

# Retinoidok szerepe az idegi őssejtek differenciációjának szabályozásában

Doktori értekezés

**Orsolits Barbara**

Semmelweis Egyetem  
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Környei Zsuzsanna, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Tóth Sára, egyetemi docens  
Dr. Apáti Ágota, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Nagy M. György, egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Jancsik Veronika, egyetemi tanár  
Dr. Herberth-Minkó Krisztina, egyetemi tanársegéd

Budapest  
2013

## Tartalomjegyzék

<b>TARTALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>2</b>
<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	<b>5</b>
<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	<b>6</b>
1.1. AZ ÖSSEJTEK.....	6
1.1.1. Az őssejtek általános jellemzése.....	6
1.1.1.1. Az embrionális őssejtek.....	8
1.1.1.2. A felnőtt őssejtek.....	9
1.1.1.3. Indukált pluripotens őssejtek.....	10
1.1.1.4. A tumorokban előforduló őssejtek.....	11
1.1.1.5. Őssejt terápia.....	11
1.1.2. Idegi őssejtek.....	12
1.1.2.1. Idegsejtképződés a fejlődő idegrendszerben.....	12
1.1.2.2. A radiális glia.....	13
1.1.2.3. Felnőttkori neurogenesis.....	14
1.1.2.4. Asztrogliatípusú sejtek szerepe az idegsejtképződésben.....	16
1.1.3. Az idegi őssejtek környezete.....	17
1.1.3.1. Az asztroglia-sejtek jellemzése.....	18
1.1.3.2. Az asztroglia-sejtek típusai.....	19
1.1.3.3. Asztrocita markerek.....	20
1.1.3.4. A reaktív gliózis.....	22
1.2. NEURONÁLIS DIFFERENCIÁCIÓT SZABÁLYOZÓ FAKTOROK.....	23
1.2.1. Általános jellemzés.....	23
1.2.2. Retinoidok.....	24
1.2.2.1. A retinoidok általános jellemzése.....	24
1.2.2.2. A retinoidok metabolizmusa.....	26
1.2.2.3. A retinoidok szerepe az embrionális fejlődésben.....	32
1.2.2.4. A retinoidok szerepe a felnőtt idegrendszerben.....	36
1.2.2.5. Hipervitaminózis.....	40
1.2.2.6. Az A vitamin hiány hatásai.....	42
1.3. <i>IN VITRO</i> MODELLENDSZEREINK.....	43
1.3.1. Az asztroglia-sejtek.....	43
1.3.2. Az NE-4C sejt vonal.....	45
1.3.3. A radiális gliasejtek.....	47
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	<b>49</b>
<b>3. ANYAG ÉS MÓDSZER</b> .....	<b>50</b>
3.1. TENYÉSZTŐFELÜLETEK KÉSZÍTÉSE.....	50
3.2. SEJTTENYÉSZETEK KÉSZÍTÉSE ÉS FENNTARTÁSA.....	50
3.2.1. Primer asztroglia-tenyészetek készítése és fenntartása.....	50
3.2.2. NE-4C sejtek fenntartása.....	50
3.2.3. Embrionális őssejtek (ES) származása, tenyésztése és fenntartása.....	51
3.2.4. Radiális gliasejtek tenyésztése és fenntartása.....	51

3.2.5. <i>F9 sejtvonal fenntartása</i> .....	52
3.3. KONTAKT ÉS NEM-KONTAKT KO-KULTÚRÁK KIALAKÍTÁSA, FENNTARTÁSA .....	52
3.3.1. <i>Kontakt ko-kultúrák kialakítása</i> : .....	52
3.3.2. <i>Nem-kontakt ko-kultúrák kialakítása</i> : .....	53
3.4. NEURÁLIS INDUKCIÓ ALL-TRANZ RETINSAVVAL, RETINOLLAL, RETINIL-ÉSZTERREL ÉS SZÉRUM MEGVONÁSSAL .....	53
3.5. ÉLETKÉPESSÉG MÉRÉSE .....	53
3.6. POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓK – PCR.....	54
3.6.1. <i>RT-PCR</i> .....	54
3.6.2. <i>Real-Time PCR</i> .....	55
3.7. KÜLÖNBÖZŐ SEJTEK/SZÖVETEK ENDOGÉN RETINSAV TERMELÉSÉNEK VIZSGÁLATA.....	56
3.8. HPLC – MAGAS NYOMÁSÚ FOLYADÉK KROMATOGRÁFIA .....	57
3.9. A RETINSAV SZIGNALIZÁCIÓ GÁTLÁSA .....	58
3.10. TRANZKARDIÁLIS PERFÚZIÓ .....	58
3.11. METSZETKÉSZÍTÉS.....	59
3.12. IMMUNCITOKÉMIAI ÉS IMMUNHISZTOKÉMIAI FESTÉS .....	59
3.13. MIKROSKÓPOS VIZSGÁLATOK .....	60
3.14. FLUORESZCENCIA AKTIVÁLT SEJTSZORTÍROZÓ BERENDEZÉS (FACS).....	61
3.15. AGILENT RNS MICRO-ARRAY .....	61
3.16. STATISZTIKA .....	62
<b>4. EREDMÉNYEK</b> .....	<b>63</b>
4.1. AZ ASZTROGLIASEJTEK RETINSAV TERMELÉSÉNEK VIZSGÁLATA.....	63
4.1.1. <i>Idegsejtképződés asztroglia sejtek és különböző eredetű összejtek ko-kultúráiban</i> .....	63
4.1.1.1. Embriónális összejtek neuronális differenciációja asztroglia jelenlétében .....	63
4.1.1.2. NE-4C idegi összejtek neuronális indukciója asztroglia hatására .....	64
4.1.2. <i>Asztroglia sejtek retinsav termelésének kimutatása</i> .....	66
4.1.2.1. Retinsav szintetizáló enzimek kimutatása asztroglia sejtekből .....	66
4.1.2.2. Asztroglia sejtek RA termelésének kimutatása RA-szenzitív bioassay segítségével .....	67
4.1.2.3. F9 sejtek aktiválódása kontakt és nem-kontakt ko-kultúrákban .....	69
4.1.3. <i>Különböző agyterületekből izolált asztroglia retinsav termelésének vizsgálata</i> .....	70
4.1.3.1. Retinsav szintetizáló enzimek kimutatása asztroglia sejtekből .....	70
4.1.3.2. A retinsav termelésének kimutatása F9 sejtek segítségével .....	71
4.1.3.3. A retinsav jelenlétének kimutatása asztroglia sejtekből HPLC segítségével .....	71
4.1.4. <i>A retinsav szignalizáció gátlásának hatása az asztroglia által indukált idegsejtképződésre</i> ..	73
4.1.4.1. A retinsav szignalizációt gátló antagonisták koncentrációjának kiválasztása .....	73
4.1.4.2. ES sejtek és asztroglia sejtek ko-kultúráinak kezelése Rar antagonistával .....	74
4.1.4.3. Az antagonisták kezelése az NE-4C/asztroglia ko-kultúrákban .....	76
4.1.4.4. A retinsav receptoron keresztül történő szignalizáció korai szerepe .....	78
4.1.5. <i>Az asztroglia sejtek in vivo retinsav termelésének vizsgálata</i> .....	81
4.1.5.1. A retinoid metabolizmus elemeinek vizsgálata RT-PCR alkalmazásával.....	81
4.1.5.2. A retinsav termelés vizsgálata F9 sejtekkel .....	82
4.2. RETINSAV TERMELÉS A KÖZPONTI IDEGRENDSZERBEN .....	84
4.2.1. <i>A retinsav jelenléte az agyban</i> .....	84
4.2.2. <i>Retinsav termelés az agyban</i> .....	90
4.3. IDEGI ÖSSEJTEK RETINSAV TERMELÉSÉNEK VIZSGÁLATA.....	94
4.3.1. <i>A retinsav metabolizmus elemeinek expressziós változásai az idegi irányú differenciáció során</i> .....	94

4.3.1.1. Az A vitamin felvételéért és raktározásáért felelős komponensek vizsgálata .....	94
4.3.1.2. A retinsav szintézis komponensei .....	96
4.3.1.3. Intracelluláris retinol és retinsav transzport .....	98
4.3.1.4. A retinsav lebontását végző enzimek vizsgálata .....	99
4.3.1.5. Retinoid receptorok .....	100
4.3.2. A retinsav termelés vizsgálata idegi őssejtekben .....	102
4.3.3. A differenciáció során termelődő retinsav hatása az elköteleződés folyamatára .....	103
4.3.3.1. A retinsav metabolizmus elemeinek vizsgálata mRNS szinten az idegi irányú differenciáció során .....	104
4.3.3.2. Az NE-4C sejtek differenciálódásának vizsgálata fehérje szinten .....	106
4.3.4. A retinsav hatása a radiális gliasejtek differenciálódására .....	110
<b>5. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>112</b>
5.1. AZ ASZTROGLIASEJTEK RETINSAV TERMELÉSE .....	112
5.2. AZ ASZTROGLIA EREDETŰ RETINSAV HATÁSA AZ ŐSSEJTEKRE .....	114
5.3. RETINSAV PRODUKCIÓ A KÖZPONTI IDEGRENDSZERBEN .....	115
5.4. AZ IDEGI ŐSSEJTEK RETINSAV TERMELÉSE .....	117
<b>6. KÖVETKEZTETÉSEK .....</b>	<b>121</b>
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>122</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>123</b>
<b>9. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>124</b>
<b>10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....</b>	<b>147</b>
<b>11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>148</b>

## Rövidítések jegyzéke

**AGN** = pan-Rar antagonist (AGN193109)  
**AS** = felnőtt őssejtek (adult stem cells)  
**β-gal** = β-galaktozidáz enzim  
**CER** = kisagy  
**CHAPS** = 3-[(3-cholamidopropil)-dimetilammonio]propánszulfonát  
**COR** = agykéreg  
**Crabp** = celluláris retinsav kötő fehérje (cellular retinoic acid binding protein)  
**Crbp** = celluláris retinol kötő fehérje (cellular retinol binding protein)  
**CS** = tumorokban előforduló őssejtek (cancer stem cells)  
**Cyp26** = citokróom P-450 fehérjék  
**DAB** = 3,3'-diamino-benzidin  
**DMEM** = Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
**DMSO** = dimetil-szulfoxid  
**EB** = embryoid body (embrió- csomó)  
**EGF** = epidermal growth factor  
**ES** = embrionális stem (ős-) sejtek  
**FACS** = fluorescence-activated cell sorting  
**FCS** = főtális borjú szérum  
**FGF** = fibroblast growth factor  
**FIS** = fissura longitudinalis  
**GD** = gyrus dentatus  
**Gfap** = gliális fibrilláris savas fehérje  
**GFP** = zöld fluoreszcens fehérje  
**HB** = utóagy  
**HC** = hippocampus  
**HPLC** = magas nyomású folyadék kromatográfia  
**Hprt** = hipoxantin-guanin-foszforibozil transzferáz (referencia gén)  
**ICM** = inner cell mass (blasztula belső sejtcsovéja)  
**LIF** = leukemia inhibitory factor  
**Lrat** = Lecithin retinol acyltransferase  
**Math2** = egér athonal homológ 2 gén  
**MEM** = Eagle's Minimal Essential Medium  
**MEN** = agyhártya  
**MTT** = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid  
**Ng2** = neurogenin 2 gén  
**OD** = optikai denzitás  
**ONPG** = o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid  
**PBS** = foszfát pufferelt fiziológiás sóoldat  
**RA** = all-transz retinsav  
**Raldh** = retinaldehyd-dehidrogenáz enzim  
**Rar** = retinsav receptor  
**RARE** = retinsav érzékeny (responsive) elem  
**Reh** = retinil-észter hidroláz  
**RT-PCR** = reverz transzkripció alapú polimeráz lánreakció  
**Rxr** = retinoid X receptor  
**SGZ** = szubgranuláris zóna  
**Stra6** = stimulated by retinoic acid gene 6 homolog (mouse), sejt felszíni receptor  
**SVZ** = szubventrikuláris zóna  
**Ttr** = transthyretin (praealbumin)  
**VAD** = Vitamin A deficiency  
**VZ** = ventrikuláris zóna  
**XGal** = 5-bromo-4-kloro-3-indolil β-D-galaktopiranozid

# **1. Bevezetés**

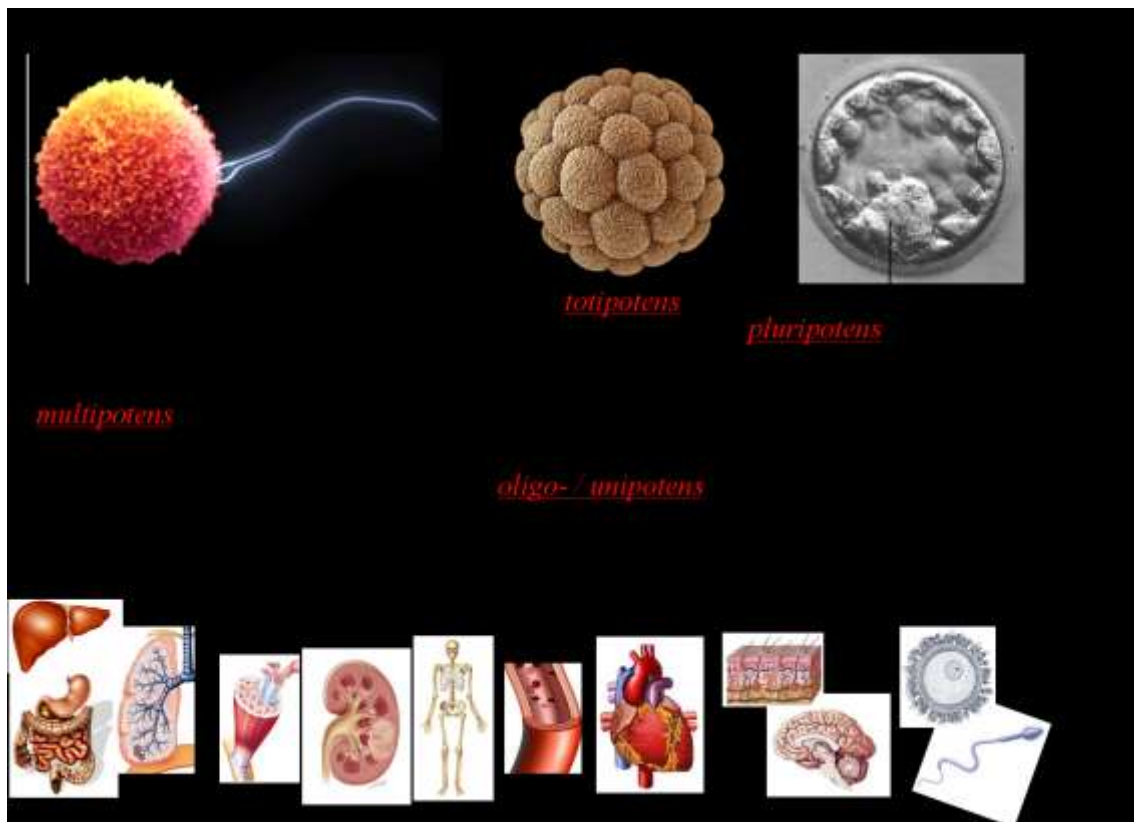
## **1.1. Az őssejtek**

### **1.1.1. Az őssejtek általános jellemzése**

Az őssejtek olyan széles fejlődési potenciállal rendelkező, osztódó képes sejtek, amelyek egyrészt önmegújításra képesek, tehát önmagukhoz hasonló, pluripotens utódsejteket hoznak létre, másrészt képesek különböző fenotípusú, specializálódott sejttypusokat kialakítani az aszimmetrikus osztódás következményeként.

Az egyedfejlődés első lépéseként, az egyesülő petesejtből és hímvarsejtből kialakuló zigóta speciális sejtosztódáson, barázdálódáson megy keresztül. Az osztódások során a sejtek egyre kisebbek lesznek és kialakítják a szedercsírat (1. ábra). A szedercsíra állapotban minden egyes sejt a legszélesebb fejlődési potenciállal rendelkezik, tehát totipotens. Ezekből a sejtekből embrionális és extra-embrionális sejtek, szövetek is kialakulhatnak. A fejlődés következő szakaszában a szedercsíra belsejében sejtpusztulással üreg keletkezik, kialakul a hólyagsíra. A hólyagsíra állapotban különböző sejtcsoportok alakulnak ki, külső felszínét a trofoblaszt sejtek alkotják, üregében, az extraembrionális coelomaüregben pedig elkülönül az embriócsomó, amelyben az embriópajzsok fognak kialakulni. Az embriócsomó sejtjei pluripotensek, fejlődési potenciáljuk szűkebb, mint a szedercsíra sejtjeié, mindhárom csíralemez kialakítására és ivarsejtek képzésére is alkalmasak, extraembrionális szövetet azonban nem tudnak létrehozni. A hólyagsíra belső sejtcsoportjának sejtjeit hívjuk embrionális őssejteknek, amelyek minden differenciált sejttypust létre tudnak hozni. Ezekre a sejtekre jellemző az alkalikus foszfatáz aktivitás és az *Oct4* expresszió (Pesce és mtsai, 1999; Prella és mtsai, 1999; Fuchs és Segre, 2000). Azokat az őssejteket, amelyek a három csíralemez sejtjeinek kialakulását igen, de ivarsejtek létrehozását nem képesek biztosítani, multipotens sejteknek nevezzük. Az egyedfejlődés során ezek a sejtek szövetekre specifikussá válnak, potenciáljuk tovább szűkül, létrehozzák a különböző szöveteket felépítő sejteket, legnagyobb részük a sorozatos osztódások után differenciálódik.

Egy részük azonban megtartja őssejt jellegét és a felnőtt szervezetben is megtalálhatóak lesznek. Ezeket a sejteket nevezzük nem-embriónális vagy felnőtt őssejteknek. A nem-embriónális őssejtek oligopotensek, fejlődési potenciáljuk elsősorban az adott szervre, szövetre jellemző sejtípusok kialakítását teszi lehetővé. A felnőtt szervezetben ezek a sejtek a regenerációs mechanizmusokért felelősek és a folyamatosan megújuló szövetekben biztosítják az utánpótlást. Ilyen szövet specifikus őssejtek találhatóak például a csontvelőben (Fuchs és Segre, 2000), a májban (Michalopoulos és DeFrances, 1997), az izomszövetben (Seale és mtsai, 2001), a bőrben (Taylor és mtsai, 2000), az agyban (Reynolds és Weiss, 1992). A legszűkebb fejlődési potenciállal az unipotens sejtek rendelkeznek, amelyek csak egyetlen sejtípus kialakítására képesek ugyan, de az önmegújítás is jellemzi őket, ezért különböztetjük meg őket az osztódó testi sejtektől.



**1. ábra:** Szervek és szövetek differenciálódásának folyamata. A hólyagcsíra belső sejtcsomójából származó embriónális őssejtek pluripotensek, az egyedfejlődés során azonban csökken a fejlődési potenciáljuk.

