

Jelitai Márta OTKA pályázat (F 68940) zárójelentés (2007 07.01-2010 06.30)

„Idegi ősz/progenitor sejtek fejlődésének fiziológiai jellemzése”

Alulírott Jelitai Márta, Fiatal Kutatói kategóriában (F 68940) nyújtottam be a pályázatot.

Az OTKA pályázat keretéből az MTA KOKI Idegi Sejt és Fejlődésbiológia Laboratóriumában beállítottam az elektrofiziológiai mérésekhez szükséges felszerelést, a meglévő elemeket a költségterv módosítása alapján fejlesztettem. Jelenleg Axon MultiClamp700B, CED micro1401 és WCP (Strathclyde Electrophysiology Software Whole Cell Program) programmal működik a berendezés.

Az NE-4C¹ idegi őssejtek fejlődésnek vizsgálata mellett, a kutatást kiterjesztettük primer agyszövetből izolált radiális gliasejtek² jellemzésére és differenciálódásának vizsgálatára. A radiális gliasejtek a neuroepithel őssejtjeihez viszonyítva a neurális fejlődés egy következő lépcsőjét képviselik. A radiális gliasejtek vizsgálatához különböző korú embrionális agyszövetből (E14, E18) izolált tenyészeteket, illetve felnőtt agyszövetből szelektált radiális gliasejteket használtam.

Az indukálatlan NE-4C sejtek vizsgálata során megmutattam, hogy a sejtekben expresszálódik az EAAT4-es glutamát transzporter. A transzporter korai jelenléte idegi ősz/progenitor sejteken a sejtek kloridion háztartása szempontjából lehet fontos. A sejtek extracelluláris glutamát koncentrációja ekkor még nem áll szigorú szabályozás alatt és elsősorban a nagy affinitású GLAST transzporter felelős a glutamát szintjének szabályozásáért. Ugyanakkor az EAAT4 transzporter jelentős kloridion konduktanciával rendelkezik, a kloridion áramot a sejtek nyugalmi potenciálja és az extracelluláris glutamát koncentráció szabályozza.

