

Beszámoló az OTKA 61877. számú, *Az N-cadherin szerepe az emlősök idegrendszerének korai fejlődésében és a hippocampus GABAerg neuronjainak differenciációjában* című pályázat eredményeiről.

Dr. Freund Tamás
igazgató
MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Dr. Lele Zsolt
témavezető
MTA KOKI

A pályázat munkaterve

1. év

N-cadherin megklónoozása, a domináns negatív mutáns N-cadherin előállítás és ezek továbbklónoozása a már elkészült pBI-eGFP vektorba. (Teljesítve)

Az rtTA-IRES-rtTs konstrukció klónoozása a GAD65 és a CamkII α promoterek mögé. (Részben teljesítve indoklás lásd az eredmények részletes ismertetésében)

A már kész konstrukciók tisztítása és az injektálás megkezdése. (Teljesítve)

Az expressziós analízisek megkezdése, in situ és immuncitokémiai festések. (Teljesítve)

2. év

A klónozás befejezése. (Teljesítve)

Az expressziós vizsgálatok (in situ hibridizáció) kiterjesztése a II-es típusú klasszikus cadherineknél neurális expressziójára. Ehhez Cdh6, Cdh8 és Cdh11 klónok elkérése Masatoshi Takeichi-től valamint Cdh7, Cdh9, Cdh10, Cdh12, Cdh14, Cdh19, Cdh20, Cdh22, Cdh24 cDNS fragmentek megklónoozása (Teljesítve).

Az injektálás befejezése. (Teljesítve)

A már tesztelhető vonalak keresztezése és azonosítása RT-PCR-rel, Southern-blot-tal, Northern-blottal és immunhisztokémiai módszerekkel. (Teljesítve)

Az analízisek megkezdése. (Teljesítve)

3. év

In situ hibridizációs vizsgálatok a II-es típusú cadherineknél (folyamatban).

A Tet-indukálható kettős transzgenikus rendszerben felmerült expressziós problémák miatt a funkcionális vizsgálatok terve módosult az eredetihez képest: Azok részletes analízise helyett új megközelítések kidolgozása lett a cél.

Ezek a következők:

Dlx5/6-Ncad és Dlx5/6-DnNcad vektorok elkészítése. (Teljesítve)

Ezen konstrukciók mikroinjektálásával transzgenikus egértörzsek előállítása, azonosítása és a GABAerg sejtek migrációjának és differenciációjának tanulmányozása. (Részben teljesítve)

Különböző GABAerg sejt típusokra specifikus markergének klónoozása in situ hibridizációhoz (parvalbumin, somatostatin, calretinin, VIP, NPY). (Teljesítve)

In utero elektroporáció meghonosítása a laborban és kísérleti körülményeinek optimalizálása. (Teljesítve)

In utero elektroporációs kísérletek a CMV-eGFP, Dlx5/6-Ncad és Dlx5/6-DnNcad vektorokkal. (Részben teljesítve)

Kondicionális N-cadherin -/- (flNcad) és Dlx5/6-Cre egérvonalak beszerzése. (Teljesítve)

NcadcKO vonal GadGFP vonallal történő keresztezése (flNcad-GadGFP). (Teljesítve)

flNcad-GadGFP vonal keresztezése a Dlx5/6-Cre vonallal (DNG=Dlx5/6Cre-NcadcKO-Gad65/eGFP) (Részben teljesítve)

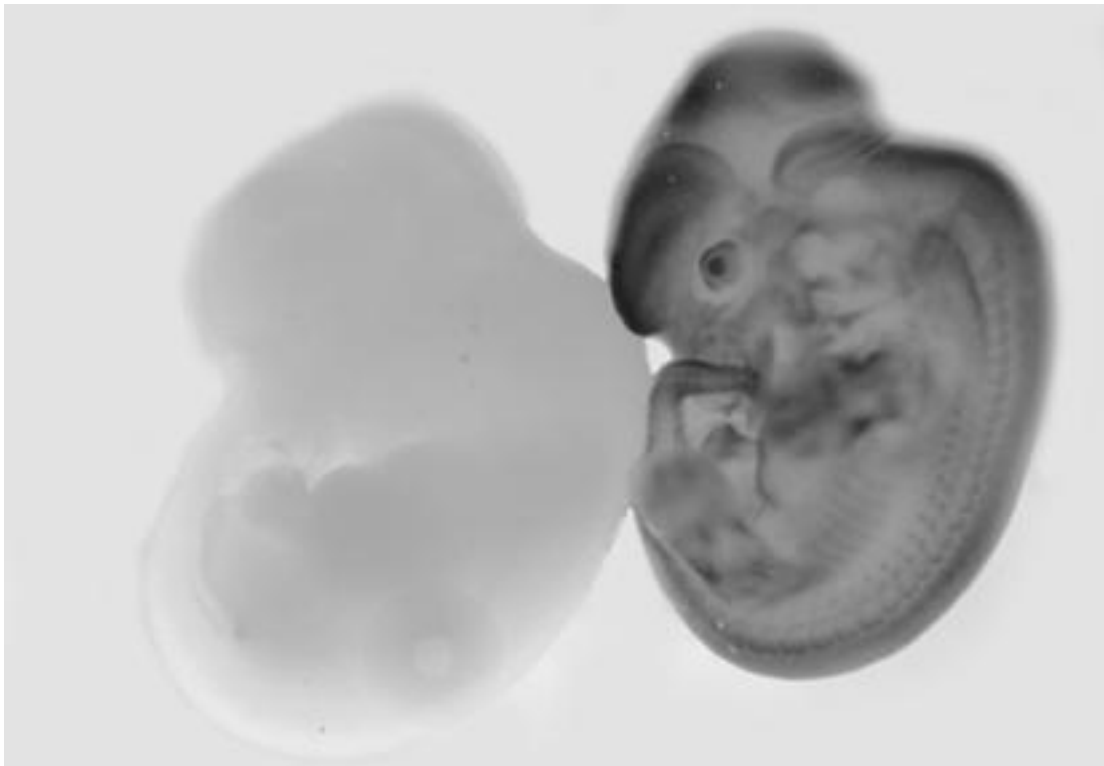
GABAerg sejtek migrációjának tanulmányozása a GFP nyomkövetésével és Gad67 immunhisztokémiai festéssel. (vizsgálatok elkezdése heteken belül várható)