Az őssejteket négy csoportba sorolhatjuk: két típus, amelyek jelen vannak az élet különböző szakaszaiban: az embrionális őssejtek (ES sejtek) és a felnőtt őssejtek (AS sejtek); egy mesterséges típus, az indukált pluripotens őssejtek (iPS sejtek) és a tumorokban előforduló őssejtek (CS sejtek), amelyek számos őssejt tulajdonsággal bírnak (Alvarez és mtsai, 2012). Nagyszámú vizsgálat célozta meg az őssejtek alapvető jellemzését. A tulajdonságok egy része közös, mindegyik őssejtre igaz: kifejezik a pluripotenciát jelző markereket, olyan jelátviteli útvonalak aktiválódnak bennük, amelyek segítenek fenntartani az őssejt állapotot, jellemző osztódó állapottal bírnak és hasonlóképpen viselkednek *in vitro*.

#### 1.1.1.1. Az embrionális őssejtek

Az ES sejtek a hólyagcsíra belső sejtsomójából származó pluripotens sejtek, amelyek mindhárom csíralemez sejtjeit képesek kialakítani. A még be nem ágyazódott embrió fejlődésének egy rövid szakaszában léteznek ezek a sejtek, később parallel mitotikus osztódások során elveszítik pluripotenciájukat. A beágyazódás körüli szakaszban kinyert ES sejtek már nem rendelkeznek akkora fejlődési potenciállal.

Az egér ES sejtek kompakt kolóniákban növekednek, fenntartásukhoz szükség van LIF-re (leukemia inhibitory factor). A sejtek ugyanis expresszálják a LIF receptort (*Gp130*) és a *STAT3* foszforilálásával tartják fenn önmegújító képességüket és pluripotenciájukat (Williams és mtsai, 1988; Niwa és mtsai, 1998). Ezzel szemben a humán ES sejtek nem igényelnek LIF-et, viszont FGF-et és activint (Nodal) igen. Az egér ES sejtekkel szemben az enzimátikus passzálást nem bírják és könnyebben differenciálthatóak progenitorokká (Pera és Tam, 2010). A pluripotens ES sejtekre jellemző, hogy expresszálják a 4 legfontosabb transzkripciós faktort, az *Oct4*-et, a *Sox2*-t, a *KLF4*-et és a *Nanog*-ot, amelyek az őssejt állapot fenntartásához szükségesek. Ezek befolyásolják a *DPP3*, a *REX1* és a *GBX2* transzkripciós faktorok; az *SSEA1* (rágcsáló) és az *SSEA4* (ember) sejtfelszíni markerek, az *ABCG2* ABC transzporter valamint az alkalikus foszfatáz és telomeráz enzimek kifejeződését (Pera és Tam, 2010). Mindezen faktorok állandó egyensúlya tartja fenn az őssejt állapotot, bármelyiknek a mennyiségi változása a sejt elköteleződéséhez és differenciációjához vezethet. A pluripotencia további fontos *in vivo* kritériuma, hogy az ES sejt alkalmas legyen kiméra állatok



létrehozására (Buehr és mtsai, 2008). Az ES sejtek gyorsan osztódnak, ezért jelentős forrásai lehetnek az őssejt terápiának. A klinikai alkalmazáshoz a legfontosabb lépések a hatékony elköteleződés és differenciáció eléréséhez szükséges protokollok kidolgozása.

#### 1.1.1.2. A felnőtt őssejtek

Az AS sejtek az ES sejtek posztnatális leszármazottai, amelyek a szervezet egészében megtalálhatóak. Jelentős mennyiségben expresszálják *Oct4*-et, *KLF4*-et és *Sox2*-t, ABC transzportereket és alkalikus foszfatáz enzimet. A differenciálódott testi sejtekkel ellentétben expresszálják *E-cadherint*, vimentint és  *$\beta$ -catenint* is. Emellett rendelkeznek saját jellemző markerekkel is. Az ES sejtekhez hasonlóan az AS sejtek őssejt állapotát a bennük kifejeződő markerek egyensúlya biztosítja. Az AS sejteket számos szervben azonosították, az azonban még nem teljesen bizonyított, hogy vajon hány közös és hány szövet/szerv specifikus marker jellemzi őket. A felnőtt őssejtek egyik legjelentősebb csoportja a mesenchimális őssejtek (MS sejtek). A MS sejtek gondoskodnak a kötőszövet utánpótlásáról, fibroblaszt sejtek, zsírsejtek, kondrociták, oszteoblasztok, simaizom sejtek és esetleg vázizom szatellita sejtek keletkezhetnek belőlük. Számos markerrel jellemezhetőek, attól függően, hogy a szervezeten belül hol helyezkednek el. A csontvelői MS sejtek sajátja például a *CD271* és a *CD146* kifejezése (Jones és mtsai, 2002; Sacchetti és mtsai, 2007).

Az AS sejteket sokkal nehezebb vizsgálni, mint embrionális őseiket, hiszen az egyes szövetekben lassan vagy szinte egyáltalán nem osztódó állapotban vannak. Ezért az *in vitro* tenyésztés és kísérletek nehézkessé válnak, hiszen a sejtek képesek ugyan szimmetrikus osztódásra, de csak hosszú idő alatt (Cheshier és mtsai, 1999; Snippet és mtsai, 2010). A felnőtt őssejtek szérumban, de növekedési faktorok (LIF) és más hozzávalók (N2, B27, hormonok, retinoidok, inzulin, progeszteron, trijód-tironin és kortikoszteron) jelenlétében tarthatóak fenn. Erről a sejtcsoportról szerzett ismereteink ma még nagyon hiányosak, ami meghatározóan csökkenti a lehetséges felhasználási területeket.

### 1.1.1.3. Indukált pluripotens őssejtek

Az iPS sejtek olyan testi sejtek, amelyek már elköteleződtek és differenciálódtak, de megfelelő körülmények között visszaállították szélesebb fejlődési potenciáljukat.

Az először kidolgozott módszer a testi sejtek magjának átvitele volt. Egy differenciált sejt magját bejuttatják egy magjától megfosztott petesejtbe, amely minden szükséges „felszereléssel” rendelkezik, hogy a beültetett sejtmagot átprogramozza. Ezután lezajlik az embrionális fejlődés. Számos klónozott állatot hoztak létre e módszer segítségével, többek között Dollyt, a klónozott bárányt is (Wilmot és mtsai, 1997). Ezzel a módszerrel nagy mennyiségű őssejt nyerhető az esetleges terápiához és mivel a páciensből származik a testi sejt magja, elkerülhető az autoimmunitás. A módszer nagy hátránya, hogy sok metodikai hiányossággal rendelkezik és nem teljesen ismert a folyamat mögött levő molekuláris biológiai háttér. Az így létrehozott sejtekben a mitokondriumok a fogadó petesejtből származnak, nem ismertek az átprogramozás során ható epigenetikai útvonalak és emiatt nehéz a módszert optimalizálni és a jelenlegi kis hatékonyságot növelni. Ez az eljárás tehát jelenleg nagyon távol áll a humán alkalmazás lehetőségétől.

iPS sejtek nyerhetőek úgy is, hogy egy testi sejtet a megfelelő gének transzfekciójával programozunk át. Ez a négy gén az *Oct4*, a *KLF4*, a *Sox2* és a *cMYC*, amelyeket először egér fibroblaszt sejteken alkalmaztak sikeresen (Takahashi és Yamanaka, 2006). Az első humán iPS sejteket a *cMYC* helyett a *LIN28* gént felhasználva állították elő (Yu és mtsai, 2007; Takahashi és mtsai, 2007). Az elmúlt évek során számos kutatás célozta a módszer hatékonyságának növelését, a tumorkialakulásának csökkentését, a génbevitel egyszerűsítését és a keletkezett iPS sejtek heterogenitásának mérséklését. Mivel ezen a módon bármilyen testi sejtől őssejtekhez juthatunk, az iPS sejtek kiválóan alkalmasak ma még gyógyíthatatlan betegségek *in vitro* modelljének. A terápiás célok elérése még a jövő kutatásának feladata, mindenesetre az iPS sejtek nagy jelentősége abban áll, hogy kiválóan demonstrálják: a testi sejtek korábban visszafordíthatatlannak vélt differenciálódását vissza lehet fordítani.

#### 1.1.1.4. A tumorokban előforduló őssejtek

CS (cancer stem) sejteknek nevezzük azokat a tumorokban előforduló sejteket, amelyeknek tulajdonságai és markerei nagyban hasonlítanak az őssejtekéihez. A legtöbb ilyen sejt kisméretű, lassan osztódik, magas bennük az ABC transzporterek valamint más telomeráz és őssejt gének expressziója, amely tulajdonságok miatt nagymértékben ellenállnak a tumorokat célzó kemo-, illetve sugárterápiának. Az eredeti feltételezés szerint a CS sejtek megváltozott őssejtek, amelyek tumorossá váltak. Ezt a nézetet azonban nem sok tény támasztotta alá. Ma már inkább azt a hipotézist fogadjuk el, hogy a CS sejtek olyan rákos sejtek, amelyek felvettek számos, számukra előnyös őssejt tulajdonságot, csökkent *p53* expresszióval rendelkeznek és kialakítanak egy olyan niche-t, amely támogatja a fennmaradásukat (Borovski és mtsai, 2011).

#### 1.1.1.5. Őssejt terápia

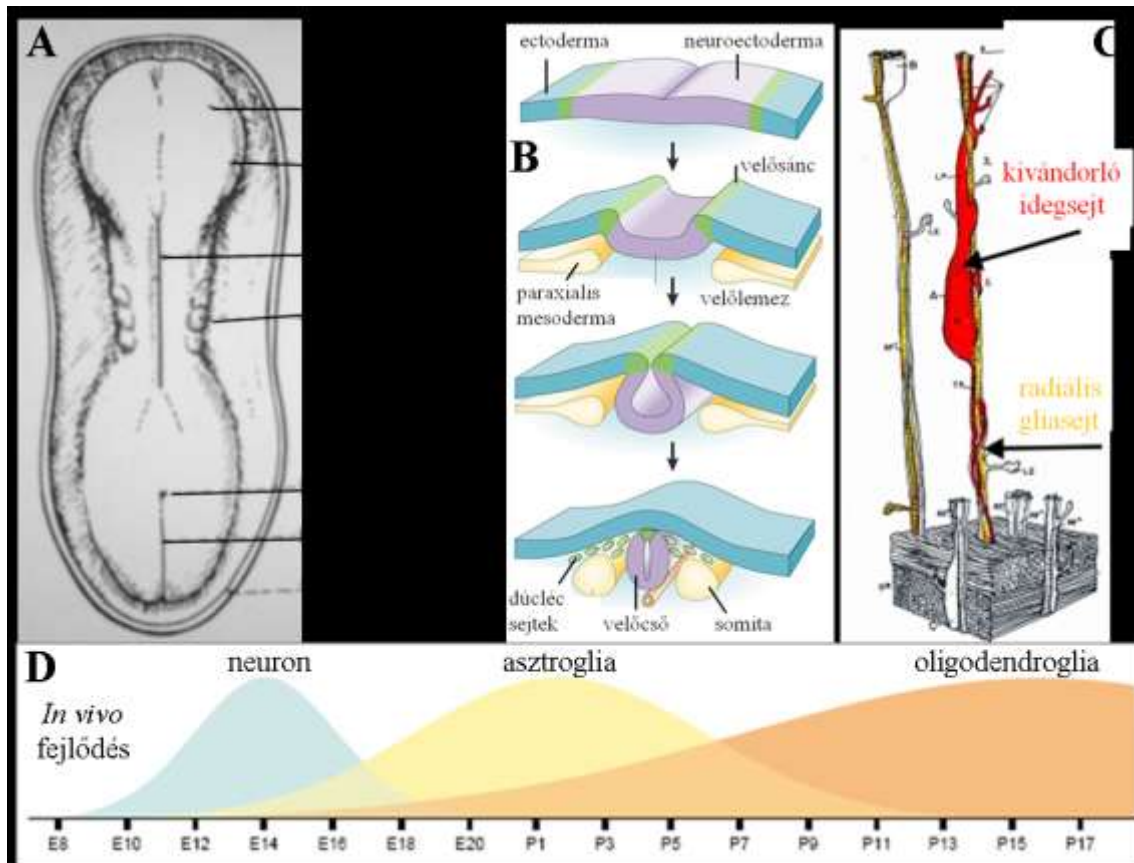
Napjainkban a legjobban vizsgált és az egyetlen rutinszerűen végzett őssejt terápia a csontvelőből származó őssejtek bejuttatása a szervezetbe. Ezzel a módszerrel pótolható a csontvelő és a belőle származó vérsejtek. A többi típusú őssejt beültetés egy része már klinikai fázisban van. Ilyen például az *in vitro* kialakított bőrfelületek átültetése a páciensek testére; vagy a cukorbetegség inzulin-termelő sejtjeinek pótlása. Számos vizsgálat célozza például az agyvérzés következtében elpusztult agyszövet regenerálását illetve gerincvelő sérüléseket követően az idegek helyreállítását, ezek azonban még nem használhatóak a mindennapi gyógyításban (Schwarz és Schwarz, 2010; Enciu és mtsai, 2011).

Az őssejt terápia hatékonyságának feltárásában nagyon fontos a megfelelő kontroll és a hosszútávú ellenőrzés. A sikeres terápiához nem elég az, hogy a beültetett sejtek túlélnek, osztódnak és ellátják a nekik szánt feladatokat. Meg kell szüntetni a károsító hatást is, hogy a regenerálódott sejtek, szövetek ne sérüljenek újra. Emellett lényeges szempont, hogy az osztódni képes őssejtek ne alakuljanak át tumorokká.

## 1.1.2. Idegi őssejtek

### *1.1.2.1. Idegsejtképződés a fejlődő idegrendszerben*

A rágsáló embrió idegrendszerének fejlődése a neuruláció (idegi irányú elköteleződés) folyamatával veszi kezdetét. E lépés során alakul ki a neurális indukció hatására az ektoderma telepéből a velőlemez. A fejlődés során a velőlemezből (2/A ábra) (neuroektoderma) alakul ki a központi idegrendszer két része, az agy és a gerincvelő. A neuroektoderma réteget gyorsan osztódó sejtek alkotják, amelyek önmagukkal azonos utódsejteket hoznak létre. A fejlődés során a neuroektoderma csővé zárul, kialakítva a velőcsövet (2/B ábra). Az addig lapos, egyetlen sejtréteget alkotó, epitél jellegű ektodermális sejtek alakja megnyúlik. Ezek a sejtek radiálisan orientáltak, átérlik a cső teljes falát, így kapcsolatban vannak a velőcső üregével és külső felszínével is. Ezek a sejtek kezdetben – hámszövetre jellemző módon – dezmoszómákkal kapcsolódnak egymáshoz, felszínükön E-cadherin található és bennük az intermedier filamentum a keratin. A velőcső záródása után eltűnnek a dezmoszómák (Aaku-Saraste és mtsai, 1996, 1997), felszínükön N-cadherin jelenik meg és a keratint felváltja a vimentin és a nestin (Rao és Mayer-Proschel, 1997; Schnitzer és mtsai, 1981; Cochard és Paulin, 1984; Oudega és Marani, 1991; Kriegstein és Götz, 2003). Ez a szerkezet lehetővé teszi, hogy a hosszúkás sejtek magjai a bazális és apikális felszín között vándoroljanak a sejt ciklusától függően. Ez a jelenség az interkinetikus magvándorlás (Sauer és Walker, 1959; Berry és Rogers, 1965). Mindez egy időben történik a velőcső záródásával (Stagaard és Mollgard, 1989; Viebahn és mtsai, 1995; Yang és mtsai, 1993). Ezután indul el az erek benövésének folyamata (Hemmati-Brivanlou és Melton, 1994).



**2. ábra:** Az idegrendszer fejlődésének főbb folyamatai. **A:** 20 napos emberi embrió felülnézeten. **B:** A velőcső záródásának folyamata (Gammill és Bronner-Fraser, 2003). **C:** Radiális gliasejt és a felszínén kivándorló idegsejt (Rakic, 1972). **D:** A neuronok, asztroglia sejtek és oligodendroglia sejtek keletkezésének idővonala. E: embrionális, P: posztnatális napok száma.

#### 1.1.2.2. A radiális glia

A velőcsőben megjelenik egyfajta koncentrikus tagolódás: az üreggel szomszédos, ventrikuláris rétegben főleg osztódó sejtek vannak, a külső, marginális rétegben a sejtek magmentes része található, a kettő között pedig a nem mitotikus sejtek sejttesteit figyelhetők meg. A velőcső sejtjei embrionális idegi őssejtek, amelyek – a velőcsőre eddig jellemző szimmetrikus mitózis mellett – aszimmetrikus mitózissal is osztódhatnak. Ennek következtében az utódsejtek közül csak az egyik lesz az anyasejttel megegyező őssejt, a másik differenciálódni fog. A radiális glia fenotípus az idegi őssejtek egyik jellegzetes állapota. Az embrionális neurogenesis időszakában az aszimmetrikus osztódással idegsejt-előalakokat és támasztó sejteket biztosít, amelyek segítik az előalakok kivándorlását (2/C ábra). Ezek a kivándorló sejtek utódsejtjei

fogják majd kialakítani az intermedier zónát. A radiális gliasejtek tehát nemcsak irányítják az új neuronok vándorlását, hanem szülősejtjei is azoknak (Alvarez-Buylla és mtsai, 1988; 1990a; 1990b; 1995). Ezzel egyidőben a radiális neurepiteliális sejtek olyan markereket kezdenek expresszálni (*GLAST*, *BLBP*, *RC2*), amelyek megjelenése miatt ezeket a sejteket már radiális gliának tekintjük (Rakic, 1971). Ezek a sejtek kimerévített állapotban maradnak a velőcső falának két felszíne között és irányítják a posztmitótikusá vált idegsejt-előalakok kivándorlását. Az egyre nagyobb számú osztódás azt fogja eredményezni, hogy az elsődleges germinatív zóna kimerül. A felette levő rétegben azonban a sejtek egy része még osztódóképes, ezek alakítják ki a szubventrikuláris zónát, amely ezután a másodlagos neuron- és gliaképzést fogja biztosítani (Gressens és mtsai, 1992; Holmin és mtsai, 1997; Levison és Goldman, 1993; Zerlin és mtsai, 1995). A folyamat elején az idegsejtképzés van túlsúlyban, de ez folyamatosan átbillen az asztrogliá javára. Újabb adatok szerint a neuronképzés ezen a területen később sem tűnik el (Doetsch és mtsai, 1999a; Doetsch, 2003; Seri és mtsai, 2001).