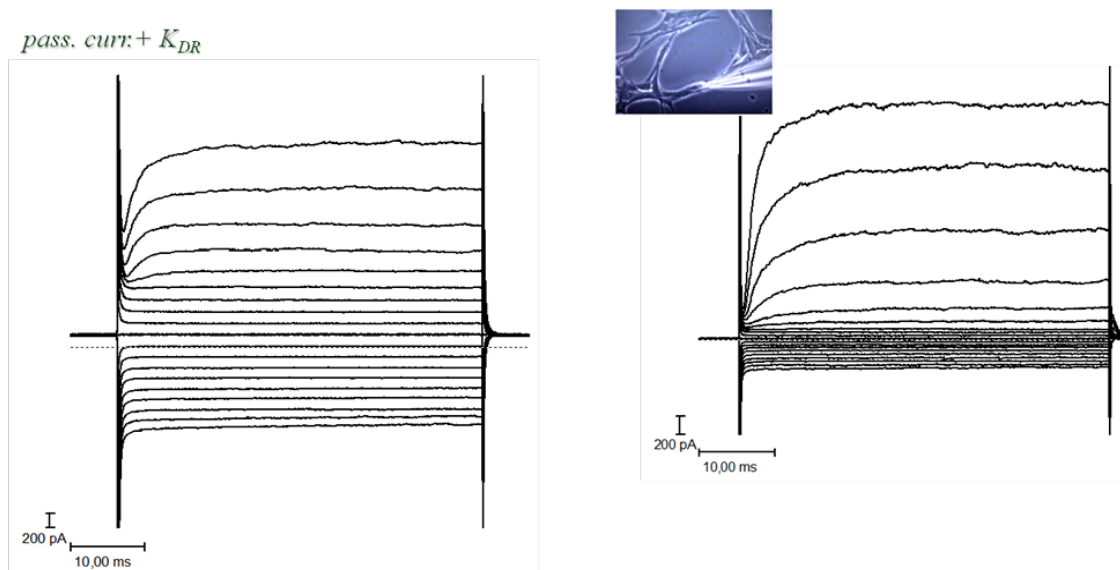
1) Ionos csatoltság vizsgálata

- Az NE-4C idegi őssejtek kiterjedt gap junction (GJ) kapcsolatok révén, ionosan csatoltak. A kapcsoltságot fluoreszcens festékkerjedés alapján vizsgáltam. A GJ kapcsolatok nagyon hamar, kevesebb mint 5 perc alatt kialakulnak. A kapcsoltság következményeként a sejtek között szabad ionáramlás valósul meg, ami hatalmas passzív ionáramot eredményez az egyedi sejtekben. A passzív ionáramot whole cell patch-clamp módszerrel vizsgáltam. GRA vagy CBX hozzáadásával - a GJ kapcsolatok blokkolásával- az áram teljes mértékben kivédhető. Ha a GJ kapcsolatokat blokkoljuk a sejtek egy részében feszültségfüggő delayed rectifier káliumáram mérhető (K_{DR}).
- Az NE-4C sejtek idegi elköteleződése során K_{DR} áram közel minden sejtől mérhető. A passzív áram mértéke csökken a sejtekben, továbbá megjelennek olyan sejtek is, amelyek GJ kapcsoltságukat már teljes mértékben megszüntetik és csak feszültségfüggő áramokat mutatnak.

¹ Az NE-4C sejt vonal 9 napos, p53 deficiens egér embriók neuroektodermájából származó, egysejt eredetű klón. A folyamatosan osztódó, azonos fenotípusú sejtek homogén tenyészetekben all-transz retinsav (10^{-7} M) idegi differenciálódást indít el. Az epithel-morfológiájú sejtek kezdetben aggregálnak, majd ezeken az aggregátumokon belül jelennek meg az első idegi sejtalakok. Az aggregátumokból kivándorló idegi-előalakokból sűrű neuronhálózatok fejlődnek. A neuronhálózatok alatt, lapos, kiterült sejtekből álló aljzatsejtréteg alakul ki (Schlett and Madarasz, 1997).

² A radiális gliasejtek az embrionális fejlődés során neurális őssejtként funkcionálnak. Laboratóriumunkban bármilyen korú egér agy tetszőleges agyi régióiból egy szintetikus peptid-konjugátum (AK-cyclo[RGDFC]) segítségével homogén radiális gliasejt kultúrát tudunk fenntartani (Marko et al., 2008) szérum mentes tápoldatban kizárólag EGF hozzáadásával bFGF nélkül.

- Elektrofiziológiai sajátosságukat tekintve a primer - akár embrionális (E14, 18), akár felnőtt - agyszövetből izolált radiális gliasejtek az idegi elköteleződés stádiumának sajátosságait mutatják. Minden sejtből mérhető K_{DR} áram és a sejtek csak egy része mutat nagy passzív ionáramot (1. ábra). A passzív konduktivitás mértéke változó, a sejtek különböző mértékű GJ kapcsoltságának köszönhetően. Fluoreszcens festékterjedéses vizsgálatokkal megmutattam, hogy a radiális gliasejtek ~50%-a mutat GJ kapcsoltságot és a kapcsolt sejtegyüttesek mérete nagyon különböző. A K_{DR} ionáramok peak amplitudója szignifikánsan nagyobb (háromszoros) mint a radiális gliasejtekből differenciálódó idegsejteken mért értékek, feltételezhetően szintén a GJ kapcsoltságnak köszönhetően.



1) ábra

A radiális gliasejtek nagy passzív konduktanciával (4.2 ± 0.7 nS) és K_{DR} árammal jellemezhetőek. A passzív konduktivitás mértéke a GJ kapcsoltság mértékében változik. A bal oldali sejt nagy szimmetrikus passzív ionárammal bír, amelyhez hozzáadódik a K_{DR} áram, míg a jobb oldali sejten a passzív konduktivitás mértéke szignifikánsan kisebb.