Eredmények részletes ismertetése

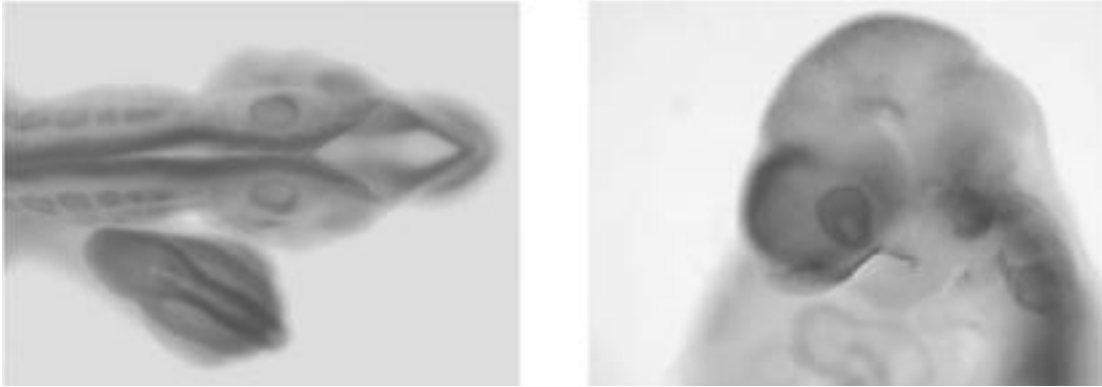
1. Expressziós vizsgálatok

1.1. *N-cadherin* expresszió a az egér központi idegrendszerében

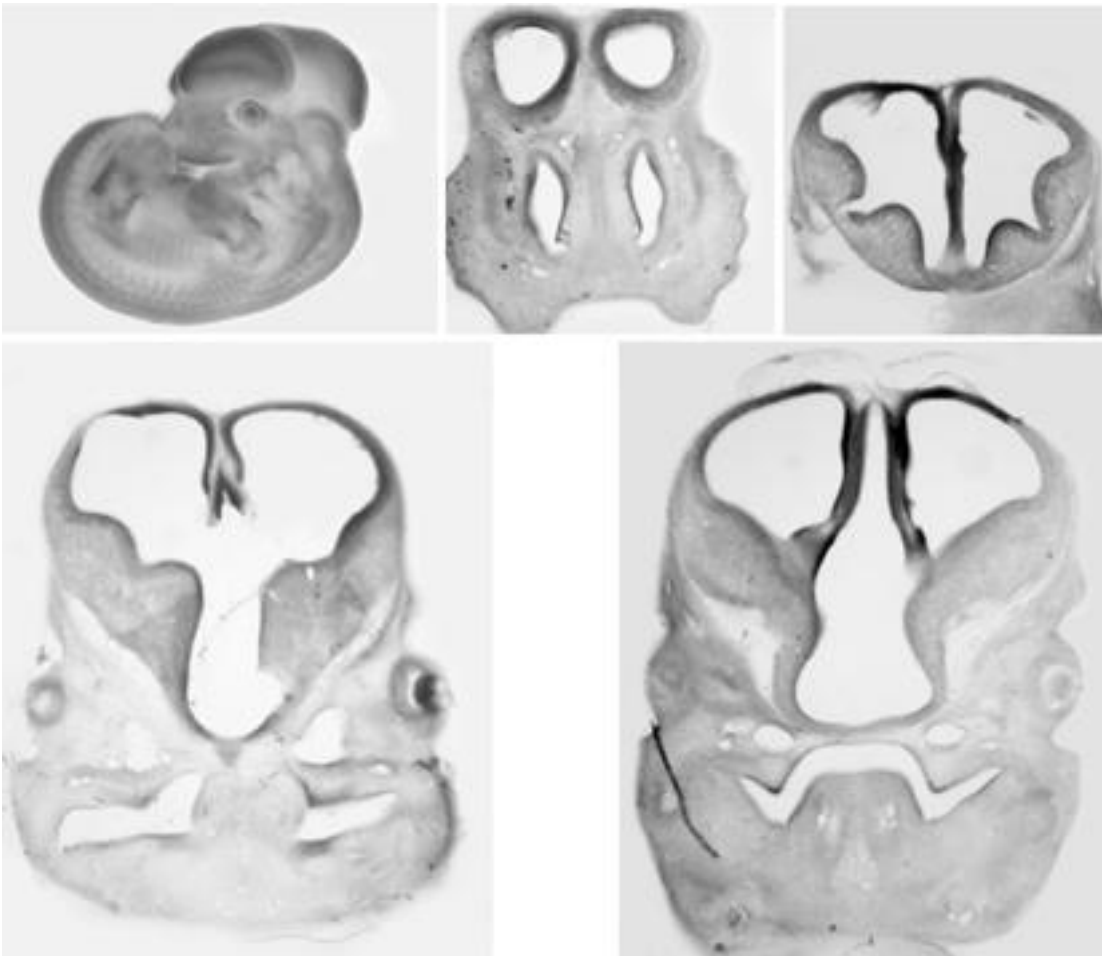
Az expressziós vizsgálatok lezárultak. mRNS és fehérjeszinten leírtuk az *N-cadherin* expresszióját az egér központi idegrendszerének fejlődése során (1-4. ábrák). Ezek a vizsgálatok bebizonyították, hogy a gangliondombok ventrikuláris zónáiból kilépő neuron progenitorokban lecsökken az *N-cadherin* expresszió (3. és 4. ábra). A GABA termelésért felelős *Gad1* génnel való kettős *in situ* hibridizációk kimutatták az *N-cadherin* és a *Gad1* nagymértékben nem átfedő expresszióját a felnőtt egér idegrendszerének különböző területein (8. ábra, kivételt képeznek ez alól a kisagyi Purkinje-sejtek, ahol átfedő az expresszió). Ez az expressziós szegregáció már E12.5 korú egér embriók agyában kimutatható (9. ábra), ami arra utal, hogy az *N-cadherin* szintnek a gangliondombok szubventrikuláris zónájában való csökkenésének szerepe lehet a GABAerg neuron progenitorok tangencionális migrációjának az elindításában.



