304(2):339-49. (1984)
- Malatesta P, Hartfuss E, Götz M, Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127(24):5253-63. (2000)
- Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, Götz M, Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37(5):751-64. (2003)

- Mallamaci A, Mercurio S, Muzio L, Cecchi C, Pardini CL, Gruss P, Boncinelli E, The lack of *Emx2* causes impairment of Reelin signaling and defects of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*. 20(3):1109-18. (2000)
- Manuel M és Price DJ, Role of *Pax6* in forebrain regionalization. *Brain Res Bull*. 66(4-6):387-93. (2005)
- Marek KW, Kurtz LM, Spitzer NC, *cJun* integrates calcium activity and *tlx3* expression to regulate neurotransmitter specification. *Nat Neurosci*. 944-50. (2010)
- Martinez-Barbera JP, Beddington RS, Getting your head around *Hex* and *Hesx1*: forebrain formation in mouse. *Int J Dev Biol*. 45(1):327-36. (2001)
- Mastick GS, Andrews GL, *Pax6* regulates the identity of embryonic diencephalic neurons. *Mol Cell Neurosci*. 17(1):190-207. (2001)
- Mattar P, Langevin LM, Markham K, Klenin N, Shivji S, Zinyk D, Schuurmans C, Basic helix-loop-helix transcription factors cooperate to specify a cortical projection neuron identity. *Mol Cell Biol*. 28(5):1456-69. (2008)
- McBurney MW és Rogers BJ, Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev Biol*. 89(2):503-8. (1982)
- McCarthy M, Turnbull DH, Walsh CA, Fishell G, Telencephalic neural progenitors appear to be restricted to regional and glial fates before the onset of neurogenesis. *J Neurosci*. 21(17):6772-81. (2001)
- Merkle FT, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(50):17528-32. (2004)
- Misson JP, Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS Jr, Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Brain Res Dev Brain Res*. 44(1):95-108. (1988)
- Mori T, Buffo A, Götz M, The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol*. 69:67-99. (2005)
- Muzio L, Soria JM, Pannese M, Piccolo S, Mallamaci A, A mutually stimulating loop involving *emx2* and canonical *wnt* signalling specifically promotes expansion of occipital cortex and hippocampus. *Cereb Cortex* 15(12):2021-8. (2005)
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC, Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18):8424-8. (1993)
- Namihira M, Kohyama J, Semi K, Sanosaka T, Deneen B, Taga T, Nakashima K, Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. *Dev Cell* 16(2):245-55. (2009)
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J, Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108(2):193-9. (1991)

- Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR, Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci.* 7(2):136-44. (2004)
- Oh WJ, Noggle SA, Maddox DM, Condie BG, The mouse vesicular inhibitory amino acid transporter gene: expression during embryogenesis, analysis of its core promoter in neural stem cells and a reconsideration of its alternate splicing. *Gene* 351:39-49. (2005)
- O'Leary DD, Sahara S, Genetic regulation of arealization of the neocortex. *Curr Opin Neurobiol.* 18(1):90-100. (2008)
- Park D, Xiang AP, Zhang L, Mao FF, Walton NM, Choi SS, Lahn BT, The radial glia antibody RC2 recognizes a protein encoded by Nestin. *Biochem Biophys Res Commun.* 382(3):588-92. (2009)
- Parras CM, Schuurmans C, Scardigli R, Kim J, Anderson DJ, Guillemot F, Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev.* 16(3):324-38. (2002)
- Pattyn A, Goridis C, Brunet JF, Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene Phox2b. *Mol Cell Neurosci.* 15(3):235-43. (2000)
- Pattyn A, Simplicio N, van Doorninck JH, Goridis C, Guillemot F, Brunet JF., *Ascl1/Mash1* is required for the development of central serotonergic neurons. *Nat Neurosci.* 7(6):589-95. (2004)
- Peinado A, Yuste R, Katz LC, Gap junctional communication and the development of local circuits in neocortex. *Cereb Cortex.* 3(5):488-98 (1993)
- Pellegrini M, Pantano S, Lucchini F, Fumi M, Forabosco A, *Emx2* developmental expression in the primordia of the reproductive and excretory systems. *Anat Embryol (Berl).* 196(6):427-33. (1997)
- Pinto L és Götz M, Radial glial heterogeneity- the source of diverse progeny in the CNS. *Prog Neurobiol.* 83(1):2-23. (2007)
- Pixley SK és de Vellis J, Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res.* 317(2):201-9. (1984)
- Pollard SM, Conti L, Sun Y, Goffredo D, Smith A, Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain. *Cereb Cortex.* 16 Suppl 1:i112-20. (2006)
- Pollard SM, Conti L, Investigating radial glia in vitro. *Prog Neurobiol.* 83(1):53-67. (2007)
- Puelles L, Rubenstein JL, Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* Sep;26(9):469-76. (2003)
- Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, Temple S, Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28(1):69-80. (2000)