- Az NE-4C sejtek idegi irányban történő differenciálódása során az idegsejt markereket kifejező neuron-előalakok már nem GJ kapcsoltak. Az osztódási kapacitásukat megőrző, radiális gliasejtekre jellemző RC2 filamentumot expresszáló, úgynevezett aljzatsejtek viszont továbbra is GJ kapcsoltak és nagy passzív konduktanciával jellemezhetőek. A GFAP-t expresszáló asztroglia sejtek ezek között a sejtek között jelennek meg a tenyésztés második hetében.

A NE-4C sejteken végzett vizsgálatok eredményei megjelentek (Jelitai et al., 2007) míg a radiális gliasejtek jellemzéséből két poszter készült (Jelitai et al., 2009; Jelitai et al., 2010) és egy kézirat beküldés alatt áll (Marko et al., 2010).

II) Ioncsatornák vizsgálata a korai idegi sejtdifferenciálódás során

- Az NE-4C sejtek idegi differenciálódása során a feszültségfüggő kálium-és nátriumáramok közül a K_{DR} áramok jelennek meg elsőként. Míg a passzív konduktanciával rendelkező őse-és progenitorsejteken a K_{DR} áram 4-aminopyridin (4-AP) szenzitív és tetraethylammonium chloride (TEA) egyáltalán nem gátolja az ionáramot, a differenciálódó NE-4C idegsejteken kifejeződő K_{DR} ionáram már TEA érzékeny és a 4-AP csak részben vagy egyáltalán nem gátol. Ezzel szemben a radiális

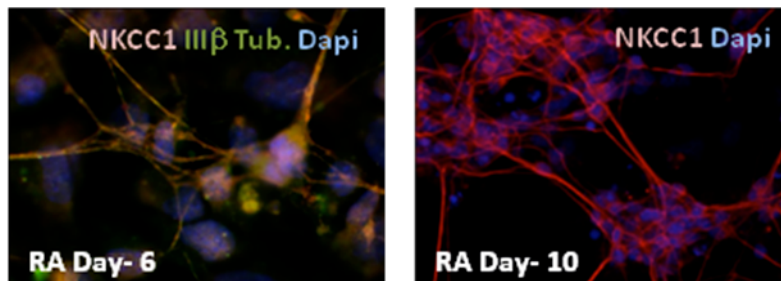
gliasejteken a TEA csökkenti a K_{DR} áramot, tehát a radiális gliasejtek K_{DR} ionárama TEA szenzitív. A TEA gátló hatása nagy mértékben variál a sejtek között. A K_{DR} ionáram fejlődési állapotól függő érzékenysége az ioncsatorna alegység összetételének specifikus változásaira utal az idegi differenciálódás különböző stádiumaiban.

- 4-AP szenzitív, A típusú káliumáram (K_A) az idegi differenciálódás viszonylag későbbi szakaszaiban, csak az idegsejt morfológiával rendelkező NE-4C idegsejtekben mérhető.
- Bárium szenzitív inward rectifier káliumáram az elkötelezett idegsejt-előalakokban jelenik meg először, gyakorisága a differenciálódás során végig alacsony marad.
- TTX szenzitív nátriumáram nagyon korán még a morfológiai változások előtt de már a GJ kapcsoltság megszűnte után jelentkezett a differenciálódó NE-4C prekurzorokban. Radiális gliasejtek esetén az ionáram csak a morfológiai változások után volt mérhető. Az ionáram amplitudója az *in vitro* idegsejt-differenciálódás során mindkét esetben szignifikánsan növekedett.

A NE-4C sejteken végzett vizsgálatok eredményei megjelentek (Jelitai et al., 2007) míg a radiális gliasejtek jellemzéséből két poszter készült (Jelitai et al., 2009; Jelitai et al., 2010) és egy kézirat beküldés alatt áll (Marko et al., 2010).

III) Kloridionháztartás vizsgálata

- A feltételezett feszültségfüggő kloridion csatornák expressziójának mRNS szintű vizsgálata folyamatban van.
- Az NKCC1 kotranszporter jelenlétét immuncitokémiai módszerekkel vizsgáltam az NE-4C sejtek idegi differenciálódása során. A transzporter kolokalizációt mutatott a β III tubulin idegsejt specifikus marker fehérjével és erősen kifejeződött a differenciálódó NE-4C idegsejtekben (2.ábra).