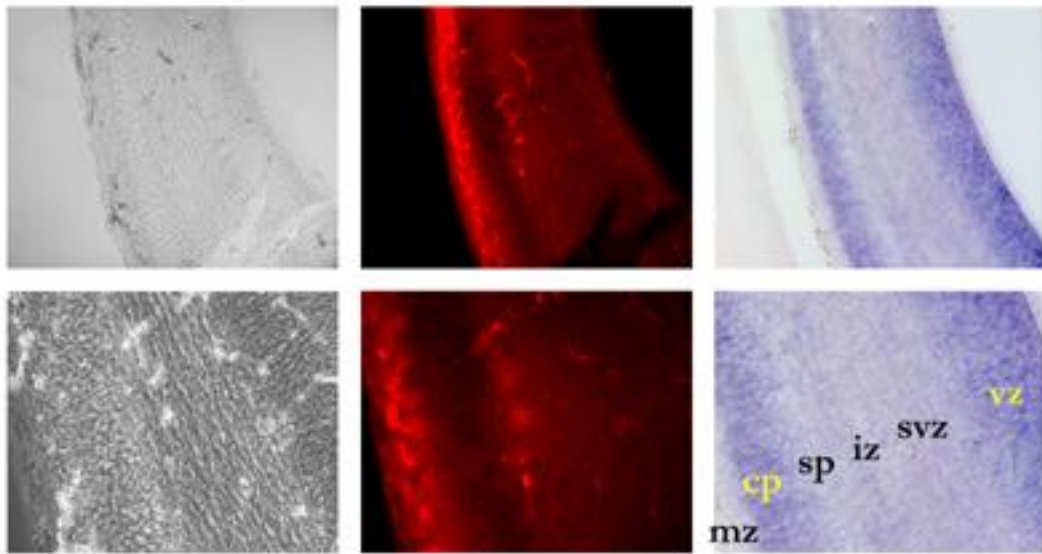
1.ábra *In situ* hibridizáció sense és antisense *Ncad* próbával E12.5 egér embriókban



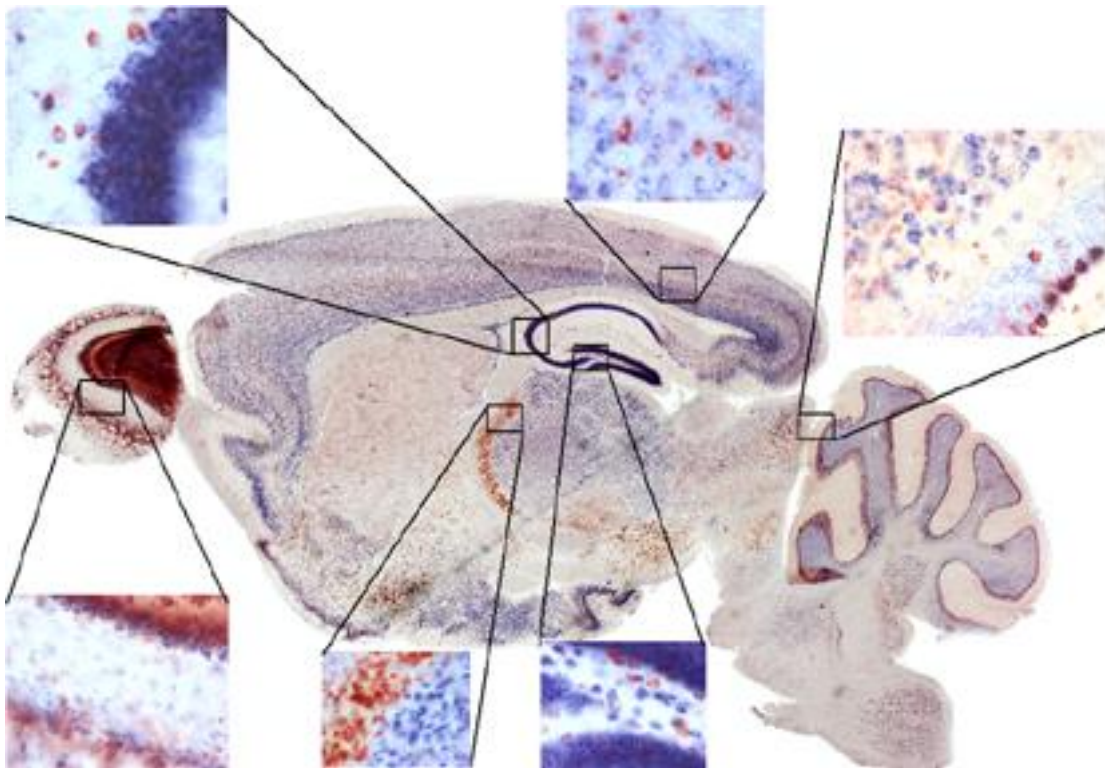
2. ábra N-cadherin mRNS expresszió E10 egér embriókban. (dorzális és laterális nézet)



3. ábra N-cadherin expresszió E12.5 egéragyban.



4. ábra N-cadherin expresszió mRNS és fehérjeszinten E15.5 egér neocortexben.



5. ábra *N-cadherin* és *Gad1* átfedő és nem átfedő expressziója a felnőtt egéragyban.