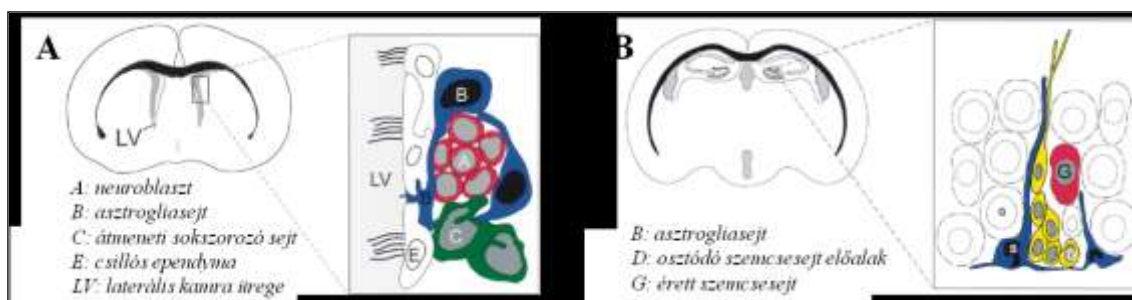
A primer neurogenesis végén befejezi működését a germinatív réteg, a radiális glia sorsa pedig a következőképpen alakulhat: asztrocitává, ependymasejtekké, neuron prekursorokká vagy a szubventrikuláris zóna őssejtjeivé válhatnak. A kamrafallal való kapcsolat elvesztésével megjelennek az asztrociták, amelyek aztán a parenchimában még többször képesek osztódni. Ezzel egy időben a vimentint felváltja az asztrogliára jellemző Gfap. Az asztrociták túlnyomó többsége a szubventrikuláris rétegben levő radiális glia eredetű asztrocita-prekursorokból származik. Ezek a sejtek a neuronok kialakulása után keletkeznek (2/D ábra) és vándorolnak a kifejlett agyra jellemző helyükre, esetleg specializálódva különböző feladatokra.

### *1.1.2.3. Felnőttkori neurogenesis*

Az embrionális fejlődés végén, a születés körül lezárul az idegsejtképződés fő szakasza (2/D ábra). A XX. század végéig általánosan elfogadott nézet volt, hogy a felnőttkori emlős idegrendszerben nem keletkeznek új idegsejtek. Az elmélet megdöntésére a '90-es évek elején került sor, amikor először izoláltak központi idegrendszerből olyan őssejteket, amelyek idegsejtekké is képesek voltak

differenciálódni (Reynolds és Weiss, 1992). A neurogenesis tehát a posztnatális időszakban is folytatódik. Az idegrendszer létrehozásában részt vevő pluripotens embrionális őssejtekhez hasonló sejtek a felnőtt emberi agyban is megtalálhatóak (Alvarez-Buylla és mtsai, 2002).

Az aktív őssejtek jelenléte az emlős posztnatális agyban két területen a legszembetűnőbb. Ez a két terület a hippocampus szubgranuláris zónája (SGZ) és a laterális kamra fala mentén található szubventrikuláris zóna (SVZ) (Doetsch, 2003, Alvarez-Buylla és Lim, 2004). Ezeket a területeket nevezzük neurogén zónáknak (3. ábra). Ezekben felnőttkorban is zajlik idegsejt képzés emlősökben és emberben egyaránt. Az SGZ-ben (3/B ábra) elhelyezkedő őssejtek a hippocampus granuláris rétegének szemcsesejtjeit pótolja a teljes élet során, míg az SVZ-ben (3/A ábra) keletkező új idegsejtek a rostrális migrációs ösvényen haladva érik el végső céljukat, a szaglógumót (Kornack és Rakic, 1999; 2001).



**3. ábra:** A felnőttkori neurogén régiók elhelyezkedése felnőtt egér agyban, sematikus rajz a szubventrikuláris (A) és a szubgranuláris (B) zónáról és az idegsejt képzésben részt vevő sejtekről. **A:** a rostrális migrációs ösvényen haladó neuroblasztokat (A) hüvelyszerűen veszik körül az asztroglia sejtek (B), amelyek ebben a régióban idegi őssejtként is viselkedhetnek és gyorsan osztódó köztes sokszorozó sejteket (C) hozhatnak létre. Ezek utódsejtjei a neuroblasztok, amelyek a szaglógumó felé vezető útjuk során válnak éretté. **B:** az SGZ asztroglia sejtjeinek (B) hosszú, radiális irányú nyúlványa van, amely mélyen behatol a szemcsesejt rétegébe. Ők hozzák létre azt az éretlen, osztódó sejt populációt (D) amelyből később érett szemcsesejtek (G) fognak kialakulni. (Alvarez-Buylla és mtsai, 2002)

Az SVZ és az SGZ területén kívül, más agyterületeken is előfordulhat neurogenesis. Ilyen régiók például a substantia nigra (Zhao és mtsai, 2003), a striatum, az amygdala (Bernier és mtsai, 2002) és az agykéreg (Gould és mtsai, 1999). Ezekben a területeken még kérdéses az új idegsejtek eredete és továbbra is sok kutatás célozza a további neurogén zónák feltárását.

Annak ellenére, hogy felnőttkorban is rendelkezik a szervezetünk az új idegsejtek képzésének a képességével, nem tudjuk pótolni a mechanikai sérülések és a degeneratív betegségek során elpusztult idegsejteket és idegi funkciókat. Ennek magyarázata lehet, hogy a felnőtt agy bonyolult szerkezetébe nehéz lenne új sejteket integrálni, a szöveti környezet már messze nem ugyanaz, mint ami az egyedfejlődés során lehetővé tette a gyors proliferációt, migrációt és szinapszis képzést, valamint elképzelhető, hogy a felnőttkori idegi őssejtek már nem rendelkeznek akkora osztódási kapacitással, mint embrionális elődeik.

#### *1.1.2.4. Asztroglia típusú sejtek szerepe az idegsejtképződésben*

A korai neonatális és felnőtt emlősgyban az új idegsejtek, amelyek az SVZ-ben keletkeznek, a szaglóhagymába vándorolva interneuronokká érnek (Imayoshi és mtsai, 2008). Az SVZ-ben levő B sejtek (3/A ábra) idegi őssejtként viselkednek és gyorsan osztódó köztes sokszorozó sejteket (3/A ábra) hoznak létre. Az őssejteket jellemző tulajdonságokkal szemben ezek a sejtek ultrastrukturális jellemzésük és markereik (Gfap, GLAST, és más glia markerek) (Doetsch és mtsai, 1997; Colak és mtsai, 2008; Platel és mtsai, 2008) alapján asztroglia-sejtekként azonosíthatóak. Az utóbbi évek vizsgálatai (Holland és Varmus, 1998; Doetsch és mtsai, 1999a; 1999b) bizonyították, hogy az SVZ idegi őssejtjei az itt megtalálható, differenciálódott asztroglia-sejtek egy populációja. A B sejtek és köztes sokszorozó sejtek közelében erek találhatóak (Shen és mtsai, 2008; Tavazoie és mtsai, 2008), amelyek felé a B sejtek gyakran nyújtanak tangenciális nyúlványokat és borítják végtalpakkal a felszínét (Mirzadeh és mtsai, 2008). Ez arra enged következtetni, hogy a keringésből származó faktorok komoly részt vállalnak az itt zajló neurogenesis szabályozásában. Az SVZ primer progenitorainak azonosítása nem lehetséges egyetlen markerrel, csak bizonyos őssejtekre jellemző markerek kombinációjával (Gfap, GLAST, nestin és Sox2).

A másik jelentős felnőttkori neurogén zóna a hippocampus gyurus dentatusában levő SGZ. Ez a régió kétféle osztódó sejtípust tartalmaz: asztrocitákat és egy sötétten festődő, kis bazofil maggal rendelkező sejtpopulációt (D sejtek, 3/B ábra) (Altman és Das 1965, Kaplan és Hinds, 1977; Cameron és mtsai, 1993; Palmer és mtsai, 2000). Ezeknek az asztrocitáknak hosszú, radiális irányú nyúlványa van, amely mélyen behatol



a szemcsesejtek rétegébe. Az SVZ-hez hasonlóan az itt újonnan keletkező idegsejtek prekuzoraiként funkcionálnak (Seri és mtsai, 2001; Fukuda és mtsai, 2003; Garcia és mtsai, 2004; Steiner és mtsai, 2004). Ezek a sejtek – szemben a többi, csak Gfap-t expresszáló asztrogliaival – Gfap-t és nestint is kifejeznek (Seri és mtsai, 2004; Steiner és mtsai, 2006). Az SVZ-hez hasonlóan az SGZ is egy kiterjedt vaszkuláris „niche” mellett helyezkedik el szorosan (Palmer és mtsai, 2000), azt sugallva, hogy az erekből származó faktorok hatással vannak az idegi őssejtek viselkedésére. A radiális nyúlvánnyal rendelkező asztrociták nem képeznek közvetlenül idegsejteket, hanem először osztódó szemcsesejt előalakok populációját hozzák létre (D sejtek, 2/B ábra) (Seri és mtsai, 2004), amelyek aztán az érés során a helyükre vándorolnak és szemcsesejteké érnek. Ezek a radiális nyúlvánnyal rendelkező asztrogliaisejtek Gfap, nestin (Seri és mtsai, 2004) és Sox2 (Suh és mtsai, 2007) immun-pozitívak. Az SGZ-ben zajló neurogenezist sokféle fiziológiai és környezeti hatás szabályozza, például mellékvese szteroidok (Gould és mtsai, 1992; Cameron és mtsai, 1998), a glutamát receptor aktivációja (Gould és mtsai, 1994), gyulladás (Monje és mtsai, 2003) és antidepresszánsok (Santarelli és mtsai, 2003).

Az asztrogliaisejtek egyes szubpopulációi tehát képesek idegi őssejtként viselkedni és – lokalizációtól illetve fejlődési állapottól függően – létrehozni neuronok és asztrogliaisejtek különböző típusait (Morrens és mtsai, 2012). Ez az új nézet eltávolodik a klasszikus elmélettől, amely szerint a gliális és neuronális sejtek eredete egymástól szeparált.

### 1.1.3. Az idegi őssejtek környezete

A fejlődés egyes szakaszaiban az idegi őssejtek környezete állandóan változik. Az őssejtek két legfontosabb tulajdonsága, hogy multipotensek és képesek az önmegújításra. A speciális mikrokörnyezet vagy niche segíti ezeknek a tulajdonságoknak a megtartását (Spradling és mtsai, 2001; Fuchs és mtsai, 2004). Az őssejtek maguk is részt vesznek benne és alakítják a környezetüket, amely természetesen egy roppant dinamikus struktúra. A niche-ben fontos szerepe van a sejt-sejt interakcióknak és a diffúzibilis szignáloknak, amelyek kulcselemei az őssejt aktiváció és differenciáció valamint az őssejtállapot fenntartásának. Számos őssejt niche

közös tulajdonsága a szoros kapcsolat az endotél sejtekkel, amelyek szintén rendelkeznek szabályozó szereppel (Goldman és Chen, 2011). A niche-en belül az őssejtek gyakran kapcsolódnak közvetlenül a lamina basalishoz, amely a sejtosztódás orientációjában segít. Emellett szabályozza a növekedési faktorok és más szignálok hozzáférhetőségét, mint például az extracelluláris mátrix molekulák vagy a glikoproteinek által kikötött faktorokét. Mint az már a korábbi fejezetekből is kiderült, az idegi őssejtek mikrokörnyezetének egyik legmeghatározóbb elemei az asztrogliasejtek. A továbbiakban egy rövid áttekintést nyújtok ezekről a sejtekről.

### *1.1.3.1. Az asztrogliasejtek jellemzése*

Az idegrendszer idegsejtek közötti állományát Rudolf Virchow tanulmányozta először részletesen, és ő nevezte el az így talált sejteket neurogliának. A név a görög „glue” szóból ered, ami enyvet jelent. Ebből a névből kiderül, hogy Virchow ezeket a sejteket pusztán kötő, támasztó és térkitöltő elemeknek tekintette. Csak a mikroszkópia és a neurohisztológia nagyfokú fejlődése tette lehetővé, hogy a gliát ne pusztán „idegrendszeri kötőszövetként” tartsák számon. Ezután lett ez a felfogás végképp a múlté és lépett helyébe az a nézet, amely szerint a gliasejtek ugyanolyan, teljes jogú részei az idegrendszernek, mint az idegsejtek. Egyes gliasejtek mielinhüvelyt képeznek (oligodendroglia) a neuronok axonjai köré, mások az agy belső környezetét szabályozzák, mint például a szinapszisok közvetlen környezetét vagy az ion- és folyadék homeosztázist, vannak, amelyek a sérülések után heget képezve (reaktív glia) óvják az agy szövetét a további károsodásoktól, és vannak olyan glia-szubpopulációk, amelyek őssejtként viselkedve új idegsejteket hozhatnak létre a felnőtt agyban. A gliasejteknek fontos szerepe van az idegsejtek létrehozásában a fejlődés során (radiális glia), az ideghálózat fejlődésében, a szinaptikus transzmisszióban (háromtagú szinapszis), az agy határfelületeinek lezárásában (glia limitans), a vér-agy gát kialakításában, a toxikus anyagok eltávolításában. Számos neurotranszmitter és hormon receptorral rendelkeznek és számos neurotranszmitter és hormon előalakot szolgáltatnak az idegsejteknek. Mindez csak egy apró szelete mindannak, amivel a glia név mögött megbújó számos sejtípus hozzájárul az idegrendszer hibátlan működéséhez.

Az asztroglia a legnagyobb számú és a legdiverzebb tagja a glia csoportnak; a központi idegrendszerben és származékaiban fordul elő. Az evolúciós fejlődés során a neuron/glia arány egyre inkább a gliasejtek javára változik (Kettenmann és Verkhratsky, 2011). Egymással számos „gap junction” kapcsolaton keresztül kommunikálnak, létrehozva egy a teljes idegrendszerre kiterjedő, funkcionális syncytiumot.

Glia	Asztroglia	Asztrociták
		Radiális gliasejtek
		Glia limitans
		Bergmann-glia
		Pericelluláris asztrociták
		Perikapilláris glia
		Periszinaptikus glia
		Perinodális glia
		Taniciták
		Müller-glia
		Pituiciták
		A corpus pineale gliasejtjei
		Az adenohipofízis csillagsejtjei
		Enterális gliasejtek
	Oligodendroglia	Oligodendrociták
		Szatellitasejtek
		NG2-gliasejtek
		ONEC (olfactory nerve ensheathing cells)
		Schwann-sejtek
	Mikroglia	Rezidens mikroglia
	Ependyma	Ependymociták
		Az ependymaszervek sejtjei
		A choroid plexus hámja

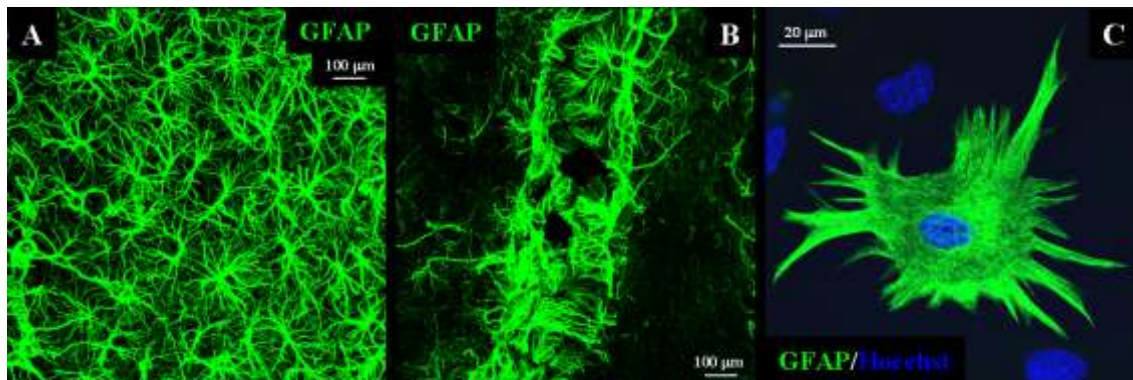
1. táblázat: A glia sejtípusai

### 1.1.3.2. Az asztrogliasejtek típusai

Eddigi ismereteink alapján a glia cseppet sem egységes populációját a következő négy fő csoportra oszthatjuk funkcionális és strukturális megfontolások alapján: asztroglia, oligodendroglia, mikroglia és ependyma (1. táblázat). E sejtípusok közül a továbbiakban az asztroglia típusú sejtek jellemzését mutatom be.

### *Asztrociták*

A központi idegrendszerben mindenütt megtalálható, csillag alakú sejtek, rengeteg elágazó nyúlvánnyal (4/A ábra). Sima, vastag körvonalú sejtmaggal rendelkeznek a belső maghártyalemezhez tapadó kromatin miatt, feltűnő, excentrikus magvacskájuk van és organellumszegény citoplazmájuk. Az asztrocitáknak neurohisztológiai szempontból két típusa van: a rostos és a plazmás. A rostos asztrociták elsősorban a fehér állományban fellelhetőek, nyúlványaikat az idegrostok között találjuk. Ezek a nyúlványok hosszúak, vékonyak, sima felszínűek és nincs sok elágazásuk. A plazmás asztrociták főleg a szürke állományban helyezkednek el, ahol nyúlványaik az idegsejtek sejttestei között figyelhetőek meg. Nyúlványaik rövidebbek, vastagabbak és több elágazásuk van, mint a rostos asztrociták nyúlványainak (Marin-Padilla, 1995). A Gfap expressziója egyes agyterületeken állandó, másokban funkciófüggő módon jelenik meg.



**4. ábra:** GFAP-val jelölt asztroglia sejtek. **A:** Asztroglia sejtek 21 napos patkány hippocampusában. **B:** Agyi eret körülölelő asztroglia sejtek 21 napos patkány előagyában. **C:** Tenyésztett asztroglia sejt, 2 napos egérből származó primer tenyészetben. (Konfokális mikroszkópos felvételek.)

#### *1.1.3.3. Asztrocita markerek*

##### *Gfap (gliális fibrilláris savas fehérje) (4. ábra)*

A Gfap egy 48 kD tömegű, intermedier filamentumhoz kötött fehérje, ami kizárólag az érett asztroglia sejtekre jellemző, ezért e sejtípus alapvető markerének tekintjük (Bignami és mtsai, 1972; Dahl és mtsai, 1986; Eng, 1985). Azokat az idegrendszeri elemeket, amelyek bizonyos ingerek hatására Gfap-t képesek expresszálni, vagy az ilyen sejtek elkötelezett előalakjai, az asztrogliahoz sorolhatjuk. Nem fordul elő például az érett oligodendrogliaiban, csak az O-2A progenitorsejtjében, amiből akár még asztrocita is kialakulhat (Cameron és Rakic, 1991; Raff és Miller,

1984; Raff és mtsai, 1983). A Gfap segít megtartani a sejtalakot és a sejtmembránhoz kapcsolódik a sejt-sejt kapcsolatok és a sejt-extracelluláris mátrix adhéziós pontjainál. Mint minden más intermedier filamentum, a Gfap is monomerekből épül fel, ami három különböző doménnel rendelkezik (fej, nyak, fark). A C-terminális farki rész a más fehérjékkel való kapcsolódásért felelős, az N-terminális feji rész pedig a filamentumok tetramerekből történő felépüléséért. Ahhoz, hogy hálózatot építsenek, a monomerek először dimereket alkotnak, a dimerek tetramerekké állnak össze, amelyek a filamentumok alapegységei. A Gfap képes a vimentinnel hibrid polimereket létrehozni; ez a kevert filamentum a fiatal sejtekre jellemző. A központi idegrendszerben főleg az  $\alpha$ -Gfap altípus található, míg a periférián inkább a  $\beta$ -Gfap van többségben (Zelenika és mtsai, 1995). A Gfap eloszlása az agyban nem egyenletes (Hajós és Kálmán, 1989; Kálmán és Hajós, 1989; Ludwin és mtsai, 1976; Zilles és mtsai, 1991) vannak olyan területek ahol szinte teljesen hiányzik, mint például az agykéreg középső rétegeiben (Patel és mtsai, 1985). Ezeken a területeken azonban sérülések hatására megjelenhet a reaktív gliasejtekben (Bignami és Dahl, 1976).