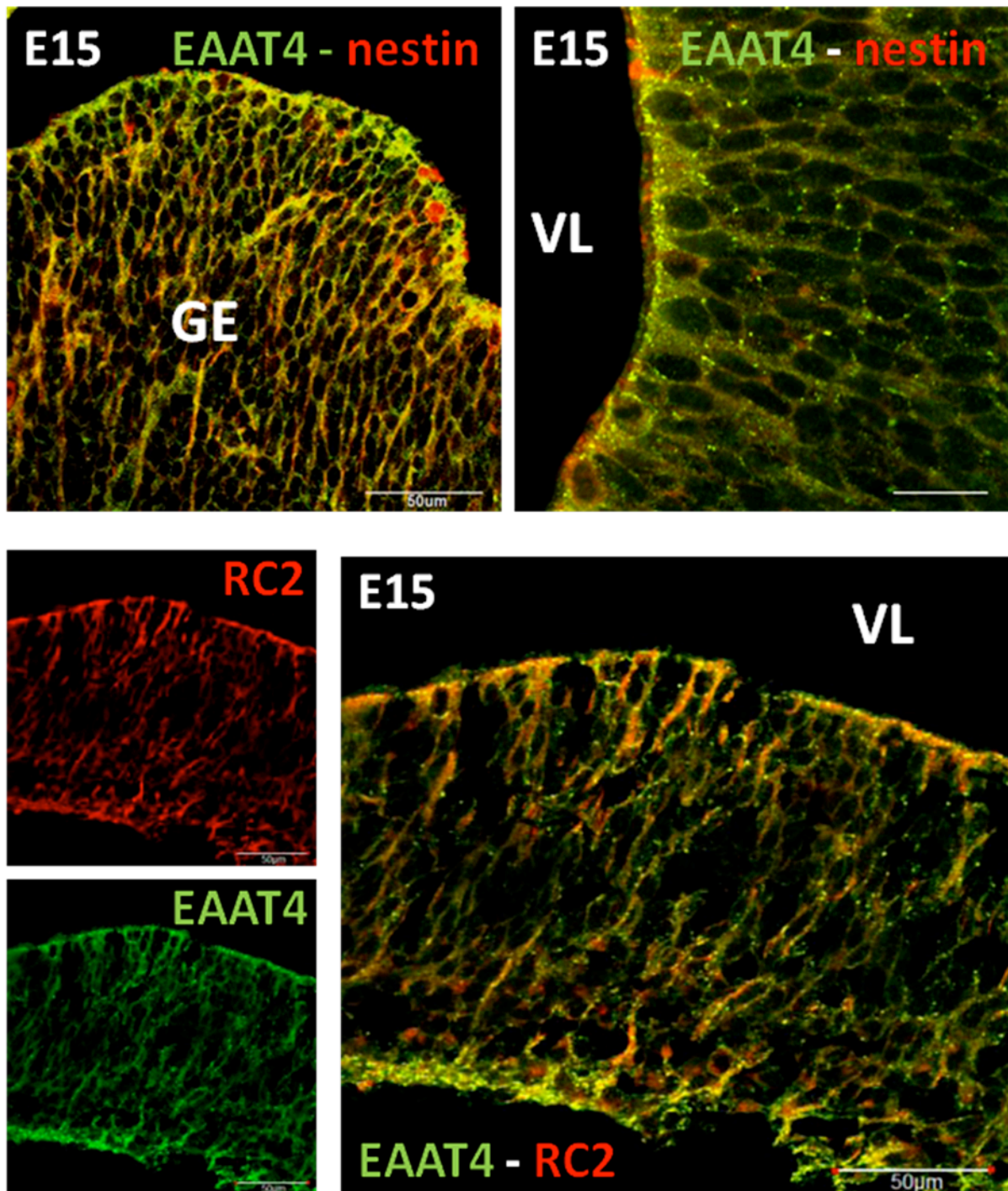
2) ábra

NKCC1 transzporter kifejeződése a RA indukció utáni 6. és 10. napon. A transzporter az idegsejt specifikus β III tubulin immun-pozitív idegsejtekben mutatható ki.