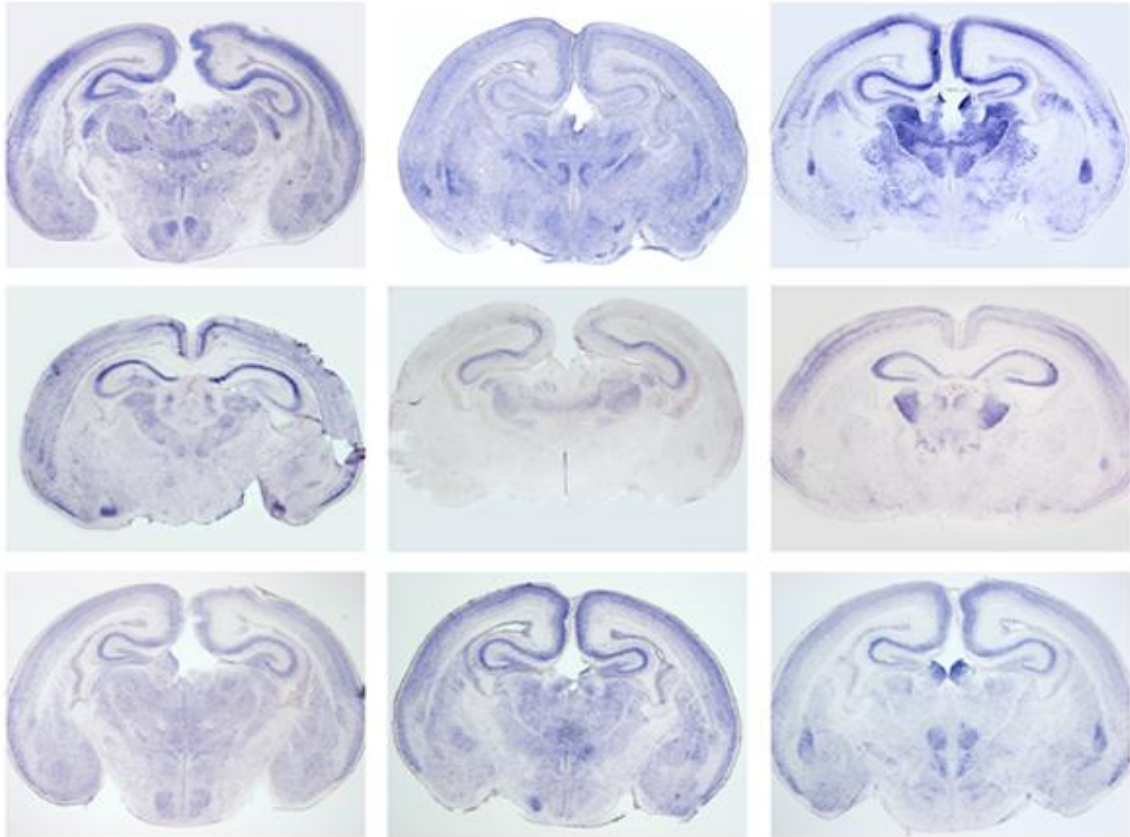
6.ábra *N-cadherin és Gad1 egymást kiegészítő expressziója az E12.5 egér agyának gangliondombjában.*

1.2. A II-es típusú klasszikus cadherineinek expressziója a neocortexben és a hippocampusban

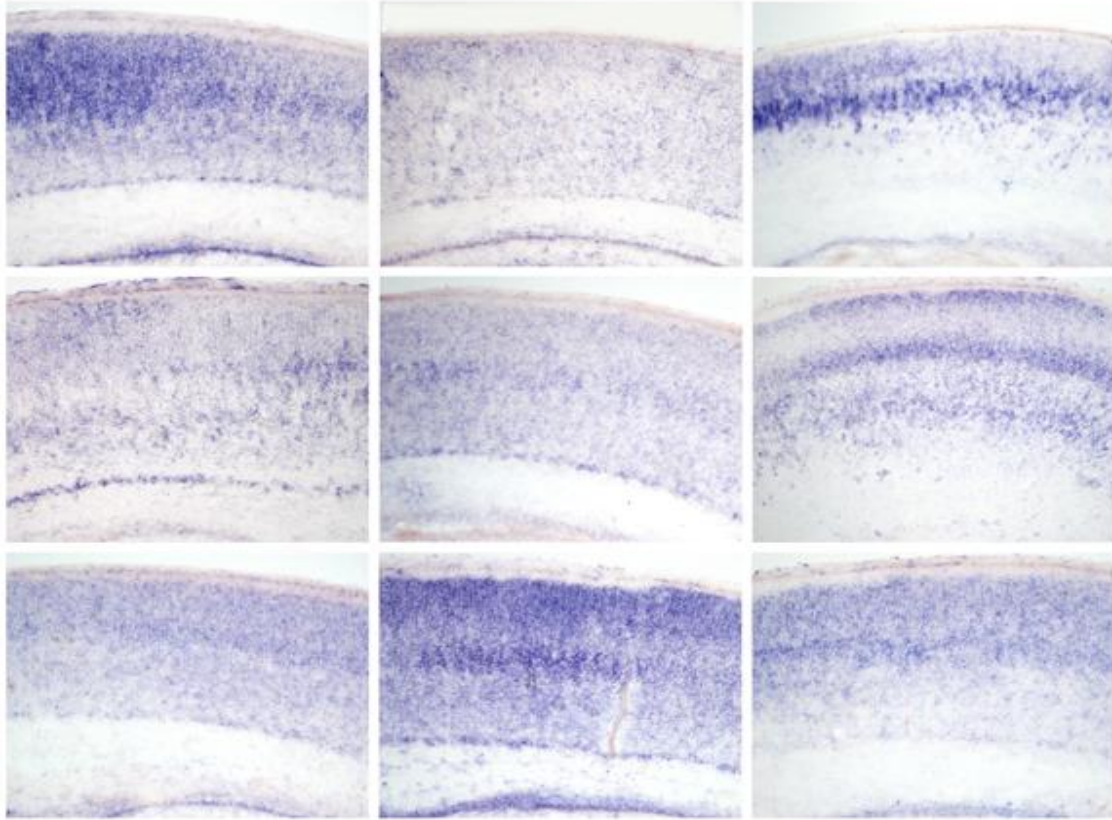
7. ábra *Kettes típusú cadherin expressziójának változása a központi idegrendszer fejlődése során.*

Az N-cadherin sejtspecifikus expressziós mintázata azt sugallta, hogy más cadherinekek esetleg átfedő vagy azt kiegészítő funkcióval rendelkeznek az egye kortikális területeken. Ezért az expressziós vizsgálatokat kiterjesztettük a II-es típusú klasszikus cadherinekre is, amik szintén β -cateninkötő, de HAV domain-nel nem rendelkező cadherinekek, és amik az egyik legesélyesebb jelöltek erre a funkcióra.