#### *Glutamin szintetáz*

A glutamin szintetáz enzimnek fontos szerepe van az ammónia detoxifikációjában, a sav-bázis homeosztázisban és a sejtek közötti jelátvitelben. Működése során glutamátból és ammóniából hoz létre glutamint. A glutamin szintetáz specifikus markere a gerinces idegszövet asztroglia-sejtjeinek (Martinez-Hernandez és mtsai, 1977; Norenberg, 1979, 1983; Linser, 1985; Patel és mtsai, 1985).

#### *S-100 $\beta$ protein*

Az S-100 fehérjék kis molekulásúlyú fehérjék, amelyek hélix-loop-hélix konformációjában két kalciumkötő hely van. Legkevesebb 21 különböző típusa van, amelyek közül az  $\alpha$  és  $\beta$  a leggyakoribb. Az S-100 $\beta$  protein feladata az asztroglia-sejtek kalcium szintjének regulálása. A Gfap filament feji doménjéhez kapcsolódik és szabályozza annak felépülését és lebomlását. Így használható markere az asztroglia-nak (Ludwin és mtsai, 1976), bár jelenlétét leírták más sejtekben is (Hachem és mtsai, 2005).

*További markerek:*

Szintén jellegzetes, markerként használható fehérjék a *glutamát traszporterek* (GLAST) (Rothstein és mtsai, 1994) illetve a „gap junction” konnexonjait felépítő konnexin fehérjék közül a gliaspecifikus 43-as típus (Rohlmann és mtsai, 1993). A Gfap-n kívül az asztroglia sejtek tartalmazhatnak intermedier filamentumként vimentint és nestint is. A vimentin a fejlődő sejtekben van jelen, például a radiális gliában, érett agyszövetben csak sérülés hatására jelenik meg (Dahl és mtsai, 1982; Janeczko, 1993). A nestin a neuroepiteliális eredetű sejtek éretlen formáinak intermedier filamentuma (Lendahl és mtsai, 1990; Levison és Goldman, 1993; Rao, 1999). Éretlen asztrocitákban fordulhat elő, például radiális gliában (Hockfield és McKay, 1985) és glia előalakokban (Rao és Mayer-Proschel, 1997). valamint a reaktív gliában szintén megjelenhet (Clarke és mtsai, 1994; Frisén és mtsai, 1995).

#### *1.1.3.4. A reaktív gliózis*

A reaktív gliózis az asztroglia sejtek univerzális válaszreakciója az agy sérülésére. Reaktív gliózis történik a vaszkuláris, traumás és degeneratív károsodás következtében. Ez tulajdonképpen egy „sebgyógyulási” folyamat, amely az idegszövet speciális tulajdonságai miatt lényegesen eltér a szervezet más részein lezajló folyamatoktól. Mivel az agyban nincsenek jelen azok a sejtípusok és fehérjék, amelyek a normál sérüléseknél fontos szerepet kapnak, ezt a funkciót az asztroglia látja el. A reaktív glia segít az elhalt szövet eltávolításában, majd egy szöveti heg alakul ki, amely elhatárolja a még érintetlen területeket és kitölti az elpusztult szövet helyét. Széles körben elfogadott tény, hogy a kialakuló gliaheg megakadályozza az idegrendszer regenerációját, például ezen keresztül nem alakulhatnak ki újabb kapcsolatok az idegsejtek között (Huszti és Kálmán, 2008). Azt a jelenséget, hogy az axonok növekedési kúpjai nem haladnak tovább ezen a területen, már Ramon y Cajal is leírta. A gliareakció megfigyelhető az agyi transzplantátumok körül is és feltételezhetően befolyásolja annak integrációját az agyszövetbe. Fontos azonban megemlíteni, hogy a reakcióért nem kizárólag a glia a felelős. Ma már szaporodnak azok az adatok is, amelyek bizonyítják, hogy a reaktív gliózisnak a gátlás mellett neuroprotektív hatása is van és szerepe lehet a regeneráció egyes részeiben is. A reaktív gliasejtek intenzív anyagcserével rendelkeznek és számos

éretlen glia tulajdossággal rendelkeznek. A reakcióért felelős asztroglia-sejtek származhatnak az érett, helyi populációból és ezek utódsejtjeiből, illetve a távolabbi területekről idevándorló sejtekből. Emellett számos tanulmány támasztja alá azt a lehetőséget is, hogy az agyi parenchimában megmaradó előalakokból vagy őssejtekből származnak (Levinson és Goldman, 1997).

## **1.2. Neuronális differenciációt szabályozó faktorok**

Az idegrendszer komplex szerkezetének kialakításához számos összehangolt genetikai utasításra, nagyszámú pontosan szabályozott faktor jelenlétére és precíz időzítésre van szükség. Az eredmény pedig sejtek milliárdjainak tökéletesen felépített, kiterjedt hálózata. Az idegsejtek képzése szerteágazó, bonyolult folyamatok sorozata, beleértve a sejtosztódást, sejtors-választást, differenciációt, érést, sejt-vándorlást és az új sejtek funkcionális integrációját.

### **1.2.1. Általános jellemzés**

Az idegsejtképződés első lépése a fejlődés során, a primer germinatív zónában megtalálható sejtek idegi irányú elköteleződése a pre-neurális gének hatására. Ezután a velőcsőben aszimmetrikusan osztódó sejtek jelennek meg. Az aszimmetrikus osztódásnak köszönhetően az utódsejtekben eltérően fognak eloszlani a génexpressziót szabályozó faktorok, így az anyasejtől eltérő tulajdonságokkal rendelkező utódok alakulhatnak ki. Ezekben a sejtekben teljesen más génexpressziós mintázat jön létre, így másféle sejt-típusok születnek, többek között olyanok, amelyek az idegsejtté válás sokrétű folyamatainak mennek majd keresztül. Az idegsejt fenotípus kialakulásának feltétele, hogy a pro-neurális gének aktiválódjanak.

A keletkező idegsejtek differenciációjának szabályozásában az egyik legfontosabb szabályozó elemek a basic helix-loop-helix (*bHLH*) transzkripciós faktorok. Az elköteleződés kezdete után a megnövekszik a proneurális *bHLH* transzkripciós faktorok (*Mash1*, *Ngn1* és *Ngn2*) expressziója. Ezek további faktorok kifejeződését segítik elő, így például a *Math2* és a *NeuroD* (szintén *bHLH* transzkripciós faktorok) expresszióját,

amelyek hozzájárulnak azon gének kifejeződéséhez, amelyek az idegsejt tulajdonságokat fogják meghatározni (Kageyama és Nakanishi, 1997).

Az idegsejtek keletkezése mellett az összejt állapot fenntartását is biztosítani kell. Ezt a megfelelő szabályozó faktorok eloszlása és aránya határozza meg. Az idegsejtek képződésének szabályozása mellett például a Notch-Delta útvonal segíti a differenciálatlan idegi összejtek fennmaradását is. Emellett elősegíti a makrofág irányú differenciáció szabályozását is (Ross és mtsai, 2003). A számos egyéb, időben és regionálisan eltérő hatás szabályozza az idegsejt irányú differenciáció mellett a progenitor populáció fennmaradását és más idegi sejtípusok keletkezését. A differenciációt elősegítő és szabályozó szignálok között van a retinsav is, amelyet a továbbiakban részletesen tárgyalok.

## 1.2.2. Retinoidok

### *1.2.2.1. A retinoidok általános jellemzése*

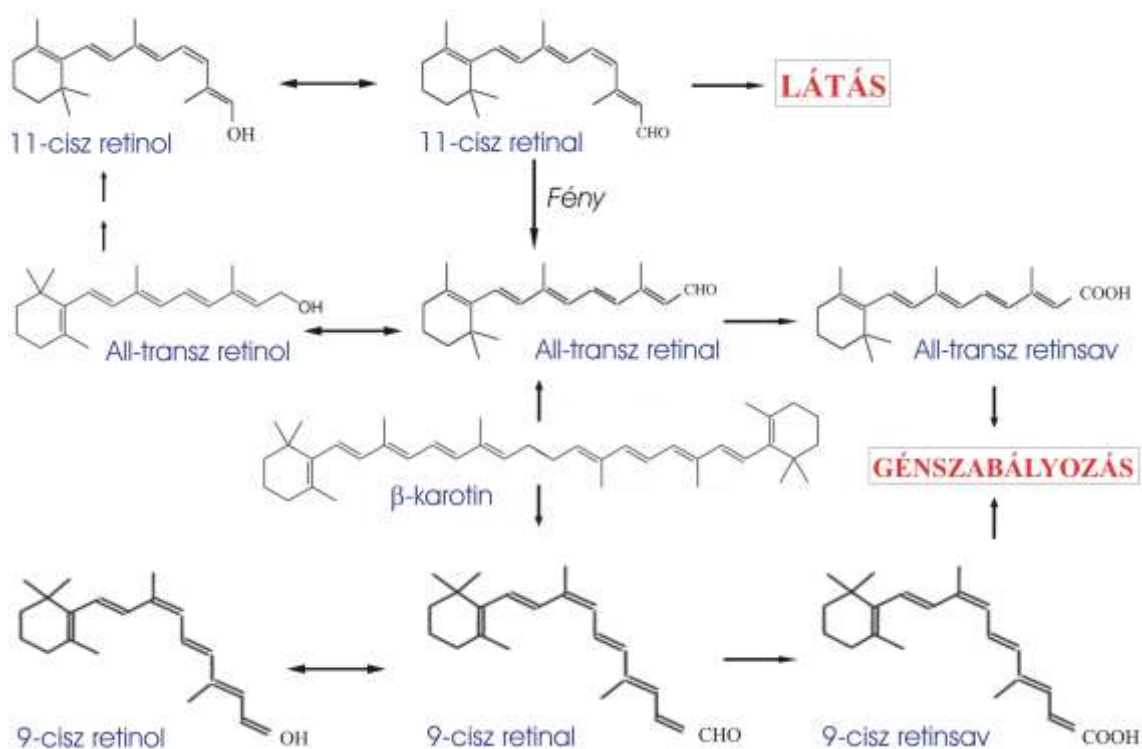
Az A vitamint a 20. század elején fedezték fel, mint az étrend egyik fontos komponensét. Az A vitamin a zsírban oldódó vitaminok családjába tartozik, szerepet játszik a látásban, a fejlődésben, a növekedésben és a szaporodásban. Az A vitamin a szervezetben antioxidánsként is hat, védelmező vegyületként, ami csökkenti a rák kockázatát (Blomhoff, 1994). Számos *in vitro* és *in vivo* eredmény bizonyítja, hogy képes a karcinogenezist megelőzni, gátolni és visszafordítani (Sporn és Newton, 1979; Goodman és mtsai, 2008; Fritz és mtsai, 2011). Hatásainak egy részét (metabolitjain keresztül) hormonszerű módon fejt ki. Az A vitamint és származékait együttesen retinoidoknak nevezzük.

A retinoidoknak a szervezet számos folyamatában van lényeges szerepük, például a retina fényérzékenységét biztosító rodopszin felépítésében és az éjszakai látásban, a normális csont és fog fejlődésben, a szaporodásban valamint az egészséges bőr és nyálkahártya megőrzésében (Evans, 1928; Harris és Navia, 1986; Sant'Anna és Tosello, 2006; Mora, 2008). A retinoidok szabályozzák számos gén átíródását: részt vesznek az immunrendszer fejlődésében, az immunsejtek differenciációjában és működésében, befolyásolják mind az öröklött mind a szerzett immunitást. Fontos szerepet játszanak a



nyálkahártya epitélium sejtjeinek differenciálódásában és ezek barrier funkciójának kialakításában (Mucida és mtsai, 2009), valamint számos más sejtípus osztódását és differenciációját regulálják.

A szervezet a retinoidokhoz a táplálék útján juthat hozzá. Az állati eredetű táplálék a retinoidokat retinil-észter (RE) formában tartalmazza, amelynek hidrolízisével retinol (RoI) keletkezik. A növényi eredetű táplálékban az A vitamin pro-formái találhatóak, a karotinoidok, mint például a  $\beta$ -karotin. A táplálékkal bevitt retinoidok gyakorlatilag azonnal felszívódnak a gyomor-bél traktusból. A szervezet legfőbb retinoid raktára a máj és a zsírszövet, ahol a tárolás a biológiailag inaktív retinil-észter formájában történik (Blaner és Olson, 1994; Vogel és mtsai, 1999a; 1999b).



**5. ábra:** A szervezetben leggyakrabban előforduló retinoid izomerek szerkezete és egymásba való alakíthatósága. (Gregg Duester, 2000 nyomán)

A retinoidoknak számos geometriai izomerje létezik (5. ábra), köszönhetően a cisz- és transz konfigurációnak, amely a polién lánc 5 kettős kötése közül négyen variálhat. A cisz izomer forma kevésbé stabil és könnyedén átalakul az all-transz elrendeződésbe. Ennek ellenére számos cisz izomer megtalálható a természetben, amelyek esszenciális feladatokat látnak el. A 11-cisz retinal (5. ábra) a fény abszorpciójában szerepel, a látás

folyamata során gerinces és gerinctelen állatokban egyaránt (Pepe és mtsai, 1987; Applebury és Hargrave, 1986). Az all-transz retinsav (RA) és a 9-cisz retinsav (5. ábra) magi receptorok ligandjaként működik és szabályozza számos gén átíródását, elsősorban a gerinces élőlényekben (Shimeld, 1996; Kawamura és mtsai, 1993).

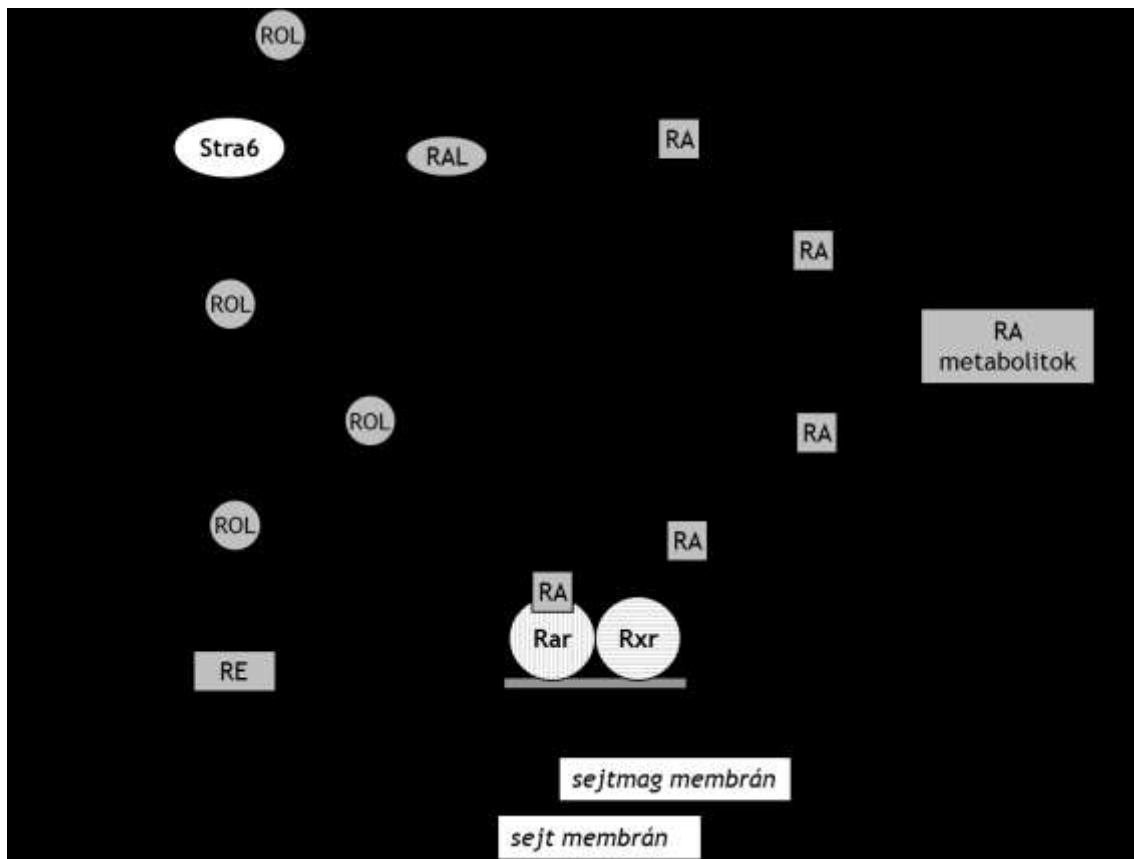
A retinoidoknak esszenciális szerepük van a normális szöveti- és szervfejlődésben az embriogenezis során (Hofmann és Eichele, 1994). Olyan folyamatokban vesznek részt, mint az anterior-poszterior testtengely kialakítása, a velőléc sejtek leválásának és migrációjának segítése, a szem- és orr telepek kialakulásának segítése, a végtagok kezdeményeinek kialakítása, egyes szervtelepek organizálása, valamint a felnőttkori differenciációs folyamatok fenntartása. (De Luca és mtsai, 1995; 1997; Gudas és mtsai, 1994; 2011). Fontosságukat igazolja a komoly érdeklődés a retinoid család tagjai iránt a biológiai és orvosi kutatásokban. Bármilyen zavar – akár hipo- akár hiper A vitaminózis - a retinoidok metabolizmusában vagy mennyiségében, súlyos elváltozásokhoz vezet a fejlődés során (Cohlan, 1953, 1954; Giroud és Martinet, 1955; Ross és mtsai, 2000; Maden, 2002; Olson és Mello, 2010; Imdad és mtsai, 2011).

#### *1.2.2.2. A retinoidok metabolizmusa*

Számos nem-vizuális funkció betöltését nem maga az A vitamin végzi, hanem egyik biológiailag aktív származéka, az all-transz retinsav. A retinoidok közül a retinsavnak van a legösszetettebb szerepe a biológiai rendszerek széles skáláján és ezért az A vitamin származékok közül ez a leginkább kutatott tagja a csoportnak.