IV) EAAT4 transzporter jelenlétének vizsgálata

- Az NE-4C idegi őssejteken kifejeződik az EAAT4 transzporter. Jelenlétét mind mRNS (RT-PCR) és fehérje szinten (Western blot) megmutattuk. A transzporter működését radioaktív glutamát felvételi vizsgálatokkal igazoltuk specifikus antagonisták (T3MG, TFB-TBOA) jelenlétében.
- A transzportert jelenlétét kimutattuk P19 neurális carcinoma sejteken (mRNS, fehérje) és egér ES sejteken (mRNS) is, illetve 16 napos egér előagy homogenizátumból (Western blot).

In vivo különböző fejlődési állapotú (E15, P1) egér és patkány agy metszeteken immunocitokémiai módszerekkel vizsgáltuk a transzporter kifejeződését. Az EAAT4 transzporter fejlődési állapotától függő specifikus expressziót mutatott.



3) ábra

EAAT4 expresszió 15 napos egér embrió neurogén zónáiban. Az EAAT4 a nestin és RC2 filamentum-fehérjékkel azonosítható progenitor sejtekben mutatható ki. GE: Ganglionic eminence, VL: Ventriculus lateralis. Az EAAT4 – nestin kettős festés az oldalkamra mediális, az EAAT4 – RC2 kettős festés pedig az oldalkamra ventro-laterális faláról készült.

- Perinatális P1 egér agy metszetein nem találtunk EAAT4 pozitív festődést a neurogén SVZ és gyrus dentatus területén. EAAT4 immunreaktív sejtek voltak viszont az oldalkamrák mediális csúcsában, az oldalkamrák anteromediális részén, a fissura longitudinalis mentén és a ventrális pia mater mentén. Az EAAT4 festődés csak részben kolokalizált nestin expresszióval, továbbá a ventrális pia mater mentén, ahol jelentős EAAT4 reaktivitást találtunk, nestin-pozitív sejteket nem tudtunk kimutatni. Minden EAAT4 immunreaktív sejt azonban pozitívan festődött GFAP asztroglia filamentumra, minden vizsgált agyterületen.
- Embriónális 15 napos (E15) egér fejlődő agy metszetein jelentős mértékű EAAT4 festődést tapasztaltunk a neurogén szubventrikuláris zónában, mind a dorzális régiókban, mind a gangliondombok területén. Az EAAT4 festődés itt teljes mértékben átfedett a nestin és a radiális gliasejtekre jellemző RC2 jelenlétével (3. ábra).

Az adatok azt mutatják, hogy az EAAT4 transzporter expresszálódik a fejlődő egéragy idegi ősz/progenitor sejteiben és a későbbi fejlődés során jelen van a gliális progenitorokban és egyes asztroglia populációkban.

Az eredményeket poszter (Jelitai et al., 2008, Neubrandt et al., 2009, 2010), TDK, OTDK (különdíj), a Mikroszkópos Társaság konferenciáján előadás (Neubrandt Máté), illetve szakdolgozat (Neubrandt Máté) formájában prezentáltuk. Az eredményeket összefoglaló kézirat beküldés előtt áll.

V) Fogpulpa nyugvó sejteinek idegi irányba történő differenciálódása *in vitro*

Kollaborációs munka keretében, a Semmelweis Egyetem Orálbiológiai Tanszékén Dr. Varga Gábor csoportjával együttműködve vizsgáltuk a fogpulpa állományában található nyugvó sejtek idegi differenciálódását.