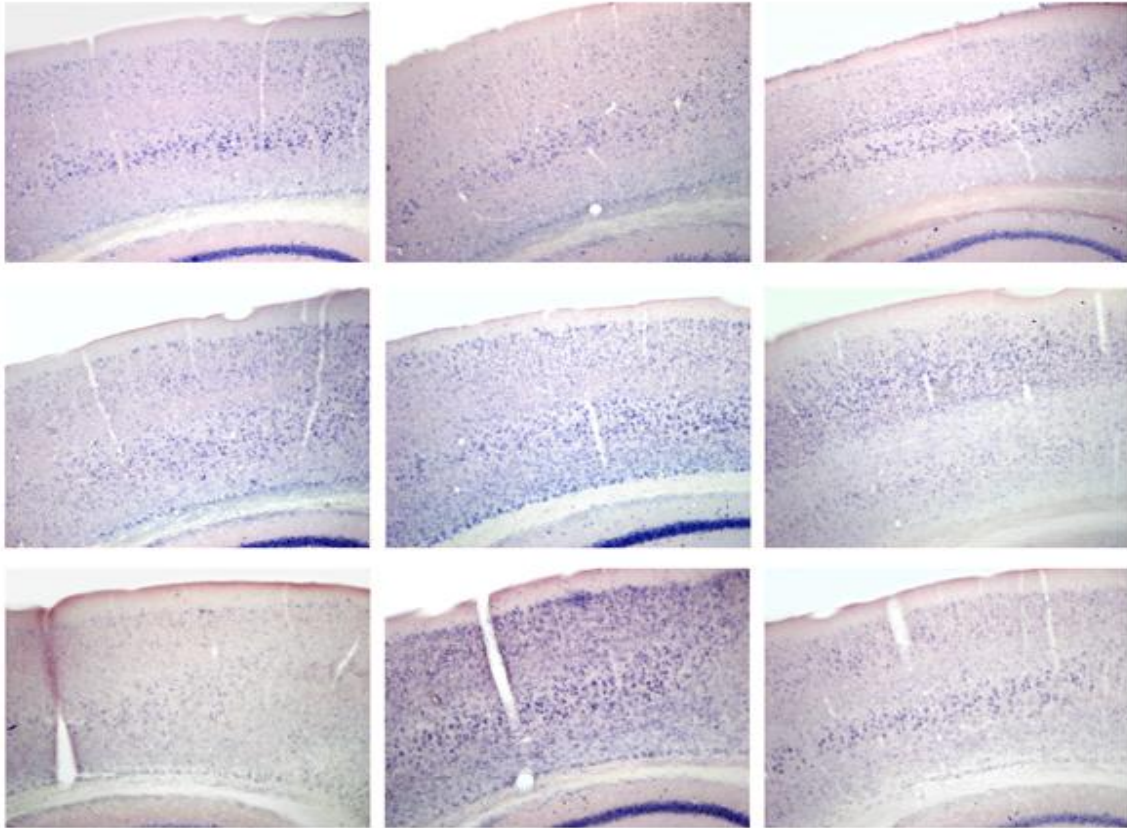
Ezért a bizonyítottan idegrendszeri expressziót nem mutató Cdh5 (VE-cadherin) kivételével megklónoztuk a Cdh7,9,10,12,14,19,20,22,24 N-terminális fragmentjét és ezekkel in situ hibridizációt végeztünk illetve jelenleg is végzünk (8-10.ábra). A Cdh6,8 és 11-et tartalmazó plazmidot Masatoshi Takeichitől sikerült megszereznünk. Ezen kívül az expressziós mintázat időbeli változását a központi idegrendszer fejlődése során RT-PCR-rel követtük nyomon (7.ábra). Az kísérletek befejezése és a cikk megírása öszre várható.



8.ábra *cadherin* expresszió a P0 egéragyban. Balról jobbra, felülrő lefelé:
Cdh 6,7,8,10,11,12,14,20,22.



9.ábra cadherin expresszió az újszülött egér primer szomatoszenzoros kortexében.
Balról jobbra, felülről lefelé: Cdh 6,7,8,10,11,12,14,20,22.



10.ábra cadherin expresszió a felnőtt egér primer szomatoszenzoros kortexben.
Balról jobbra, felülről lefelé: Cdh 6,7,8,10,11,12,14,20,22.

2. A klónozási munkák

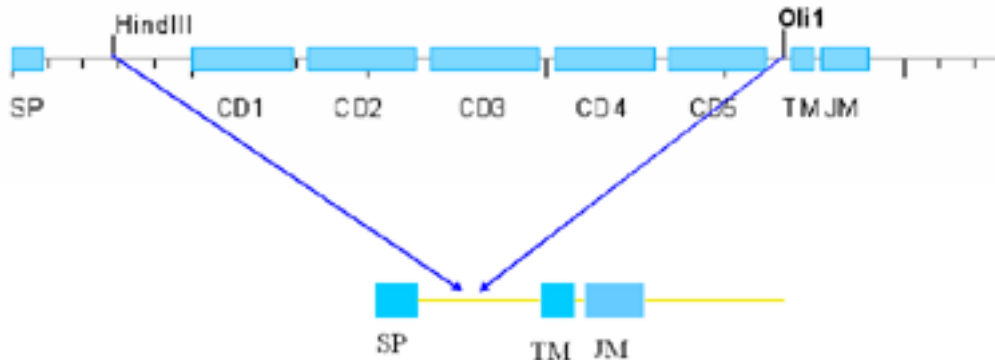
2.1. Az N-cadherin megklónozása illetve a domináns N-cadherin előállítása

Az egér N-cadherin génjét génspecifikus primerekkel végrehajtott RT-PCR segítségével felamplifikáltuk és a kapott terméket a PGEMT-easy nevű vektorba (Promega) klónoztuk. A PCR esetleges hibáit kiszűrendő a kapott plazmidban levő N-cadherin gént végig szekvenáltattuk belső génspecifikus primerek segítségével. A domináns N-cadherint az extracelluláris domain-ek Oli I - Hind III emésztésével való eltávolításával, majd a Hind III véget feltöltésével és a konstrukció vizsgálásával állítottuk elő (Lsd. 11. ábra).