A táplálékkal a szervezetbe juttatott retinil-észterek még a bél üregében retinollá hidrolizálnak (Napoli, 1996a), majd az emésztőrendszerből az enterociták veszik fel, újra észterifikálják és a szállításhoz chylomicronokba csomagolják (Blomhoff és mtsai, 1991). A táplálékkal bejuttatott A vitamin nagy részét (~75%) a hepatociták veszik fel (Gottesman és mtsai, 2001), a sejten belül a retinil-észter újra retinollá hidrolizál, ami vagy szekretálódik, vagy a máj csillagsejtjeibe kerül ahol retinil-észter formájában raktározódik (Ross és Zolfaghari, 2004). A májon kívül a tüdő (Chytil, 1992; Shenai és Chytil, 1990; Nagy és mtsai, 1997; Zolfaghari és Ross, 2002) és a zsírszövet (Tsutsumi és mtsai, 1992; Blaner és Olson, 1994) is nagyon fontos retinol raktározó szerv.

Szükség esetén ezekből a raktárból szabadul fel a retinol és kerül a vérkeringéssel a megfelelő szövetekbe. A máj retinol kötő fehérjét (Rbp4) szintetizál és a retinol az Rbp4-hez kötve szekretálódik a keringésbe. A vérben a retinol-Rbp4 kettőse a transthyretinhez (Ttr) kötődik, amellyel komplexet alkotva szállítódnak (Goodman, 2006; Sharif és mtsai, 2009).



**6. ábra:** A retinsav szintézisének és hatásmechanizmusának útvonala. Rövidítések: RE: retinil-észter, RAL: retinaldehid, ROL: retinol, RA: retinsav, Rbp4: retinol kötő fehérje 4, Stra6: ROL/Rbp4 komplex sejtfelszíni receptora, Crbp: celluláris retinol kötő fehérje, Crabp: celluláris retinsav kötő fehérje, Adh: alkohol dehidrogenáz, Rdh: retinol dehidrogenáz, Raldh: retinaldehid dehidrogenáz, Reh: retinil-észter hidroláz, Lrat: lecitin retinol aciltranszferáz, Rar: retinsav receptor, Rxr: retinoid X receptor, Cyp26: citokróom P450 enzim család

#### *Az A vitamin felvétele a sejtekbe*

A sejtek retinol felvétele diffúzióval vagy az újonnan felfedezett specifikus, sejtfelszíni Rbp4 receptoron keresztül, a Stra6 receptor segítségével történik (6. ábra). A Stra6 nagy affinitással köti az Rbp4-et és közvetíti az A vitamin felvételét az A vitamin-Rbp4-Ttr komplexből (Kawaguchi és mtsai, 2007). A Stra6 azokban a sejtekben,

szövetekben expresszálódik, amelyeknek valamely funkciója A vitaminfüggő. A Stra6 elsődleges, de nem kizárólagos előfordulási helye a vér/szerv gátaknál van, így a vér/retina gátnál, a vér/agy gátnál és az anya/magzat határfelületen (Bouillet és mtsai, 1997; Kawaguchi és mtsai, 2007). Nagy mennyiségben van jelen például a retina pigment epitélium sejtjeinek bazolaterális membránjában, amelyen keresztül a sejtek a keringésből felveszik a retinolt (Bok és Heller, 1976). Jelentős mennyiségben fordul elő a placentában, ahol esszenciális szerepe van az embrionális fejlődéshez szükséges A vitamin főtális abszorpciójában (Quadro és mtsai, 2005). A Stra6 agyban való megjelenése mutatja, hogy az A vitaminnak mely agyterületeken van szerepe az idegi funkciókban (Drager, 2006; Maden, 2007). Ez egybevág azokkal az új eredményekkel, amelyek szerint befolyásolja például az idegsejt képzést (Siegenthaler és mtsai, 2009) és a szinaptikus jelátvitelt (Chen és mtsai, 2008; Aoto és mtsai, 2008). Számos humán és állati tanulmány bizonyítja, hogy a Stra6 funkcióvesztése több szervben is elváltozásokat okoz (Isken és mtsai, 2008; Pasutto és mtsai, 2007; Golzio és mtsai, 2007). A Stra6 receptor 9 transzmembrán doménnel rendelkezik (Kawaguchi és mtsai, 2008), nem mutat homológiát az eddig ismert más membrán receptorokkal, transzporterekkel vagy csatornákkal és működése azok működési mechanizmusaira sem hasonlít. A felvételi folyamat nagyon specifikus és nem energia igényes (Kawaguchi és mtsai, 2007).

#### *Intracelluláris retinol kötés*

A retinol a sejten belül hozzáköt a Crbp (cellular retinol binding protein) fehérjékhez (6. ábra), amelyek – a Crabp fehérjékkel együtt (lásd később) – a zsírsavkötő fehérjék szupercsaládjába tartoznak. A CrbpI széles körben expresszálódik a szervezetben, segíti a retinol felvételét és irányítja a retinol sejten belüli átalakításait (Ong és mtsai, 1994; Napoli, 1996b; Vogel és mtsai, 1999b). Ezzel szemben a CrbpII csak a bél enterocitáinak villusaiban termelődik és a retinil-észterre történő átalakítást irányítja a chylomicronos szállításhoz (Ong és mtsai, 1994). Ezen kívül két másik Crbp is ismert, a CrbpIII és a CrbpIV, amelyeket egérben és emberben is leírtak már, de a funkciójuk még nem teljesen tisztázott (Vogel és mtsai, 2001; Folli és mtsai, 2001; 2002).

### *A retinoidok raktározása a sejtekben*

A retinol sejten belüli sorsának egyik lehetséges útvonala, hogy a sejtek saját raktáraikban tárolják, észter formában. Az észter forma kialakítását az Lrat (lecithin: retinol acyltransferase) és az Arat (acyl-CoA: retinol acyltransferase) enzimek katalizálják (Ross, 1982, 2003; Ruiz és mtsai, 1999; Ong és mtsai, 1987). A CrbpI és CrbpII fontos szerepet játszik az Lrat aktivitásának befolyásolásában (Ong és mtsai, 1987, 1994; Yost és mtsai, 1988). A CrbpII enzimhez (enterocitákban) és a CrbpI-hez (májban) kapcsolt retinol az Lrat enzim előnyben részesített szubsztrátjai, míg a Crbp enzimekhez kapcsolt retinol nem észterifikálódik hatékonyan az Arat enzim által (Ong és mtsai, 1987, 1994; Randolph és Ross, 1991a; Ghyselinck és mtsai, 1999). Az Lrat enzim aktivitása jelentősen fokozható retinsav kezeléssel (Matsuura és Ross, 1993; Randolph és mtsai, 1991b; Shimada és mtsai, 1997; Matsuura és mtsai, 1997; Zolfaghari és Ross 2000). A májban és az extrahepatikus szövetekben tárolt retinil-észter felelős a megfelelő retinol szint fenntartásáért a szervezetben, azokban a periódusokban, amikor a szervezet A vitamin felvétele csökken vagy teljesen megszűnik (Blomhoff és mtsai, 1991; Etchamendy és mtsai, 2003). A raktárakból való felszabadítást a retinil-észter hidroláz (Reh) enzim végzi, amely az észter formát vízfelvétellel bontja és retinollá alakítja.

### *A retinsav szintézise*

A sejtbe kerülő vagy a sejt raktáraiból felszabaduló retinol metabolizmusának legfontosabb iránya a retinsav szintézis. A retinsav metabolizmusának első lépése egy reverzibilis oxidáció, amely során a retinolból retinaldehid keletkezik (Chen és mtsai, 1995). A teljes enzimkészlet, amely ezt a reakciót katalizálja még meghatározásra vár, de az valószínű, hogy a retinaldehidet retinol-dehidrogenázok (Rdh) vagy alkohol-dehidrogenázok (Adh) hozzák létre, ezek közül elsősorban az Adh1 és Adh4 enzim (Duester, 2000). A retinaldehid szintézise után már a két, egymással kompetitív reakció - a retinaldehid redukciója retinollá illetve a retinaldehid oxidációja bioaktív retinsavvá - zajlik.

A retinsav szintézisének kulcsenzimeik a retinaldehid-dehidrogenáz (Raldh) enzimek (Duester, 2000). Az aldehid-dehidrogenázok családjába tartoznak, azon belül az I. csoport tagjai. Erősen konzervált szerkezetű, citoszolikus enzimek, amelyek

képesek a retinaldehidet retinsavvá oxidálni az all-transz és a 9-cisz aldehid izomer esetében is. Az all-transz retinsavat a Raldh1, 2 és 3 enzim alakítja ki, míg a 9-cisz retinsav létrejöttéért a Raldh4 enzim a felelős (Lin és mtsai, 2003).

#### *Intracelluláris retinsav kötés*

A keletkezett retinsav celluláris retinsav kötő fehérjékhez (CrabpI és II) kapcsolódik, amelyek irányítják a retinsav további útvonalát és szabályozzák a metabolizmusát. Általában citoplazmatikus hordozóként működnek, amelyek ingáznak a szubcelluláris kompartmentek és a metabolizáló enzimek között. Mindkét enzim, a CrabpI és a CrabpII is megtalálható a sejtplazmában és a sejtmagban is. Feladatuk többek között az, hogy a retinsavat a sejtmagba szállítsák - és ott segítsék a receptorokhoz kötést - vagy elősegítsék a lebontását (Delva és mtsai, 1999; Dong és mtsai, 1999; Yamamoto és mtsai, 1998; Zheng és mtsai, 1996). Felnőttben a CrabpI széles körben expresszálódik, de a CrabpII csak a bőrben, méhben, petefészekben, a choroid plexusokban, néhány kolinerg idegsejtben és a lágy agyhártyában található meg (Dong és mtsai, 1999; Zetterstrom és mtsai, 1999).

#### *Retinsav receptorok és szignalizáció*

A retinsav a hatását két, egymással heterodimert képező magi receptoron keresztül fejti ki, ezek a retinsav receptor (Rar) és a retinoid „X” receptor (Rxr). Mindkét receptor típusnak 3-3 altípusa van melyeket  $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma$  jelöléssel különítünk el egymástól. Mindegyik altípust más gén kódol, amelyek többféle promoterral rendelkeznek illetve a termék további átalakításokon (splicing) mehet keresztül, kialakítva számos további izoformát. Ez a komplexitás vezet a sokféle receptor kombinációhoz a Rar és az Rxr között, illetve az Rxr és több más magi receptor között. Az Rxr heterodimerizációs partnere lehet – a Rar-on kívül - többek között a thyroid hormon receptor (TR), a D vitamin receptora (Vdr) és a peroxisome proliferator-activated receptor (Ppar) (Au-Fliegner és mtsai, 1993; Qi és mtsai, 1995). Ezek a receptorok a szteroid receptor család tagjai és transzkripciós faktorként hatnak. A Rar és az Rxr, mint minden más magi receptor, tartalmaz egy DNS-kötő és egy ligandum-kötő domént. A két receptor ligandum-specifitása eltér. A Rar az all-transz retinsavat köti nagy affinitással, a 9-cisz retinsavat kisebbel, míg az Rxr ezzel pont ellentétesen, a 9-cisz retinsavat köti nagy

affinitással. A Rar-Rxr heterodimer aktivációját a Rar szabályozza, mivel az Rxr-szelektív ligandumok nem váltanak ki géntranszkripciót (Kurokawa és mtsai, 1994). Ezzel szemben, ha a Rar-hoz hozzáköt a ligandja akkor az Rxr-hez kötő saját ligand erősítheti a génátírás hatékonyságát (Minucci és mtsai, 1997).

A Rar-Rxr heterodimer a gének retinsav reszponzív eleméhez (RARE) köt, melynek általános szekvenciája a következő: „nnAGGTCAnnnnnAGGTCAnn”. Ebben az egy-egy AGGTCA konszenzus szekvenciát a leggyakoribb esetben öt nukleotid választja el egymástól. Az ilyen felépítésű elemek fellelhetőek számos gén promoter régiójában, például a *CrbpI* (Mangelsdorf és mtsai, 1991), a *Rara2*, *Rarβ2*, *Rary2*, *Cyp26a1* és a *CrabpII* (Piedrafita és Pfahl, 1999) génjeiben is, amelyek mind a retinoid metabolizmus elemei. Ezen kívül érintett számos retinoid metabolizmusban részt nem vevő gén is, mint például a *MAOB* (monoamine oxidase B), a *HESI* (hairy and enhancer of split homologue-1), az *Fgf8* (fibroblast growth factor 8), az *iNOS* (inducible nitric oxide synthase) illetve számos homeobox gén (*Hox a1, a4, b1, b4, b5, b8, d4*) (Balmer és Blomhoff, 2002; Blomhoff és Blomhoff, 2006). Bizonyítottan tartalmazzák RARE-t például a dopamin D2 receptor (Samad és mtsai, 1997; Valdenaire és mtsai, 1998), a gonadotrop releasing hormon (Cho és mtsai, 2001a, 2001b), az oxitocin (Richard és Zingg, 1991) és a neurogranin (Iniguez és mtsai, 1994) génjei. Az aktív RARE elemmel rendelkező gének azonosítását nehezíti, hogy számos gén, amit a retinsav szabályoz, csak másodlagos célpontja egy olyan primer proteinnak, amit a retinsav szabályoz és ő maga nem is tartalmaz RARE-t.

Az all-transz retinsav hiányában a Rar-okhoz ko-represszorok kötődnek, megakadályozva a génátírást a RARE-n keresztül. Amikor a retinsav hozzáköt a receptorához, az a ko-represszorokat elengedi és ko-aktivátorokra cseréli, amelyek a génátírást fogják segíteni. A ko-represszorok és ko-aktivátorok feladata, hogy olyan fehérjéket toborozzanak, amelyek befolyásolják a RARE-t tartalmazó DNS szakasszal szomszédos hisztonok acetilációját. A Rar ko-represszorok közé tartozik például a ligand-független N-CoR és az SMRT, valamint a ligand-függő NRIP1, PRAME és TRIM24 fehérjék (Gudas és Wagner, 2011). A Rar ko-represszor fehérjék a hiszton deacetiláz komplex (HDACs) tagjait fogják összegyűjteni, hogy azok eltávolítsák az acetil csoportokat a hisztonokról és ezzel megakadályozzák a génátírást. Ezzel szemben a ko-aktivátor fehérjék – például a p/Cipa - hiszton acetil transzferázokat (HATs)

toboroznak, amik acetilálják a hiszton fehérjéket a megfelelő helyeken, így legombolyodhat a DNS és megtörténhet a transzkripció (Wei, 2003).

#### *A retinsav lebontása*

A sejtben a felesleges retinsav lebontásra kerül. A lebontásnak számos útvonalát írták már le, amelyek talán szövet- és/vagy faj specifikusak (Arnhold és mtsai, 1996; Genchi és mtsai, 1996; Kojima és mtsai, 1994; Kraft és mtsai, 1994; Shirley és mtsai, 1996). A retinsav oxidációját specifikusan a citokróm P450 családba tartozó Cyp26 (Cyp26a1, b1, és c1) enzimek végzik. Az így létrejövő metabolitok a 4-hidroxi-retinsav, a 18-oxo-retinsav, a 4-oxo-retinsav (Ray és mtsai, 1997; White és mtsai, 1996) vagy az 5,8-epoxi-retinsav (Fukii és mtsai, 1997), amelyek szekrécióval kikerülhetnek a sejtből. A Cyp26a1 promotor is tartalmaz retinsav reszponzív elemet, azt sugallva, hogy a retinsav ezzel a visszacsatolással igyekszik kivédeni saját felhalmozódását és a felesleg esetleges káros hatását. A lebontó enzimeszaládnak a fejlődés során fontos szerepe van a retinsav jelenlétének és eloszlásának szabályozásában, kialakítja azokat a határokat, amelyek a magas retinsav tartalmú régiókat elválasztják azoktól, ahol jelenléte nemkívánatos, ezzel nagyon fontos szerepet vállalva a megfelelő embrionális fejlődés kivitelezésében (Maden, 2002; Eichele, 1999).

#### *1.2.2.3. A retinoidok szerepe az embrionális fejlődésben*

A retinsavnak összetett feladata van a gerincesek fejlődése során: a korai testtengely mintázat kialakítása, a központi idegrendszer regionális mintázatának létrehozása, a neurogenesis szabályozása, a végtagok fejlődésének irányítása és számos szerv organogenezisének iniciálása. Számos kísérleti felállást alkalmaznak a retinsav szignalizáció korai embrionális fejlődésben betöltött szerepének vizsgálatára. Sok állatfajon kivitelezve használják mind a funkciónyeréses („gain-of-function”) változatot – elsősorban a fokozott retinsav jelátvitel hatását az állapot- vagy régió-specifikus jelenségek esetében -, mind a szignalizáció gyengítésének hatásait VAD (A vitamin deficiens) diétával, farmakológiai gátlással vagy funkcióvesztéses („loss-of-function”) állatokkal. A metabolizmus elemeire specifikus „null-mutáns” állatok tanulmányozása sok kérdésre választ ad a retinoidok szerepének fontosságát illetően (2. táblázat).



*RA lebontáshoz felelős enzimek*

*Retinoid retininsavas előkötő enzimek*

*Retinoid receptorok*

**2. táblázat:** A retinsavas jelátviteli útvonal fehérjéit kódoló gének célzott kiütése által okozott fenotípusos válaszok. (Niederreither és Dollé, 2008; Kumar és mtsai, 2012)

A retinsav a korai embrióban a fej felé csökkenő gradiens mentén elhelyezkedve szabályozza az embrionális anterior-poszterior testtengely kialakulását, kontrollálja a homeobox (*Hox*) gének expresszióját (Durstón és mtsai, 1989; Simeone és mtsai, 1995). További feladata van számos szerv és szövet fejlődésében, beleértve az arc egyes részeit és az előagyat (Schneider és mtsai, 2001; Ribes és mtsai, 2006; Halilagic és mtsai, 2007), valamint a szem (Matt és mtsai, 2005; Molotkov és mtsai, 2006) és a belső fül kialakítását (Romand és mtsai, 2006). Befolyásolja a szív és az aorta morfogenezisét és differenciációját (Niederreither és mtsai, 2001) illetve a tüdők (Wang és mtsai, 2006), a vesék (Batourina és mtsai, 2001) és a hasnyálmirigy (Martin és mtsai, 2005) kezdeményének kialakulását. A retinsav gradiens fenntartásához szükséges a termelő és lebontó enzimek pontosan szabályozott és összehangolt expressziója.

Amellett, hogy a retinsav elengedhetetlen az embrionális fejlődés során, a felnőttkori idegrendszerben is fontos a jelenléte. Befolyásolja ugyanis a szinaptikus plaszticitást, hatással van a tanulási folyamatokra és a memóriára, szerepe van a felnőttkori neurogenesisben, és metabolizmusának rendellenességei kapcsolatba hozhatóak olyan betegségekkel, mint az Alzheimer- és a Parkinson kór (van Neerven és mtsai, 2008), a skizofrénia (Maynard és mtsai, 2001; Palha és Goodman, 2006) vagy a depresszió (Marqueling és Zane, 2007). Mindezek tükrében tehát lényeges, hogy megértsük azokat a folyamatokat, amelyek befolyásolják a retinoidok jelenlétét és eloszlását a szervezetben, illetve azokat, amelyeket a retinoidok jelenléte és eloszlása befolyásol.