- Qiu M, Shimamura K, Sussel L, Chen S, Rubenstein JL, Control of anteroposterior and dorsoventral domains of Nkx-6.1 gene expression relative to other Nkx genes during vertebrate CNS development. *Mech Dev.* 72(1-2):77-88. (1998)
- Rakic P, Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res.* 33(2):471-6. (1971)
- Rajan P és McKay RD, Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci.* 18(10):3620-9. (1998)
- Rasin MR, Gazula VR, Breunig JJ, Kwan KY, Johnson MB, Liu-Chen S, Li HS, Jan LY, Jan YN, Rakic P, Sestan N, Numb and Numbl are required for maintenance of cadherin-based adhesion and polarity of neural progenitors. *Nat Neurosci.* 10(7):819-27. (2007)
- Ravanpay AC, Hansen SJ, Olson JM, Transcriptional inhibition of REST by NeuroD2 during neuronal differentiation. *Mol Cell Neurosci.* 44(2):178-89. (2010)
- Reynolds BA, Weiss S, Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255(5052):1707-10. (1992)
- Root CM, Velázquez-Ulloa NA, Monsalve GC, Minakova E, Spitzer NC, Embryonically expressed GABA and glutamate drive electrical activity regulating neurotransmitter specification. *J Neurosci.* 28(18):4777-84. (2008)
- Ross SE, Greenberg ME, Stiles CD, Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron.* 39(1):13-25. (2003)
- Rossant J, Zirngibl R, Cado D, Shago M, Giguère V, Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 5(8):1333-44. (1991)
- Rowitch DH, Kriegstein AR, Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468(7321):214-22. (2010)
- Sauer FC, Mitosis in the neural tube. *The Journal of Comparative Neurology* 62: 377–405. (1935)
- Schlett K, Czirók A, Tárnok K, Vicsek T, Madarász E, Dynamics of cell aggregation during in vitro neurogenesis by immortalized neuroectodermal progenitors. *J Neurosci Res.* 60(2):184-94. (2000)
- Schlett K, Herberth B, Madarász E, In vitro pattern formation during neurogenesis in neuroectodermal progenitor cells immortalized by p53-deficiency. *Int J Dev Neurosci.* 15(6):795-804. (1997)
- Schlett K, Madarász E, Retinoic acid induced neural differentiation in a neuroectodermal cell line immortalized by p53 deficiency. *J Neurosci Res.* 47(4):405-15. (1997)

Schuurmans C, Armant O, Nieto M, Stenman JM, Britz O, Klenin N, Brown C, Langevin LM, Seibt J, Tang H, Cunningham JM, Dyck R, Walsh C, Campbell K, Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 23(14):2892-902. (2004)

Schuurmans C, Guillemot F, Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr Opin Neurobiol.* 12(1):26-34. (2002)

Shibata T, Yamada K, Watanabe M, Ikenaka K, Wada K, Tanaka K, Inoue Y., Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J Neurosci.* 17(23):9212-9. (1997)

Shinozaki K, Miyagi T, Yoshida M, Miyata T, Ogawa M, Aizawa S, Suda Y, Absence of Cajal-Retzius cells and subplate neurons associated with defects of tangential cell migration from ganglionic eminence in *Emx1/2* double mutant cerebral cortex. *Development* 129(14):3479-92. (2002)

Shinozaki K, Yoshida M, Nakamura M, Aizawa S, Suda Y, *Emx1* and *Emx2* cooperate in initial phase of archipallium development. *Mech Dev.* 121(5):475-89. (2004)