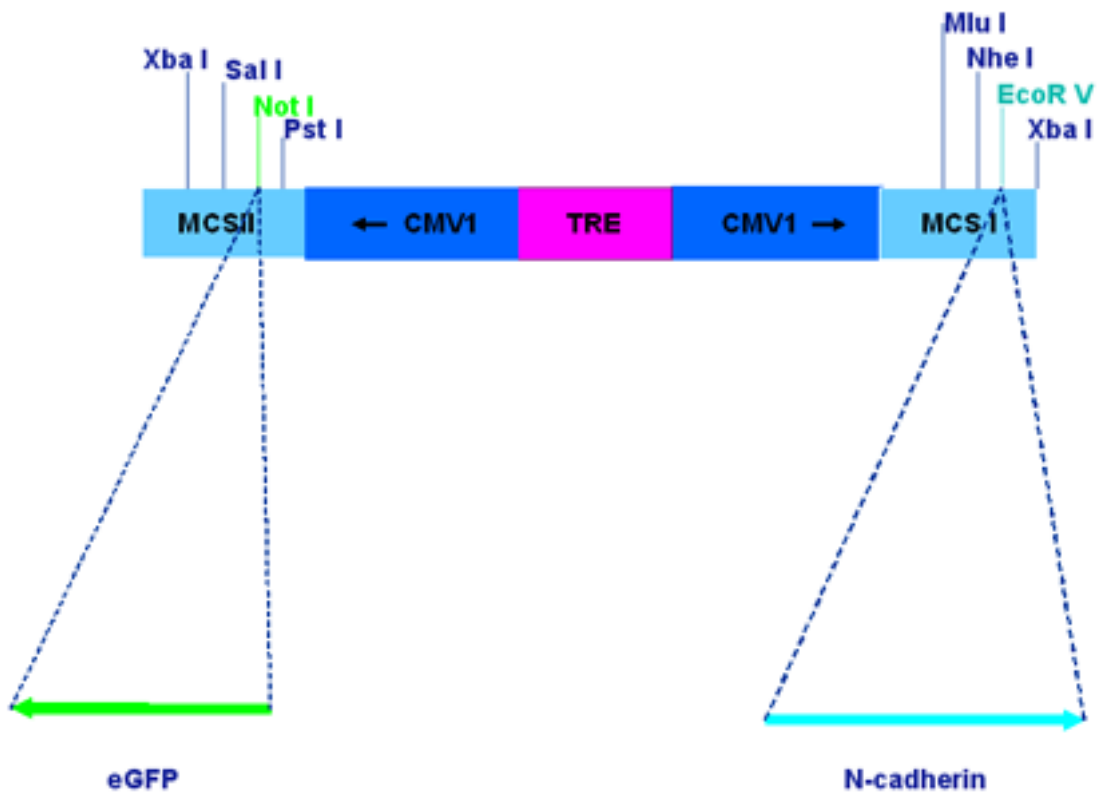
2.2. Az N-cad és Δ NNcad beklónozása a pBI-eGFP vektorba.

Az így elkészült Ncad-pGEMT és Δ NNcad-pGEMT plazmidokból EcoR I-es emésztéssel vittük tovább az N-cadherint a pBI-eGFP expressziós vektorba. (12. ábra). Ebbe a bicisztronikus vektorba az ellenkező oldalra már korábban beklónoztuk az eGFP-t, ami az

expresszió nyomonkövetését, illetve az ektopikus és az endogén N-cadherin expresszió elkülönítését teszi lehetővé.



11. ábra Domináns negatív N-cadherin előállítása

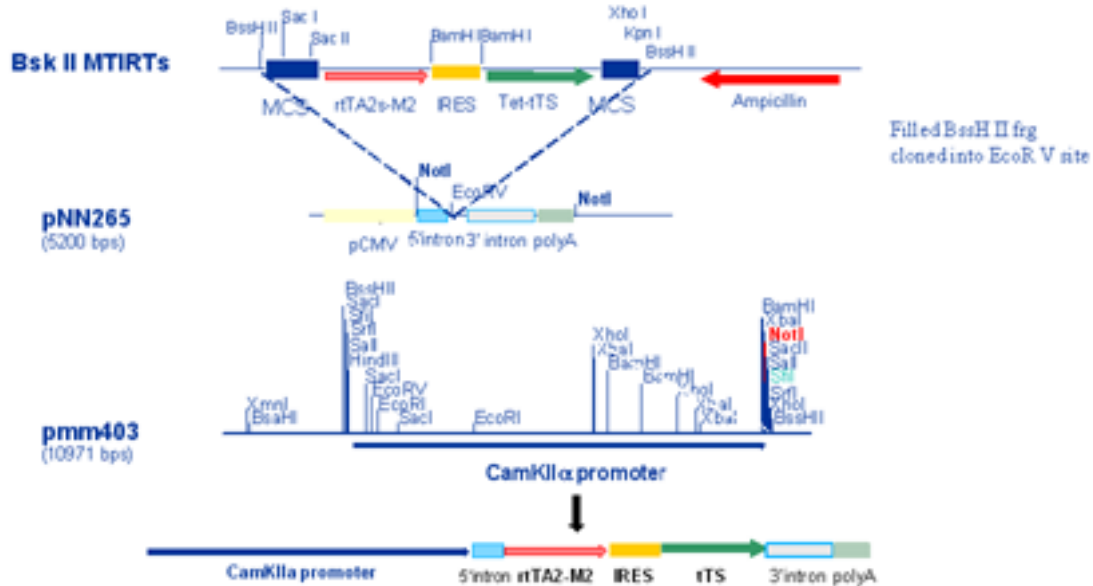


12. ábra Az N-cadherin illetve Δn N-cadherin tartalmazó expressziós vektorok előállítása