A fejlődő utóagyban a retinsav nem a neuroepitéliumban termelődik, hanem a szomszédos mesodermában expresszálódó Raldh2 enzim szintetizálja. Innen diffundál anterior irányba, végig a neuroektoderma mentén és regulálja a poszterior utóagy és a gerincvelő növekedését és mintázatának kialakulását, specifikálja a poszterior rombomérákat (Maden, 2002; White és mtsai, 2007). A három Cyp26 enzim, amelyek a lebontásért felelősek, dinamikusan expresszálódnak a leendő agy neuroektodermájában. Legkorábban a Cyp26a1 jelenik meg a neuroepitélium rostrális részén, kialakítva a későbbi utóagy elülső határát, a leendő r3-r4 romboméra határon, majd anterior irányba „hátrál” a későbbi r2-r3 határig (Sirbu és mtsai, 2005; Hernandez és mtsai, 2007). A Cyp26b1 és a Cyp26c1 kissé késve jelenik meg az r5-r6 határon. A Cyp26a1 és a Cyp26c1 feltűnik a fej elülső felének mesechimájában is (Uehara és mtsai, 2007). A pontos szegmentáció tehát úgy alakul ki, hogy a retinsav gradienst a dinamikusan változó Cyp26 expresszió szakaszokra bontja, kialakítva ezzel a leendő határokat (Hernandez és mtsai, 2007).

A retinsav szignalizáció gátlásának az előagy fejlődésében is szerepe van. Az anterior szövetekben a gasztrula és a neurula állapotban jelen van a Cyp26a1 és a Cyp26c1 enzim. A feji struktúrák kialakításával egy időben gátlódik a BMP (bone morphogenetic protein), Wnt és Nodal szignalizáció, mert lokálisan kifejeződnek természetes antagonistáik, a Cerberus, a Dickkopf és a Noggin (Beddington és Robertson, 1998; Weinstein és Hemmati-Brivanlou, 1999), megelőzve azoknak a gének az aktivációját, amelyek a poszterior tulajdonságok megjelenéséért felelősek. Az Raldh2 enzim átmenetileg megjelenik az anterior előagy neuroektodermájában és a szomszédos

felszíni ektodermában a korai szomita állapotban (Wagner és mtsai, 2000; Ribes és mtsai, 2006) és az általa termelt retinsav hatására indukálódnak a szemhólyagok (Mic és mtsai, 2004). További vizsgálatok bizonyították az Raldh2 és az Raldh3 enzim kombinált szerepét a nazális régió fejlődésében (Dupe és mtsai, 2003; Halilagic és mtsai, 2007), valamint a Raldh1 és Raldh3 szerepét a szemek morfogenezisében (Matt és mtsai, 2005; Molotkov és mtsai, 2006).

A retinsav nélkülözhetetlen az embrionális testtengely megnyúlásakor is, számos folyamatot kontrollál, beleértve a mesodermális szegmentációt és differenciációt, a neurogenézist és a fejlődő gerincvelő regionális mintázódását. A törzs szöveteinek létrehozását egy olyan összejt populáció végzi, amelynek a fenntartását a szomszédos, visszahúzódó primitív csíkból származó FGF szignál segíti. A folyamatos osztódás biztosításához a differenciáltató hatású retinsavat erről a területről a jelen levő Cyp26a1 enzim távolítja el (Abu-Abed és mtsai, 2001; Sakai és mtsai, 2001; Emoto és mtsai, 2005). Másfelől, a retinsav jelenléte a közeli területeken biztosítja a neuronális differenciációt, kialakítva a gerincvelő ventrális részére jellemző sejtípusokat (Diez del Corral és mtsai, 2003). Ebben a folyamatban a retinsavat az újonnan formálódó szomitákban dinamikusan kifejeződő Raldh2 enzim termeli (Diez del Corral és mtsai, 2003, 2004; Vermot és mtsai, 2005a). Az FGF-függő Wnt8 indukció a caudális neuroepitéliumban gátolja a retinsav szignalizációt a szomszédos mesodermában, szabályozva ezzel az FGF/retinsav differenciációs váltás időzítését (Olivera-Martinez és Storey, 2007).

A retinsav szignalizáció összefügg a szomitogenezis kétoldali szimmetriájának biztosításával. A retinsav szintézis gátlásával ugyanis az első néhány szomitapár kialakulása után a jobb- és baloldalon a további szomita képzés rendezetlen módon folytatódik (Vermot és mtsai, 2005a, 2005b; Kawakami és mtsai, 2005; Sirbu és Duester, 2006).

A korai szívfejlődésben szintén része van a retinsav szignalizációnak a szív progenitor sejtjeinek készletét korlátozó, differenciáltató hatásával. A Raldh2 enzim jelenlétét zebra hal embriókban kimutatták (Keegan és mtsai, 2005), jelenléte és hatása más gerincesben valószínűleg nem jelentős (Hochgreb és mtsai, 2003; Collop és mtsai, 2006; Ryckebusch és mtsai, 2008).

A fejlődés során számos példát találunk a retinsav szervnövekedésben játszott szerepére. Lokálisan termelődik - az Raldh2 enzim közreműködésével a kopoltyúívek mesenchimájában - és hat a kopoltyúívekben. Hiányában a poszterior ívek növekedése károsodik, magával vonva az ebből származó struktúrák rendellenes fejlődését is (Niederreither és mtsai, 2003), így nem alakul ki a gyomor és a tüdő (Wang és mtsai, 2006; Desai és mtsai, 2006). A tüdő esetében a retinsavnak hosszantartó hatása van, egyrészt a kezdeti primer tüdő telep létrejöttékor, másrészt az ezt követő elágazódás képzés során (Chen és mtsai, 2007). Mindezek mellett szükséges a vesék kezdeményeinek kialakításához az urether bimbóból és a húgyvezetékek fejlődéséhez (Batourina és mtsai, 2001).

Figyelembe véve a retinsav összetett szerepét az őssejtek, az ős-ivarsejtek és a különböző szervek fejlődése során, a retinoid szignalizációnak szüksége van más szignálok koordináló hatására, beleértve az FGF- és az SHH (sonic hedgehog) szignálokat, amelyekkel a fejlődés során ismétlődően kölcsönhat, befolyásolva egymás hatásait, illetve azok mértékét (Niederreither és Dollé, 2008).

A retinsav által befolyásolt molekuláris események még közel sem tisztázódtak teljesen. Annyi bizonyos, hogy összetett kölcsönhatások játszódnak le azok között a szignálok között, amelyek szabályozzák a növekedést és a mintázat kialakulást számos szervben és szövetben. A retinsav kétféleképpen hat kölcsön más jelátviteli útvonalakkal: érzékeny azoknak a géneknek az indukciójára, amelyek más növekedési faktorokat vagy szignálmolekulákat kódolnak, illetve engedi az ezekre a szignálokra adott hatékony sejtes választ (Niederreither és Dollé, 2008).

#### *1.2.2.4. A retinoidok szerepe a felnőtt idegrendszerben*

Számos embrionálisan is fontos funkció megmarad a teljes élet során és szabályozza a sejtors-választást és/vagy az őssejtek populációinak differenciálódását. Emberben az A vitamin a felnőttkorban is jelentős szereppel bír, befolyásolja a termékenységet, szükséges a látás folyamatához, óv a neoplasztikus növekedéstől és a neurodegeneratív betegségektől. Napjainkban is élénk kutatások folynak annak megértése érdekében, hogy a retinoidoknak milyen szerepük van a fiziológiás működésben, a kognitív képességekben, a felnőttkori neuroplaszticitásban. Bár a

retinoidok befolyásolják a szinaptikus plaszticitást, a tanulási és memória folyamatokat (Lane és Bailey, 2005) és az alvást, hatással vannak a depresszióra, skizofréniára, a Parkinson- és Alzheimer-kórra, a retinoidok targetjei és a háttérben folyó mechanizmusok jelenleg még csak körvonalazódnak.

A posztnatális idegrendszer különböző agyterületeiben eltérő módon expresszálódnak a retinoid metabolizmus és szignalizáció elemei, a metabolikus enzimek, a kötő fehérjék és a magi receptorok (Krezel és mtsai, 1999). Bár az R<sub>xr</sub>-ek specifikus expressziós mintázatot mutatnak a felnőtt agyban, valószínűleg elsősorban partnerként játszanak szerepet a heterodimerekben, mivel egyelőre nem bizonyított, hogy ligandja, a 9-cisz retinsav termelődik-e az agyban (Mark és mtsai, 2006). A R<sub>ar</sub> a legtöbb agyterületen – csak kis mennyiségben ugyan, de – megtalálható. Ezzel szemben a R<sub>ar</sub>α és β specifikus expressziót mutat. A R<sub>ar</sub>α főleg a hippocampusban, talamuszban és a hídban, míg a R<sub>ar</sub>β a striátumban, hipotalamuszban és a nyúltvelőben jelenik meg (Tafti és Ghyselinck, 2007). A R<sub>ar</sub>-ok eloszlása a felnőtt agyban minőségi és mennyiségi különbségeket mutat a fejlődő és a neonatális agyhoz képest (Ruberte és mtsai, 1993), megváltozott specifikus feladatokra utalva (Chiang és mtsai, 1998).

A R<sub>ar</sub>α és a R<sub>ar</sub>β vagy ezek kettős loss-of-function mutánsa egerekben károsította a memóriát, amelyet Morris-féle úsztatási tesztben vizsgáltak (Chiang és mtsai, 1998; Misner és mtsai, 2001). Hasonló hiányosságot találtak VAD patkányok térbeli tanulási és memória folyamataiban, amely az A vitamin utólagos pótlásával visszaállíthatónak bizonyult (Cocco és mtsai, 2002). Felnőtt egerekben a VAD csökkent R<sub>ar</sub>, R<sub>xr</sub> és neurogranin expresszióval társult ami retinsav kezeléssel szintén javítható volt (Etchamendy és mtsai, 2003). A striátum tűnik a legérzékenyebb agyterületnek az A vitamin hozzáférhetőség szempontjából, mivel itt tapasztalhatóak a legjelentősebb génextpressziós változások VAD hatására (Husson és mtsai, 2004). Sejt szinten, a hippocampális long-term potenciáció és depresszió, a tanulás és memória háttér folyamata VAD hatására sérülnek, ugyanakkor retinsavas kezeléssel helyreállíthatóak (Misner és mtsai, 2001). Ezzel összhangban, a R<sub>ar</sub>β/R<sub>xr</sub>γ kettős null-mutáns szintén sérült long-term potenciáció mechanizmussal rendelkezik (Chiang és mtsai, 1998; Olson és Mello, 2010).

Életkortól függő retinsav szignalizációs változásokat emberben és állatokban is kimutattak. Ez az életkor előrehaladásával csökkent vérplazma retinol koncentrációt

jelent és alacsonyabb Rar/Rxr mRNS mennyiségben mutatkozik meg. Ezek a változások retinsavas kezeléssel helyreállíthatóak (Enderlin és mtsai, 1997; van der Loo és mtsai, 2004). Ezek a korral járó változások természetesen összefüggnek az olyan kognitív funkciókkal, mint a memória és a tanulás (Etchamendy és mtsai, 2001; Fe'art és mtsai, 2005).

*In vitro* tanulmányok bizonyítják, hogy a neuroblasztómasejtek retinsav által indukált differenciációja során megnövekszik a presenilin 1 és 2, valamint az amyloid fehérje prekursor mRNS-e (König és mtsai, 1990; Flood és mtsai, 2004). Ezzel szemben a retinsavnak antioxidáns tulajdonsága is van, ami magyarázhatja az *in vitro* anti-amyloidogén hatást (Ono és mtsai, 2004). Ezek a megfigyelések megerősítik azt a jelenséget, hogy a VAD patkány agykérgében  $\beta$ -amyloid fehérje felhalmozódás történik (Corcoran és mtsai, 2004), és ez a lerakódás eltávolítható retinsav kezeléssel (Husson és mtsai, 2006). Az Alzheimer-kórban szenvedők vérében csökken a retinol szintje (Rinaldi és mtsai, 2003), a Rar $\beta$  és a Raldh2 expressziós szintje pedig alacsony értéket mutat a posztmortem vizsgálatok során az agykéregben és az agyhártya ereiben (Corcoran és mtsai, 2004). A retinoidok tehát érintettek lehetnek a  $\beta$ -amyloid fehérje kóros felhalmozódása során kialakuló betegségekben is.

Néhány vizsgálat bizonyítja, hogy összefüggés van a fejlődésben szerepet játszó retinsav szignalizáció és a skizofrénia között (Goodman, 1998), ami kapcsolatba hozható a még fel nem tárt kóros idegi fejlődési eseménysorral, ami az agykamrák duzzadásához és strukturális elváltozásokhoz vezet a frontális kéregben, az amygdalában, a hippocampusban, a temporális lebenyben, valamint a gyrus cinguliban a betegség során (Harrison, 1999). Továbbá, a dopaminerg rendszer - amely jól dokumentáltan szerepel a skizofrénia és a Parkinson-kórban (Davis és mtsai, 1991), - a fejlődő és a felnőtt központi idegrendszerben egyaránt jelentős célpontja a retinsav hatásnak (Borelli és Chambon, 1999; Wang és Liu, 2005). A D2 dopamin receptor gén promotere funkcionális Rar/Rxr kötő motívumot tartalmaz (Samad és mtsai, 1997) és a D1, D2 receptorok expressziós mintázata redukálódik a Rar $\beta$ /Rxr $\beta$  és a Rar $\beta$ /Rxr $\gamma$  kettős null-mutáns egerekben (Krezel és mtsai, 1998). A retinsavnak tehát köze lehet a skizofrénia és a Parkinson-kór kialakulásához.

Egerekben a retinsav kontrollálja a szerotonerg neuronok differenciációját és a szerotonin 1A receptor expresszióját (Charest és mtsai, 1993; Ito és Morita, 1995)

jelezve egy lehetséges kapcsolatot a retinsav jelátvitel és a szerotonerg rendszer valamint az alvás és a kedélyállapot szabályozása között. A depressziót karakterizálja az alvás közben megjelenő delta hullámok rendezetlensége, amely összefügg a retinoidok jelenlétével. A többlet A vitamin jelenléte asszociál a depresszív kedélyállapottal és az alvási rendellenességekkel, hasonlóan, mint a szintetikus retinoid, az isotretinoin (Accutane) kezelés hatására történt megfigyelések esetében (Wysowski és Beitz, 2001; O'Reilly és mtsai, 2006).

A retinsav szignalizáció hatással van az alvásra és az alvás közben az agyban zajló folyamatokra (Maret és mtsai, 2005). Az NREMS (non-rapid eye movement sleep, az EEG egyik változata) segítségével mérhető delta aktivitás (lassú hullám, 0,5-4,5 Hz) és a paradox (álomlátásos alvás, gyors szemmozgások jellemzik) alvásra jellemző téta hullámok (5-8 Hz) eloszlása kiválóan alkalmas az alvás intenzitásának és folyamatosságának valamint az ezekben bekövetkező változások jellemzésére. Az alvásmegvonás ennek képét jelentősen felborítja és megváltoztatja a retinoid receptorok expresszióját (Tafti és Ghyselinck, 2007). A változásokat az agyhullámokban az okozhatja, hogy a  $Rar\beta$  receptornak direkt hatása van a dopaminerg neurotranszmisszióra (Samad és mtsai, 1997; Krezel és mtsai, 1998). Az alvásban és a *Rar* génexpresszióban a fejlődés során és VAD hatására bekövetkező változások még nem teljesen tisztázottak.

A retinsav az egyik olyan szignál, amely hatással van az embrionális neuroepitélium progenitor populációjára és talán más progenitor/őssejt csoportokra is (Keegan és mtsai, 2005). A fő kérdés az, hogy vajon hatással van-e a felnőtt ember őssejtjeire is? Ez ugyanis lehetőséget biztosítana, hogy a retinoidok segítségével változtassunk azok „viselkedésén”. Aktív retinsav szignalizáció mutatható ki felnőtt szervezetben a szubventrikuláris zóna (SVZ), a szaglóhagyma és a hippocampus területén (Haskell és LaMantia, 2005, McCaffery és mtsai, 2006). Ezek a területek felelnek meg az idegi őssejt niche területeknek (Taupin, 2006) és a retinsav által aktivált sejtek az SVZ-ben megfelelnek a lassan osztódó prekurzoroknak (Haskell és LaMantia, 2005). Mindezek mellett az agyhártyának is jelentős retinsav produkciója van a teljes élet során. A növekedési faktorok, mint az FGF vagy az EGF (epidermal growth factor) fokozzák az idegi őssejtök önmegújító képességét és fenntartását, míg a retinsav minden valószínűség szerint a neuronális differenciációt vezényli, mint ahogy teszi azt az

embrionális velőcsőben és a sejttenyészetekben *in vitro* (Guan és mtsai, 2001). A retinsav neuronális differenciációs hatása felhasználható lehet a neurodegeneratív betegségek kezelésében, például a Parkinson-kór esetében: specifikus idegsejt típusokat hozhatnánk létre retinsav és növekedési faktorok vagy neurotrofinok kombinációjának kezelésével. Csökkent endogén Raldh2 enzimszintet mutattak ki ALS-ben (amyotrophic lateral sclerosis) szenvedő ember gerincvelő mintájában, valamint állatkísérletekben az A vitamin megvonás hatására az Alzheimer-kór jelei mutatkoztak. Mindezen megfigyelések azt sugallják, hogy a retinsavra épülő terápiának lehet jövője a klinikai alkalmazásban (Maden, 2006).

#### 1.2.2.5. Hipervitaminózis

Túlzott A vitamin fogyasztásról viszonylag ritkán lehet hallani, de előfordulhat például olyan nem szokványos esetben, ha valaki túl sokat eszik jegesmedve májából (Rodahl és Moore, 1943). Zsírban oldódó vitaminként nehezebben ürül a szervezetből, mint a vízben oldódó vitaminok vagy a vízben oldódó  $\beta$ -karotin. A hipervitaminózis egyik tünete felnőttekben a fejfájás, amit a megnövekedett koponyán belüli nyomás okoz. A folyamat, hogy a hipervitaminózis hogyan váltja ki a megemelkedett nyomást, még nem ismert, de az mindenesetre biztos, hogy kómához és halálhoz is vezethet (Macapinlac és Olson, 1981). A felnőtt szervezetben bekövetkező káros hatásoknál azonban sokkal jelentősebbek a fejlődés során okozott, visszafordíthatatlan elváltozások vagy az embrió korai pusztulása (Cohlan, 1953; Holson és mtsai, 2000, 2001). A vitaminfelesleg által okozott teratogenezis érinti a szív, a koponya, a vázrendszer, a végtagok, az agy és a központi idegrendszer valamint a szem és a craniofaciális struktúrák fejlődését is (Brookes, 1989). Az A vitamin toxikus hatásait az 1950-es években kezdték el vizsgálni (Cohlan, 1953, 1954; Giroud és Martinet, 1955). Az embrionális fejlődés során az A vitamin kezelés következtében szemmel látható változások alakultak ki a vizsgált egerek idegrendszerében, mint például exencephalia<sup>1</sup>, spina bifida<sup>2</sup> vagy az aqueductus rostrális végének szűkülése, esetleg záródása (Kalter

---

<sup>1</sup> Az agyállomány egy részének kitüremkedése a tarkócsont részleges hiánya következtében.