Siegenthaler JA, Ashique AM, Zarbalis K, Patterson KP, Hecht JH, Kane MA, Folias AE, Choe Y, May SR, Kume T, Napoli JL, Peterson AS, Pleasure SJ, Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation. *Cell* 139(3):597-609. (2009)

Sillitoe RV, Joyner AL, Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23:549-77. (2007)

Simeone A, Acampora D, Arcioni L, Andrews PW, Boncinelli E, Mavilio F, Sequential activation of *HOX2* homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature* 346(6286):763-6. (1990)

Simeone A, Gulisano M, Acampora D, Stornaiuolo A, Rambaldi M, Boncinelli E., Two vertebrate homeobox genes related to the *Drosophila* empty spiracles gene are expressed in the embryonic cerebral cortex. *EMBO J.* 11(7):2541-50. (1992)

Smidt MP, van Schaick HS, Lanctôt C, Tremblay JJ, Cox JJ, van der Kleij AA, Wolterink G, Drouin J, Burbach JP, A homeodomain gene *Ptx3* has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24):13305-10. (1997)

Smidt MP, Asbreuk CH, Cox JJ, Chen H, Johnson RL, Burbach JP, A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires *Lmx1b*. *Nat Neurosci.* 3(4):337-41. (2000)

Soghomonian JJ, Martin DL, Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci.* 19(12):500-5. (1998)

Solter Dés Knowles BB, Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(11):5565-9. (1978)

- Sonneveld E, van den Brink CE, van der Leede BJ, Maden M, van der Saag PT, Embryonal carcinoma cell lines stably transfected with mRARbeta2-lacZ: sensitive system for measuring levels of active retinoids. *Exp Cell Res.* 250(2):284-97. (1999)
- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci.* 25(1):10-8. (2005)
- Stein S, Fritsch R, Lemaire L, Kessel M, Checklist: vertebrate homeobox genes. *Mech Dev.* 55(1):91-108. (1996)
- Suda Y, Kokura K, Kimura J, Kajikawa E, Inoue F, Aizawa S., The same enhancer regulates the earliest Emx2 expression in caudal forebrain primordium, subsequent expression in dorsal telencephalon and later expression in the cortical ventricular zone. *Development* 137(17):2939-49. (2010)
- Suda Y, Hossain ZM, Kobayashi C, Hatano O, Yoshida M, Matsuo I, Aizawa S, Emx2 directs the development of diencephalon in cooperation with Otx2. *Development* 128(13):2433-50. (2001)
- Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, Hensch TK, Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell* 134(3):508-20. (2008)
- Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S, Lin MZ, Zubiaga A, Hua X, Fan G, Greenberg ME, Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104(3):365-76. (2001)
- Sun Y, Pollard S, Conti L, Toselli M, Biella G, Parkin G, Willatt L, Falk A, Cattaneo E, Smith A, Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture. *Mol Cell Neurosci.* 38(2):245-58. (2008)
- Suter DM, Tirefort D, Julien S, Krause KH, A Sox1 to Pax6 switch drives neuroectoderm to radial glia progression during differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 27(1):49-58. (2009)
- Taverna E, Huttner WB, Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron* 67(6):906-14. (2010)
- Tárnok K, Pataki A, Kovács J, Schlett K, Madarász E, Stage-dependent effects of cell-to-cell connections on in vitro induced neurogenesis. *Eur J Cell Biol.* 81(7):403-12. (2002)
- Theil T, Alvarez-Bolado G, Walter A, Rütger U, Gli3 is required for Emx gene expression during dorsal telencephalon development. *Development* 126(16):3561-71. (1999)
- Theil T, Aydin S, Koch S, Grotewold L, Rütger U, Wnt and Bmp signalling cooperatively regulate graded Emx2 expression in the dorsal telencephalon. *Development* 129(13):3045-54. (2002)