2.3. A CamkIIa-MTIRTs driver konstrukció előállítása (lsd. 13. ábra)

A tetraciklin-indukálhatóságért felelős driver vonalak elkészítéséhez már korábban elkészítettük az rtTa-IRES-tTs (MTIRTs) konstrukciót a pBskII vektorban. Ezt először egy pNN265 segédvektorba átklónoztuk Paul (BssH II) emésztéssel feltöltéssel és blunt

end ligálással az EcoR V helyre, ami a megfelelő szintű expresszióhoz és mRNS stabilitáshoz szükséges introndarabokat és polyA szekvencát tartalmazta. Innen ezekkel a pluszfragmentekkel együtt lett visszaklónozva a pBskII-be Not I restrikciós hasítással és ligálással. A glutamáterg transzkripcióhoz szükséges CamkII α promotert a pmm403 vektorból klónoztuk ide HindIII-as emésztéssel (CamkII α -MTIRTs). A klónozás minden lépése többszörös restrikciós térképezéssel lett ellenőrizve.



13. ábra A CamkII α -MIT driver vektor klónozási sémája

3. Transzgénikus egértörzsek előállítása mikroinjektálással, azonosítása és vizsgálata, az expressziós probléma lokalizálása

A pBI-eGFP-Ncad és a pBI-eGFP- Δ nNcad konstrukciók injektálása megtörtént. A lehetséges pozitív állatok genotipizálás alsó körben genomiális DNS-ből PCR-rel történt, majd a feltételezett pozitív egyedek Southern-blot analízissel másodszor is ellenőrizve lettek. A pozitív egerek közül konstrukciónként 3-3 alapító egyedből jelenleg történt a transzgénikus vonalak megalapítása (F2-ben homozigóták előállítása és élet- és szaporodás-képességének ellenőrzése). A CamkII α -MIT vektorral hasonlóképpen zajlott az injektálás. A doxycyclinnel történő kezelése során azonban nem sikerült értékelhető GFP ill Ncad expressziót tapasztalni. A Tet-indukálható kettős transzgénikus modellrendszerünkben a transzgén vonalak keresztezése és a doxycyclinnel történő indukálás (irodalmi adatok szerint, különböző koncentrációk kipróbálva 0.5 mg/ml-től 20 mg/ml-ig, fénytől elzárva, ivóvízben adagolva) ellenére sem tapasztaltunk GFP expressziót. Mivel a munkánk megkezdése óta az informális konferenciabeszélgetésekben többen jeleztek hasonló problémát, (ami persze az irodalomban nem került leközlésre), mi is elvégeztük a kontroll vizsgálatokat extra költségen importált biztosan működő driver vonallal (nes-rTta-IRES-GFP, G.Kernie,

University of Texas, Southwestern Medical Center). Ezek a vizsgálatok egyértelműsítették, hogy a hiba forrása az általunk előállított pBI-eGFP-Ncad vonallal van, aminek mibenlétét homály fedte, mert a szekvenálási adatok szerint tökéletes volt a konstrukció. Ráadásul a vektor előállítása során nem is használtunk PCR-t, aminek esetleges hibás működése leolvasási hibát okozó mutációt eredményezhetne. Ekkor jelent meg egy cikk, ami ennek a problémának a vizsgálatát tűzte ki célul, és amiben részletes kísérletekkel bizonyítják, hogy a pBI alapú kettős expressziós vektorok igen hajlamosak a heterokromatikus kromoszómarégiókba történő beépülésre (ennek a hogyanjára, illetve miértjére máig sincs válasz), ami megakadályozza az így generált vonalak nagy részében a beklónozott gének átírását (disznókban lsd. Kues et.al 2006 FASEB Journal, 20: 357-362; egerben lsd. Zhu et al.,2007, Plos One 2(6):e533). Mivel ezeket a vizsgálatokat, se időnk se pénzünk nem volt a saját vonalainkkal megismételni, ezért az általunk felvetett kérdések vizsgálatára alternatív megközelítési lehetőségeket kezdtünk el. Ezek a kísérletek jól haladnak, és remélhetőleg, más források bevonásával a következő egy évben meghozhatják a Tet-indukálható transzgénikus egérmódellettől remélt eredményeket.

4. Alternatív megközelítési módszerek A GABAerg sejtek fejlődésének tanulmányozására.

4.1. Szomatikus géntranszfer, in utero elektroporáció

Mivel a szóba jöhető megoldásnak gyorsnak és költséghatékonyak kellett lennie (se idő se pénz nem pBI alapú új transzgénikus vonalak generálására ezért fordultunk a tranziens génexpresszió lehetősége felé. Az in utero elektroporáció során az E12.5-15.5 közötti korú egérembriók agykamrájába injektáltunk cirkuláris plazmid DNS-t, majd az alkalmazott ismételt rövid időtartamú egyenáramú kiefeszültség (50V) hatására a DNS belép a ventrikuláris zóna osztódó sejtjeibe és itt fejti ki hatását. Az elmúlt fél év során CMV-eGFP plazmiddal (Clontech) meghonosítottuk a laborban ezt a Magyarországon eddig nem alkalmazott eljárást, és optimalizáltuk az injektálási és elektroporálási paramétereket a neocortexbe történő elektroporálással. Ezek a kísérletek szépen mutatják a módszer alkalmazhatóságát az adott időpontban születő neurális progenitorokba történő célzott génbevitelre. A gangliondombban születő GABAerg sejtek célzott elektroporálása viszont valamivel nehezebb feladat. Egyrészt korábban kell elektroporálni (E12.5), amikor az embriót körülvevő méh fala még nem túl átlátszó és mag az embrió is jóval kisebb és sérülékenyebb. Másrészt úgy néz ki hogy a CMV promoter nem túl aktív az idegrendszernek ezen a területén. Mivel a corticális in utero elektroporáció sokkal könnyebb ezért egy másik projektben a cadherin 13 funkcionális vizsgálatához alkalmazzuk. Ami az N-cadherin gangliondombba történő elektroporációját illeti, jelenleg exo utero elektroporációval próbálkozunk, (ami során az embriókat kivágjuk a méhből és csupán az allantois-ba burkolva maradnak és így végezzük a kísérletet), de így az embrió nagyon sérülékeny, ami hosszabb távon (több napos fejlődési intervallumot kellene vizsgálni) jelentős, akár 90%-os halálozáshoz is vezethet. A célunk továbbra is az, hogy az N-cadherin illetve annak domináns negatív verzióját túltermeltessük a gangliondomb ventrikuláris zónájának sejtjeiben és megfigyeljük, hogy ez megzavarja-e a GABAerg neuronok migrációját. Mivel a kortexben a fő GABAerg