<sup>2</sup> A gerincoszlop veleszületett baja, egyik részletén a csigolyák két fele nem egyesül egymással és egy szűkebb vagy tágabb rést hagy nyitva



és Warkany, 1961). Patkányokat retinollal kezelve exencephalia, encephalocele<sup>3</sup> és meningocele<sup>4</sup> figyelhető meg (Nolen, 1969). A fajok közötti eltéréseket az anyai, placentális és metabolikus különbségek okozzák (Nau, 2001). A későbbi vizsgálatok a fizikai elváltozások mellett igazolták a viselkedésbeli eltéréseket is a magas retinol szint hatására, mint például az aktivitás, tanulás és a reflexek rendellenes kifejlődése (Butcher és mtsai, 1972, 1979; Vorhees és mtsai, 1974, 1978, 1979, Coluccia és mtsai, 2008a, 2008b, 2009). Adams és munkatársai 1993-ban megismételték a '60-as és '70-es évek kísérleteit és a korábbi megfigyeléseket a testsúly csökkenésével, a végtagok rendellenes fejlődésével és a farkastorok megjelenésével egészítették ki. A kezdeti szkepticizmust, miszerint az állatkísérletekkel igazolt elváltozások nem vethetők össze az emberi fejlődési hibákkal, végleg eltörölte, amikor a '80-as években piacra került az akne<sup>5</sup> kezelésére szolgáló Accutane (13-cisz retinsav – izotretinoin). Ennek ugyanis súlyos hatásai voltak az embriogenezisre és megnövekedett kockázattal járt a terhes nők számára: 40%-kal növekedett a spontán abortusz, 4-5%-kal a születés körüli mortalitás, 16%-kal a koraszülés és 25%-kal növelte a szervi (craniofaciális, keringési, csecsemőmirigyét érintő és központi idegrendszeri) elváltozások megjelenését (Lammer és mtsai, 1985). Az idegrendszert érintő elváltozások – kisagyi hipoplázia, rosszul fejlődő vermis, a híd és a nyúltvelő szabálytalan fejlődése, vízfejűség, agykérgi elváltozások - a leggyakrabban megjelenő deformitások közé tartoznak (Lammer és mtsai, 1988). Ebből adódóan előtérbe került a retinoidok idegrendszeri fejlődésben betöltött szerepének vizsgálata (Marshall és mtsai, 1996; Durston és mtsai, 1998; Maden és mtsai, 1999). A toxicitás hosszútávú következményei között pedig olyan adatok szerepelnek, amelyek szerint az érintett gyerekek 47%-a 5 éves korában csökkent mentális képességekkel rendelkezett (Adams és Lammer 1991, 1993).

---

<sup>3</sup> agyvelősérny, a koponyacsontok záródási zavara miatt az agy és/vagy agyhártyák kitüremkednek a koponyanyíláson, a tömlő agyállományt is tartalmaz

<sup>4</sup> agyvelősérny, a koponyacsontok záródási zavara miatt az agy és/vagy agyhártyák kitüremkednek a koponyanyíláson, a tömlőben csak folyadék van

<sup>5</sup> A szőrtüszők és a faggyúmirigyek krónikus elváltozása.

#### 1.2.2.6. Az A vitamin hiány hatásai

Már az 1930-as évek körül leírták, hogy az A vitamin szükséges a normális embrionális fejlődéshez (Hale, 1933; 1935) és reprodukcióhoz (Wolbach és Howe, 1925; Evans, 1928). Korai tanulmányokban, amelyekben A vitamin hiányos (Vitamin A Deficient - VAD) étrenden tartott rágcsálókat vizsgáltak, leírtak egy komplett, születés körül megjelenő tünet együttest (VAD szindróma), amely számos szervrendszert érintett (Wilson és mtsai, 1953). Ilyen okokra vezethetők vissza az idegrendszert érintő súlyos elváltozások, például a hydrocephalus<sup>6</sup>, a spina bifida, az anophthalmia<sup>7</sup> és a microphthalmia<sup>8</sup> (Maden, 2002).

A terhes anyáktól megvont A vitamin növeli a vetélés valószínűségét, széleskörű sejtpusztulást okoz a méhlepényben és számos fejlődési rendellenességet okoz az embriókban. A normálistól eltérő idegrendszeri fejlődés mellett károsodik a szemek, herék, húgyvezeték, törzssejtek, vesék, tüdők, rekeszizom, hasnyálmirigy, aortaív és a szív fejlődése is (Warkany és Shaffenberger, 1946).

Az embrionális fejlődés mellett a kifejlett állatok szaporodó képességét is befolyásolja. Az A vitamin nélkülözhetetlen a hím reprodukcióhoz. Hiányában a mellékhere, a prosztatata és az ondóhólyag epitél sejtei többrétegű, pikkelyes, keratinizált epitéliumra cserélődnek és megszűnik a spermatogenezis (Wolbach és Howe, 1925). A nőstények szaporodási képességeit is befolyásolja az A vitamin hiánya. A hímekkel ellentétben náluk fontos a vitaminhiány időpontja és mértéke. A párzás előtt kiváltott A vitamin hiány következtében a szaporodás már a beágyazódás előtt meghiúsul (Evans, 1928). Az A vitamin hiányos nőstény patkányok ciklusideje szabálytalanná válhat és degenerált petesejtek találhatóak a petevezetékek utolsó szakaszában.

A kifejlett szervezetben az A vitamin hiány első tünetei közt jelenik meg a farkasvakság, majd a hiány súlyosbodása esetén a bőr fokozott keratinizációja, az immunrendszer működésének csökkenése, vérszegénység és vakság is előfordulhat (Olson, 1994).

Világszerte az A vitamin deficiencia a leggyakoribb táplálkozási elégtelenség az emberiség körében, ami összességében vizuális rendellenességekkel, az immunrendszer

---

<sup>6</sup> Vízfejűség, a cerebrospinalis folyadék abnormális felhalmozódása következtében.

<sup>7</sup> Az egyik vagy mindkét szemgolyó veleszületett hiánya.

<sup>8</sup> Az egyik vagy mindkét szemgolyó veleszületett fejletlensége, kis mérete.

elégtelen működésével és károsodott növekedéssel jár. Bár az elmúlt 50 évben számottevő politikai erőfeszítések születtek a VAD felszámolására (Underwood és Arthur, 1996), napjainkban is tekintélyes probléma maradt a legtöbb fejlődő országban (Jiang és mtsai, 2006; Arlappa és mtsai, 2008).

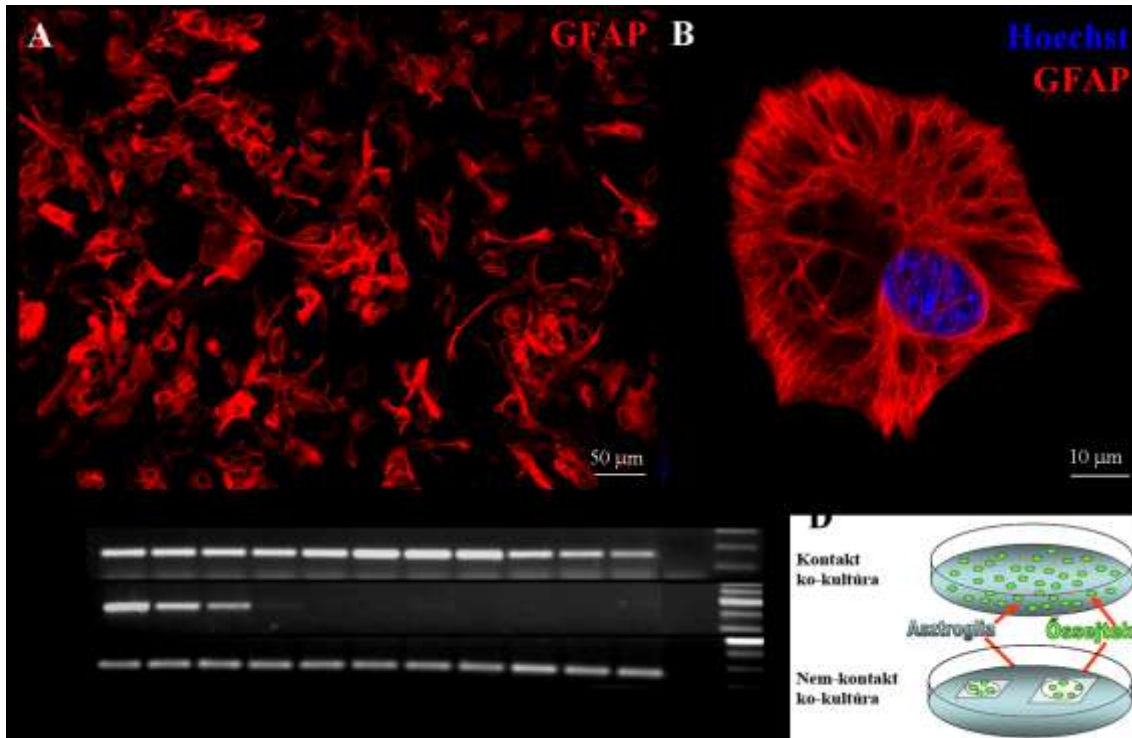
### **1.3. In vitro modellrendszereink**

A központi idegrendszer fejlődése során lezajló molekuláris és sejtszintű változások bizonyos aspektusait rendkívül nehéz *in vivo* vizsgálni. Ezért olyan *in vitro* modellrendszereket használunk, amelyek segítségével leegyszerűsítve megfigyelhetőek ezek a folyamatok. Ez azonban az egyik hátránya is az *in vitro* vizsgálatoknak, hiszen a vizsgált sejteket az eredeti, összetett környezetükből kiszakítva tartjuk fenn. Így számos olyan hatás nem érvényesül, amely *in vivo* befolyásoló tényezőként lehet jelen. Ezzel szemben az *in vitro* rendszerekben több lehetőségünk van egyes körülmények változtatására, amelyek *in vivo* nem lennének kontrollálhatóak. Az *in vitro* kísérletek során tehát törekednünk kell arra, hogy az *in vivo* állapotokhoz minél hasonlóbb állapotok között vizsgálódjunk, de ennek ellenére nem szabad szem elől tévesztenünk, hogy a nem ismert tényezők miatt nagy eséllyel nem fogunk tökéletes egyezést kapni a két vizsgálati módszer eredményei között. Ezért ha lehetőség van rá, össze kell vetni az *in vitro* és az *in vivo* kapott eredményeket és ahol csak lehet, *in vivo* is igazolni kell az állításainkat.

#### **1.3.1. Az asztroglia sejtek**

Munkám során az asztroglia sejtekkel történő kísérletek egy részét *in vitro* tenyészeteken végeztük. A tenyészetek rengeteg információval szolgálnak az asztroglia fejlődéséről, élettani és biokémiai sajátosságairól. Újszülött egerek (0-2 naposak) agyszövetét disszociáltatva olyan sejtuszupenziót kapunk, amelyből hónapokig fenntartható sejttenyészetekhez juthatunk. A sejtek magzati szérumot tartalmazó tápban – ami a sejtostódást segíti –, megfelelő aljzaton (részleteket lásd az Anyag és módszer fejezetben) egy hét elteltével konfluens, a tenyészedényt egyetlen rétegben fedő sejt kultúrát hoznak létre. Ilyenkor a sejtek Gfap tartalma alacsony és kimutatható

belőlük a nestin és a vimentin intermedier filamentum is. 2-3 hét után a sejtek már háromdimenziós tenyészetekké fejlődnek, amelyekben megtalálhatóak a differenciálódott asztrociták, amelyek erős Gfap immunpozitivitást mutatnak (7/A-B. ábra), és az osztódóképes előalakok is.



**7. ábra:** Primer asztroglia tenyészetek jellemzése. **A:** 2 napos egérből származó primer asztroglia tenyészet, GFAP jelöléssel. **B:** 2 napos egérből származó asztroglia sejt GFAP jelöléssel, konfokális mikroszkópos felvételen. **C:** Gliális (GFAP) és neuronális (Math2) markerek vizsgálata RT-PCR segítségével, tenyésztett asztroglia sejtekben. **D:** Az általunk kialakított kétféle ko-kultúra vázlatja.

Az asztrociták mellett a tenyészetben megjelenhetnek még apró idegsejtek – amelyek a tenyésztés során eltűnnek (7/C ábra) -, ependyma jellegű sejtek, és a tenyésztés előrehaladásával egyre nagyobb számban a mikroglia sejtek. Ezek jelenléte arra utal, hogy a kezdetben morfológiailag homogénnek tűnő, egyrétegű tenyészetekben különböző fejlődési lehetőségekkel rendelkező Gfap immunpozitív sejtek, idegsejtek képzésére alkalmas idegszöveti őssejtek és nem-neuroektodermális eredetű sejtek egyaránt jelen vannak. Idősebb állatokból nyert tenyészetekben nagyobb arányban fordulnak elő reaktív glia-szerű sejtek, mikroglia és meningeális sejtek. Azonban megfelelő szelektálással és tenyésztési feltételekkel minden életkorból növeszthetőek fiatal, elkötelezetlen, osztódó sejtek. Tehát az életkor előrehaladásával a kinyerhető

sejtek lehetséges fejlődési útvonalai egyre szűkülnek, de mindig találhatunk köztük széles fejlődési potenciállal rendelkező idegszöveti őssejtet.

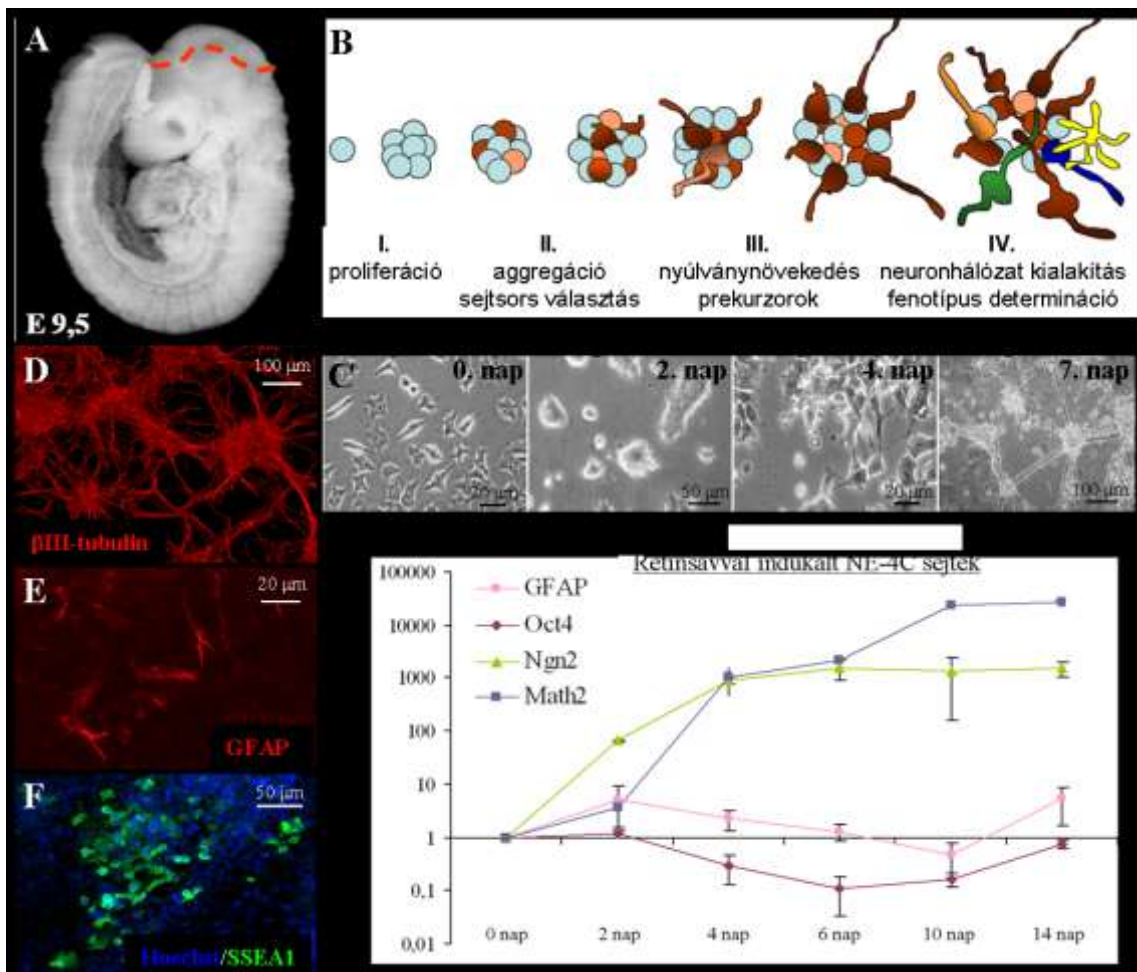
Az asztroglia sejtek és őssejt kölcsönhatásainak tanulmányozására *in vitro* modellrendszereket alkalmaztunk: újszülött egerekből nyert primer asztroglia sejtek és különböző eredetű pluripotens sejtek kontakt és nem-kontakt ko-kultúráit hoztuk létre (7/D ábra). A kontakt ko-kultúrában a pluripotens sejteket közvetlenül az asztroglia sejtekre ültettük, így a kétféle sejt típus egymással közvetlen sejt-sejt kapcsolatokat tudott kialakítani. A nem-kontakt ko-kultúrákban a primer asztroglia tényezetek bizonyos területeiről eltávolítottuk a sejteket, majd ezekre a sejtmentes területekre üveglemezen növesztett őssejteket ültettünk be. Ez utóbbi rendszerben a kétféle sejt típus nem tud közvetlen sejt-sejt kapcsolatokat kialakítani, csak a tényezőfolyadékon keresztül kerülhetett kapcsolatba egymással, így kizárólag szolubilis faktorok segítségével kommunikálhatott.

### 1.3.2. Az NE-4C sejt vonal

Munkám során korai embrióból származó idegi őssejtként az NE-4C sejt vonalat használtam. Ez a sejt vonal egy p53 deficiens, 9,5 napos egérembrió elülső agyhólyagjából (8/A ábra) származó, spontán módon immortalizálódott neuroektodermális sejtek egy klónja (Schlett és Madarász, 1997). Az NE-4C sejtek epitél jellegű sejtek, amelyek 10% szérumot tartalmazó tápoldatban fenntartva, idegi őssejt jellemzőket mutatnak. Differenciálatlan állapotban nestin és SSEA1-et expresszálnak, önmegújító képességgel rendelkeznek és megfelelő indukciós hatásokra reagálva képesek különböző idegi sejt típusokká differenciálódni.