- Tropepe V, Sibilina M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D, Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol.* 208(1):166-88. (1999)
- Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, van der Kooy D, Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* 30(1):65-78. (2001)
- Vieira C, Pombero A, García-Lopez R, Gimeno L, Echevarria D, Martínez S, Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int J Dev Biol.* 54(1):7-20. (2010)
- Vitalis T, Cases O, Engelkamp D, Verney C, Price DJ, Defect of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the brains of mice lacking the transcription factor Pax6. *J Neurosci.* 20(17):6501-16. (2000)
- Viti J, Feathers A, Phillips J, Lillien L, Epidermal growth factor receptors control competence to interpret leukemia inhibitory factor as an astrocyte inducer in developing cortex. *J Neurosci.* 23(8):3385-93. (2003)
- Walther C, Gruss P, Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113(4):1435-49. (1991)
- Watakabe A, Comparative molecular neuroanatomy of mammalian neocortex: what can gene expression tell us about areas and layers? *Dev Growth Differ.* 51(3):343-54. (2009)
- Wiesel TN, Hubel DH, Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J Neurophysiol.* 26:1003-17 (1963)
- Wilkinson DG, Bhatt S, Cook M, Boncinelli E, Krumlauf R, Segmental expression of Hox-2 homoeobox-containing genes in the developing mouse hindbrain. *Nature* 341(6241):405-9. (1989)
- Williams RR, Azuara V, Perry P, Sauer S, Dvorkina M, Jørgensen H, Roix J, McQueen P, Misteli T, Merkenschlager M, Fisher AG, Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the Mash1 locus. *J Cell Sci.* 119(Pt 1):132-40. (2006)
- Wilson SW, Rubenstein JL, Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon. *Neuron* 28(3):641-51. (2000)
- Wullimann MF, Rink E, Detailed immunohistology of Pax6 protein and tyrosine hydroxylase in the early zebrafish brain suggests role of Pax6 gene in development of dopaminergic diencephalic neurons. *Brain Res Dev Brain Res.* 131(1-2):173-91. (2001)
- Wurst W, Bally-Cuif L, Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer. *Nat Rev Neurosci.* 2(2):99-108. (2001)
- Yan J, Studer L, McKay RD, Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J Neurochem.* 76(1):307-11. (2001)

Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A, Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol.* 21(2):183-6. (2003)

Yoon KJ, Koo BK, Im SK, Jeong HW, Ghim J, Kwon MC, Moon JS, Miyata T, Kong YY, Mind bomb 1-expressing intermediate progenitors generate notch signaling to maintain radial glial cells. *Neuron* 58(4):519-31. (2008)

Yoshida M, Suda Y, Matsuo I, Miyamoto N, Takeda N, Kuratani S, Aizawa S, *Emx1* and *Emx2* functions in development of dorsal telencephalon. *Development* 124(1):101-11. (1997)

Yung SY, Gokhan S, Jurcsak J, Molero AE, Abrajano JJ, Mehler MF, Differential modulation of BMP signaling promotes the elaboration of cerebral cortical GABAergic neurons or oligodendrocytes from a common sonic hedgehog-responsive ventral forebrain progenitor species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(25):16273-8. (2002)

Zhang Y, Miki T, Iwanaga T, Koseki Y, Okuno M, Sunaga Y, Ozaki N, Yano H, Koseki H, Seino S, Identification, tissue expression, and functional characterization of *Otx3*, a novel member of the *Otx* family. *J Biol Chem.* 277(31):28065-9. (2002)

11. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

A Doktori disszertáció alapját képező publikációk:

Háding N, Varga BV, Berzsenyi S, Környei Z, Madarász E, Herberth B, Astroglia genesis in vitro: distinct effects of retinoic acid in different phases of neural stem cell differentiation. *Int J Dev Neurosci.* 27(4):365-75. Epub 2009 Mar 6. (2009)

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

Egyéb publikációk:

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

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

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

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

Ágoston Viktor
Czöndör Katalin
Jády Attila
Kenesei Kata
Mészáros Zsófia
Németh Valéria

Orsolits Barbara
Schlett Katalin
Szelényi Judit
Székács Inna
Tárnok Krisztián
Vágovits Balázs

Vizi Csenge
Vörös Erzsébet
Vőfély Gergő
Zádori Anita

Köszönöm Ferenczi Szilamérnek, hogy elvállalta Doktori disszertációm intézeti bírálatát. Köszönöm értékes megjegyzéseit.

Köszönöm az MTA-KOKI vezetőségének és munkatársainak hogy munkámat színvonalas tudományos közegben végezhettem.

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