- A fogpulpa sejteiből megfelelő indukciós hatásokra idegsejtek képződtek, melyek mRNS és fehérje szinten is expresszáltak neuronális markereket (III β tubulin, NF-M, NeuN, MAP-2). A fogpulpa eredetű sejtekben az asztroglia irányú differenciálódást a GFAP kifejeződése igazolta.
- Az idegi differenciálódás során a funkcionális neuron-sajátságok is regisztrálhatóak voltak, a fejlődő idegsejtek TTX szenzitív nátriumáramot mutattak.
- Az idegsejtekből regisztrált K_{DR} áramok TEA-val részlegesen gátolhatóak voltak.

A kollaborációs munkából egy publikáció született (Király et al., 2009).

A csoporthoz 2007-ben csatlakozott Neubrandt Máté III éves biológus, aki az EAAT4 transzporter kutatási témájához csatlakozott. Neubrandt Máté eredményeit hazai és külföldi konferenciákon és a Tudományos Diákköri versenyen nagy sikerrel mutatta be. Szakdolgozatát az EAAT4 témájából írta és sikeresen felvételizett a SOTE Idegtudományi Doktori Iskolájába, így kutatási munkáját az MTA KOKI keretein belül az Idegi Sejt és Fejlődésbiológia Laboratóriumban folytathatja.

2009 őszén újabb diákkörös csatlakozott a laboratóriumhoz Szabó Csilla, aki a radiális gliasejtek K_{DR} áramainak vizsgálatával kezdett foglalkozni.

Marko et al., A Novel Synthetic Peptide Polymer with Cyclic RGD Motifs Supports Serum-Free Attachment of Anchorage-Dependent Cells Bioconjugate Chem. 2008, 19, 1757–1766

Schlett, K. & Madarasz, E. (1997) Retinoic acid induced neural differentiation in a neuroectodermal cell line immortalized by p53 deficiency. *J Neurosci Res*, **47**, 405-415.

Publikációk:

Jelitai M, Anderova M, Chvatal 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) 1606-1617 (2007)

Király M., B. Porcsalmy, A. Pataki, K. Kádár, M. Jelitai, B. Molnár, P. Hermann, I. Gera, W. Grimm, B. Ganss, A. Zsembery, G. Varga: (2009) Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons, **Neurochem. Int.** 2009 55: 323-332

Konferencia szereplések:

Jelitai M., B. Varga, Zs. Kornyei, M. Neubrandt, E. Madarász: Non-genomic regulation of glutamate uptake by retinoic acid in developing neural cells, **FENS Forum**, Geneva, Switzerland 07/12-16/2008

Neubrandt M., M. Jelitai, B. Varga, E. Madarász: Studies on EAAT4 glutamate transporter during early neural development (2009) **Meeting of Hungarian Society of Neuroscience** Budapest, Hungary, 01/22-24/2009 **awarded poster**

Jelitai M., Marko K., Hádinger N., Madarász E.: Ion currents and gap junction coupling in isolated radial glial cells and cloned embryonic neuroepithelial stem cells, **ISSCR Conference**, Barcelona, Spanyolország 07/07-11/2009

M. Neubrandt, B. Varga, E. Madarász, M. Jelitai: EAAT4 glutamát transzporter megjelenése az idegi fejlődés során, **előadás** Magyar Mikroszkópos Társaság Éves Konferenciája, Siófok, 2009

Neubrandt Máté: Glutamát transzporterek az idegi elköteleződés során-EAAT4 glutamát transzporter vizsgálata, **XXIX. OTDK**, Biológia Szekció, Veszprém, 2009 **különdíj**

Jelitai M., K. Marko, N. Hádinger, E. Madarász: Ion currents and gap junction coupling in isolated radial glial cells (2010) **Meeting of Hungarian Society of Neuroscience** Pécs, Hungary, 01/21-23/2010

Neubrandt M. B. Varga, E. Madarász, M. Jelitai: The role of EAAT4 glutamate transporter in neural stem cells (2010), **FENS Forum**, Amsterdam, Netherland 07/3-7/2010

Marko K., Kohidi T., Jelitai M., Hádinger N. & Madarász E.: Selective adhesion and long-term culturing of radial glia-like neural stem cells on a synthetic peptide-conjugate (2010), **FENS Forum**, Amsterdam, Netherland 07/3-7/2010