migrációs útvonalon (intermediér zóna) illetve a vándorló sejtekben nincs N-cadherin expresszió, ezért elképzelhető, hogy annak túlexpresszáltatásával meg tudjuk akadályozni az elektroporált sejtek migrációját. Mivel a CMV promotor nem hajt erős expressziót a gangliondombokban azért egy másik reguláló szekvenciát kerestünk. Az *m12* enhancer a *Dlx1/2* gén közös enhancere és mint ilyen felelős a gangliondombban történő erős *Dlx1* illetve *Dlx2* expresszióért. Mi ezt az enhancert megkaptuk (M.Ekker, University of Ottawa, Kanada) és a benne levő LacZ gént helyettesítettük az N-cadherinnel illetve az eGFP-vel. E két plazmid együttes elektroporálásával nyomon követhető lesz az elektroporált sejtek viselkedése.

4.2. Megoldások: Kondicionális N-cadherin KO egértörzs

Az elmúlt év során került publikálásra a Cre-Flox rendszeren alapuló kondicionális N-cadherin egértörzs publikálására. Mi ezt az azóta kereskedelmi forgalomban (JAX Mice and Services, Jaxsonville, USA) is elérhető egértörzset megvásároljuk és a birtokunkban levő *Dlx5/6-Cre* vonallal keresztezzük, amik szintén a gangliondombban differenciálódó GABAerg sejtekben aktivizálják a Cre fehérjét. Elképzelhető, hogy valamilyen transzkripciós faktor (pl. *dlx*, *arx*) hatására ezekben a sejtekben az N-cadherin expressziója megváltozik. A gangliondomb-specifikus *Ncad-KO* segítségével meg tudjuk megvizsgálni, hogy az N-cadherinnek van-e direkt szerepe a GABAerg sejtek fejlődésében. Az állatok megrendelése megtörtént, majd felszaporításuk után a *Gad65-eGFP* vonallal kereszteztük őket, hogy a GABAerg sejtek migrációját és differenciációját direkt, *in vivo* is nyomon tudjuk követni *fNcad^{-/-};Gad65-GFP*. Jelenleg a *dlx-5/6 Cre* vonallal keresztezzük ezt a kettős transzgenikus vonalat majd vizsgáljuk a homozigóta (*fNcad^{-/-};Dlx5/6-Cre;Gad65-GFP^{+/-}*) és heterozigóta (*fNcad^{+/-};Dlx5/6-Cre;Gad65-GFP^{+/-}*) embriókban a GABAerg sejtek migrációját és differenciációját. Ez heteken belül megkezdődhet és még idén választ kaphatunk a kérdéseinkre.

A fenti viszonylag részletes eredménybemutatással azt igyekeztem prezentálni, hogy bár az eredeti tervezett (és kivitelezett) vizsgálati módszerrel rajtunk kívül álló okból nem sikerült eredményeket elérnünk, és emiatt publikálnunk sem, rendkívül erőfeszítéssel (ezért külön köszönet hallgatóimnak Bercsényi Kingának, Géczy Kornélnak és Mayer Mátyásnak) az utolsó évben meghonosítottunk egy új vizsgálati módszert amivel, és persze a kondicionális *Ncad* knockout egér megszerzésével sikerül a kísérleteket befejeznünk és a minket érdeklő kérdésekre választ kapunk. Jelenleg azon dolgozunk, hogy más forrásokat biztosítsunk ennek a kutatásnak a befejezésére, illetve, hogy minél előbb publikálhassuk az expressziós vizsgálatokból származó eredményeinket.

Ezúton szeretnék megköszönni az Országos Tudományos Kutatási Alapnak a munkám támogatásához nyújtott segítségét és ez a köszönet természetesen minden az ebből a pályázatból a jövőben megjelenő cikk Acknowledgementjében olvasható lesz.

Tisztelettel

Dr. Lele Zsolt, Ph.D, tudományos főmunkatárs, MTA KOKI

Közleményjegyzék:

M. Mayer, K. Bercsényi, K. Géczi, G. Szabó and Z. Lele

Expression of two type II cadherins, *Cdh12* and *Cdh22* in the developing and adult mouse brain

Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary
(submitted to Gene Expression Patterns IF: 2,12)

K. Géczi, M. Mayer, K. Bercsényi, C. Vastagh, G. Szabó and Z. Lele

Comparative mRNA expression analysis of 12 type II cadherins during mouse cortical and hippocampal development. (in preparation for submission to Journal of Comparative Neurology)

K. Bercsényi, K. Géczi, M. Mayer, G. Szabó and Z. Lele

Overexpression of the atypical cadherin, *Cdh13* in the developing neocortex delays migration and results in precocious differentiation and increased apoptosis of neural progenitors.

(in preparation for submission to European Journal of Neuroscience)

Mivel a pályázat során kénytelen voltam komoly projekt átalakítást végezni, ami természetesen a publikációk későbbre csúszásához vezetett, ezért kérem az T. OTKA Bizottságot, hogy az eredmények ismételt értékelésére 2 év múlva kerüljön sor.

Köszönettel

Dr. Lele Zsolt, MTA KOKI