All-transz retinsav jelenlétében a sejtek neuronokká és asztroglia sejtekké differenciálódnak. A differenciálódási folyamat során jól definiált fejlődési stádiumok (8/B ábra) követik egymást, amelyek specifikus morfológiai, molekuláris és fiziológiai jellemzőkkel rendelkeznek. A differenciálatlan sejtek a retinsav hatására, az indukció 2. napjára aggregátumokat képeznek (8/C ábra). Ez az aggregáció elengedhetetlenül szükséges a későbbi neuronális differenciációhoz (Tárnok és mtsai, 2002). Ezekben az aggregátumokban a sejtek egy része a neuronális fejlődés irányába elköteleződik, majd ezek a neuron prekursorok kivándorolnak az aggregátumokból és nyúlványos

idegsejteké fejlődnek. Az idegsejtek érésük során kiterjedt neuronhálózatokat alakítanak ki (8/D ábra). Az indukció előrehaladása során, a 10. nap után következik a gliogenetikus fázis, ekkor Gfap immunpozitív asztroglia sejtek jelennek meg a tenyészetekben (8/E ábra). A folyamat során a tenyészetben végig jelen vannak differenciálatlan, osztódó sejtek is (8/F ábra).



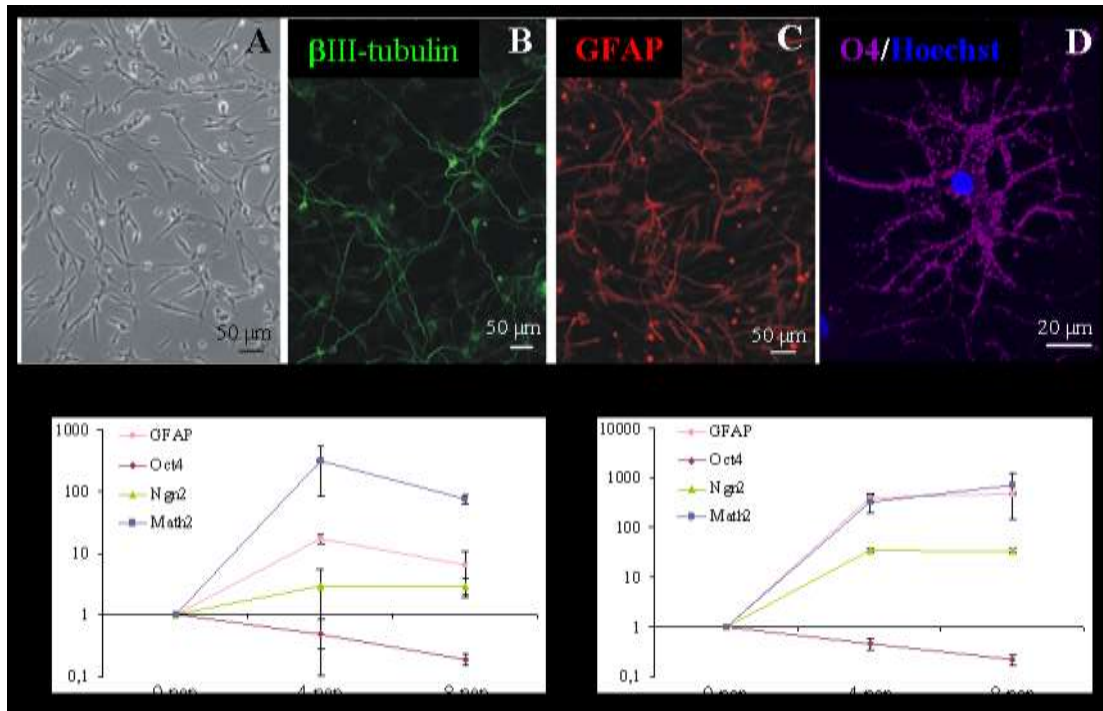
**8. ábra:** Az NE-4C sejtvonallal főbb jellemzői. **A:** 9,5 napos egérembrió képe, a piros szaggatott vonallal jelzett területről származnak a sejtvonallal kiindulási sejtjei. **B:** A retinsavval kiváltott differenciáció fejlődési stádiumainak modellje. **C:** Fáziskontraszt képek a retinsavas kezeléssel kiváltott indukció különböző napjain az NE-4C sejtekben. **D:** Idegsejt hálózat az indukció 7. napján, neuron-specifikus  $\beta$ III-tubulin immunfestés. **E:** GFAP immunpozitív asztroglia sejtek az indukció 10. napján. **F:** Differenciálatlan, osztódó sejtek a tenyészetekben, az indukció 9. napján, SSEA1 őssejt markerrel jelölve. **G:** A differenciációt jelző néhány marker mRNA szintjének változása az indukció során, Real-Time PCR-rel meghatározva. GFAP: asztroglia marker, Oct4: őssejt marker, Ngn2: korai neuronális marker, Math2: érett idegsejtek markere.

Az NE-4C sejtek idegi irányú indukciójának egy másik módja, ha a szérumtartalmú fenntartó tápot, szérumot nem tartalmazó, definiált médiumra cseréljük. Ezzel a lépéssel megvonjuk a sejtektől a szérumban található növekedési faktorokat és egyéb anyagokat, így a sejtek a folyamatos proliferáció mellett idegi irányba fognak differenciálódni. A retinsavas indukcióhoz képest a differenciálódás menete nem tér el, van azonban néhány lényeges különbség: az egyes stádiumok időben késve jelennek meg, az 5. napig nagymértékű sejtpusztulás figyelhető meg, kisebb a neuronok aránya és retinsav nélkül nem keletkeznek asztroglia-sejtek.

Korábbi vizsgálataink szerint az NE-4C sejtek és asztroglia-sejtek közös kultúráiban szintén megfigyelhető volt az idegi irányú differenciáció, jelezve, hogy valamilyen, az asztroglia-sejtek környezetében levő, esetleg általuk termelt faktor kiváltja az NE-4C sejtekben az idegi irányú elköteleződést. Erre a jelenségre kísérleteink első felében kerestük a megoldást.

### 1.3.3. A radiális gliasejtek

Egy más jellegű idegi őssejtként radiális glia-szerű sejtvonalat használtam. A továbbiakban csak radiális gliasejteknek nevezem őket. Ezek a sejtvonalak 14,5 napos embrióból illetve felnőtt egerek (P62) előagyából származnak (Markó és mtsai, 2011). A differenciálatlan sejtek radiális glia morfológiát mutatnak (9/A ábra), és a radiális gliára jellemző markereket is expresszálják, így a nestint, RC2-t és a Sox2-t. Különböző indukciós hatásokra idegsejteké (9/B ábra), asztroglia-sejteké (9/C ábra) és oligodendroglia-sejteké (9/D ábra) differenciálódnak. A differenciáltatás körülményei bővebben a 3.2.4. fejezetben olvashatóak. Vizsgálataink során két embrionális és két felnőtt egerből származó sejtvonallal dolgoztunk. Az embrionális sejtvonalak (RGI-1 és A2) 14,5 napos egér előagyából származik, amíg a felnőtt sejtek (SVZ\_M és HC\_A) 62 napos egér SVZ régiójából illetve hippocampusából lettek izolálva.



**9. ábra:** A radiális gliasejtek jellemzése. **A:** Fáziskontraszt kép a differenciálatlan sejtek tenyészetéről. **B:** EGF megvonás hatására kialakuló idegsejtek,  $\beta$ III-tubulin immunfestés. **C:** Asztrogliá irányú differenciáltatás során megjelenő GFAP immunpozitív sejtek. **D:** A radiális gliasejtekből differenciáltatható harmadik sejt típus, az oligodendrocita, konfokális mikroszkópos felvételen. **E:** Differenciációs markerek mRNS-ének vizsgálata Real Time-PCR segítségével indukátlan és idegi irányba indukált (4 és 8 nap) embrionális radiális glia klónban. **F:** Differenciációs markerek mRNS-ének vizsgálata Real Time-PCR segítségével indukátlan és idegi irányba indukált (4 és 8 nap) felnőtt radiális glia klónban.



## **2. Célkitűzések**

Munkám során a retinoidok szerepét vizsgáltam az asztroglia sejtek által kiváltott neurogenesisben valamint a retinsav szignalizáció és metabolizmus változásait tanulmányoztam elkötelezetlen és differenciálódott őssejtekben. Emellett igyekeztem azonosítani a központi idegrendszer retinsav reszponzív és retinsav termelő sejtjeit.

Vizsgálataim során a következő kérdésekre kerestem a választ:

- az asztroglia sejtek rendelkeznek-e a retinsav termelés képességével *in vitro*, ha igen, akkor a retinsav termelésük tehető-e felelőssé az asztroglia által indukált neuronális differenciáció megindításáért,
- van-e különbség a különböző agyterületekről származó asztroglia tenyészetek retinsav termelése és indukációs képessége között
- gátolható-e a gliális indukció a retinsav receptorának antagonistájával
- termelnek-e az asztroglia sejtek *in vivo* is retinsavat
- képesek-e az idegi őssejtek a retinsav termelésére
- ha igen, ezzel képesek-e a saját differenciációjukat autokrin módon szabályozni azonosíthatunk-e a felnőtt idegrendszerben retinsav reszponzív és potenciális retinsav termelő populációkat.

### **3. Anyag és módszer**

#### **3.1. Tenyésztőfelületek készítése**

A sejtek *in vitro* fenntartásához megfelelő módon előkészített tenyésztőaljzat szükséges. Minden általunk felhasznált sejtípus számára a poli-L-lizines (PLL) aljzat biztosítja a megfelelő letapadási felszint (A radiális gliasejtek speciális aljzatát lásd a 3.2.4 fejezetben). A PLL-es tenyésztőfelszín kialakításakor a tenyésztőedényeket 20 percig inkubáltuk steril desztillált vízben oldott 2 µg/ml végkoncentrációjú PLL (Sigma) oldattal, majd az oldat leszívása után steril körülmények között megszáritottuk őket. Az így elkészült edényeket legfeljebb egy hónapig tároltuk 4°C-on.

#### **3.2. Sejtenyészetek készítése és fenntartása**

##### **3.2.1. Primer asztrogliaenyészetek készítése és fenntartása**

Újszülött (P0-P2) egerekből bódítás, majd dekapitalás után steril körülmények között kiemeltük az agyakat, megtisztítottuk az agyhártyáktól, majd mechanikai darabolást követően PBS-ben oldott, 0,05%-os (v/v) tripszinben inkubáltuk 10 percig. Az előemésztett agyszövetet 10% borjúszérumot (FCS), 4 mM glutamint, 40 µg/ml gentamycint és 2,5 µg/ml amphotericin-B-t tartalmazó Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) tápoldatban Pasteur pipettával triturláltuk, így egyedi sejtekből álló sejtszuszpenziót kaptunk. A sejteket PLL aljzatú petricsészékbe, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú gázkörnyezetben, 37°C-on tenyésztettük. Az első napokban a törmelékot óvatos mosással távolítottuk el, a továbbiakban a tápfolyadékot kétnaponta cseréltük. Az *in vitro* fenntartás 7. - 10. napjára 95%-ban Gfap-pozitív sejtekből álló, összefüggő monolayer alakult ki. Szekunder asztroglia kultúrákat a primer tenyészetek tripszines passzálásával és az adott kísérlet által megkövetelt sejtszám kirakásával készítettünk. Ezek a tenyészetek is néhány napon belül a primerhez hasonló, összefüggő egysejtréteget képeztek.

##### **3.2.2. NE-4C sejtek fenntartása**

Neurális őssejtként – azaz több eltérő sejtípus kialakítására képes, önmegújító sejtként – p53 deficiens egérembriók elülső agyhólyagjából származó

neuroektodermális sejtek klónját, az ún. NE-4C sejtvonalat használtuk (Schlett és mtsai, 1997). Az NE-4C sejteket PLL-nel bevont tenyésztőedényben, 10% FCS-t, 4mM glutamint, 40 µg/ml gentamycint és 2,5 µg/ml amphotericin-B-t tartalmazó MEM tápfolyadékban tartottuk fenn. A szemikonfluens állapot elérésekor (amikor a sejtek még nem nőnek be teljesen a rendelkezésre álló tenyésztőfelületet) a sejteket tripszin (0,05%) oldattal felpasszáztuk, meghatároztuk a sejtszámot, majd adott sejtszámmal raktuk új tenyésztőedénybe (90 mm átmérőjű tenyésztőedény esetén  $5 \times 10^5$  sejt került a petricsészébe, 10 ml tápoldatban).

### 3.2.3. Embriónális őssejtek (ES) származása, tenyésztése és fenntartása

Az egérből származó embriónális őssejtek [R1 illetve CD1-GFP ES vonalak] fenntartása 15% FCS-sel (HyClone) kiegészített DMEM (Gibco) médiumban, fibroblaszt monolayeren, 50 U/ml penicillin (Sigma), 0,1 mM 2-merkaptoetanol (Sigma), 0,1 mM nem esszenciális aminosav oldat (Gibco) és 1000 U/ml LIF (ESGRO) jelenlétében történt. Az R1 ES sejtvonalt világszerte régóta ismert, a CD1-GFP sejtvonalt Dr. Gócsa Elen készítette (Gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Állatbiológiai Intézet). Mindkét sejtvonalt pluripotenciájának ellenőrzésére a sejteket 8 sejtés állapotú CD1-es embriókhoz adták, és kiméra állatokat hoztak létre (Nagy és mtsai, 2003). Az asztroglia/ES sejtek ko-kultúráinak létrehozása előtt az ES sejteket elődifferenciáltattuk: egyedi ES sejt szuszpenziót készítettünk (0,05% tripszinnel), majd meghatározott sejtszámban (400 sejt/20 µl; 15%-os FCS DMEM, LIF nélkül), függőcseppekben 1 napig aggregáltattuk őket. Egy nap elteltével az így kialakuló embryoid body-kat (EB) az asztrogliaesjtek felszínére helyeztük.

### 3.2.4. Radiális gliasejtek tenyésztése és fenntartása

A radiális gliasejtek 14,5 napos egér (CD1) embrióból illetve felnőtt egerek (CD1) különböző agyterületeiről (SVZ, HC) lettek izolálva. A sejtek szuszpenzióit AK-ciklo[RGDfC]-vel kikent petricsészékben növesztettük. A sejteken lévő médium (DMEM-F12; Sigma) 1% B27-et (Invitrogen), 20 ng/ml EGF-et (PeproTech), 40 µg/ml gentamicint (Sanofi-Aventis) és 2,5 µg/ml amphotericin B-t (Sigma) tartalmazott. A tenyészeteket 37 °C hőmérsékleten, 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó termosztátban neveltük. A médiumot kétnaponta cseréltük, a szemikonfluens tenyészeteket tripszin-EDTA

kezeléssel felszuszpendálva ültettük át majd tenyésztettük tovább. A harmadik átültetés után a nagyjából homogén tenyészetek radiális glia-szerű morfológiát mutattak. Ezekből a tenyészetekből klónozással hoztunk létre egy sejt eredetű vonalakat.

Idegsejt irányú differenciálathoz a konfluens tenyészetek tápfolyadékából megvontuk az EGF-et és így tartottuk fenn legalább 5-7 napig. Asztrogliára irányú differenciálódás kiváltásához a médiumot 5% FCS-sel (Sigma) egészítettük ki, így a tenyésztés 3. napján már asztroglia sejtek keletkeztek. Oligodendrocita irányú elköteleződéshez 4 napig FGF (PeproTech; 10ng/ml), PDGF (Sigma; 10ng/ml), forskolin (Sigma; 10 $\mu$ M) majd 4 napig trijód-tironin (Sigma; 30ng/ml) aszkorbinsav (Sigma; 200 $\mu$ M) jelenlétében növesztettük a tenyészeteket. A sejtvonalak létrehozását laboratóriumunkban Markó Károly és Kóhidi Tímea végezte. Bővebb leírás olvasható: Markó és mtsai, 2008, 2011.

#### 3.2.5. F9 sejtvonal fenntartása

Az F9 embrionális karcinóma riporter sejteket (Sonneveld és mtsai, 1999) kikenetlen tenyésztőedényben, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 10% FCS, 50% F12, geneticin (G418, 200  $\mu$ g/ml) tartalmú tápoldatban tenyésztettük. A sejtek passzálása az NE-4C sejtekéhez hasonlóan történt, azzal az eltéréssel, hogy a sejteket 1 mM EDTA-PBS-ben oldott tripszinnel (0,05%) szedtük fel az aljzatról. A tenyészeteken kétnaponta cseréltünk tápoldatot.

### **3.3. Kontakt és nem-kontakt ko-kultúrák kialakítása, fenntartása**

Vizsgálataink céljára újszülött egér előagyából származó asztrogliára tenyészetek és ES sejtek valamint NE-4C idegi őssejtek ko-kultúráit hoztuk létre.

#### 3.3.1. Kontakt ko-kultúrák kialakítása:

A konfluens primer vagy szekunder asztrogliára aljzatra 2-10x10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup> sűrűségben egyedi NE-4C sejteket ültettünk. A glia/ES ko-kultúrák esetén előaggregált EB sejtsomókat helyeztünk az asztroglia sejtek felszínére, 2 EB/cm<sup>2</sup> sűrűségben. A ko-kultúrákat szérumentes definiált médiumban tartottuk. Definiált médiumként 4 mM glutamint, ITS-t (inzulin 5  $\mu$ g/ml, transferrin 100  $\mu$ g/ml, szelénium 20 nM) és F12 nutriens médiumot tartalmazó MEM tápoldatot (a MEM:F12 aránya 1:3) használtunk,

amely nem tartalmazott retinoidokat. A tenyészeteket 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett termosztátban inkubáltuk, a tápoldatot kétnaponta cseréltük.

### 3.3.2. Nem-kontakt ko-kultúrák kialakítása:

Az asztroglia sejteket 90 mm átmérőjű petricsészében tenyésztettük. Amikor kialakult az összefüggő, egysejtrétegű aljzat, sejtkaparóval néhány kisebb területről eltávolítottuk a sejteket. 48 óra elteltével, előzőleg üveg fedőlemezekre kiültetett NE-4C sejteket ragasztottunk szilikonszírral a sejtmentes területekre (Környei és mtsai, 2005). A tenyészetek ily módon a kísérlet végéig csak a tápfolyadékön keresztül „érintkeztek” egymással, közvetlen sejt-sejt kapcsolat nem alakult ki közöttük. A nem-kontakt ko-kultúrákat a fent leírt szérumban tartottuk.

### **3.4. Neurális indukció all-transz retinsavval, retinollal, retinil-észterrel és szérumban megvonással**

Az NE-4C sejteket  $2,5 \times 10^4$  sejt/cm<sup>2</sup> koncentrációban ültettük ki. A retinsavas indukció során 100 nM koncentrációjú all-transz retinsavval (Sigma) indukáltuk a sejteket. A retinsavat a sejtek letapadását követően adtuk a tenyészetekhez, és 48 órán át hagytuk a tápoldatban. A retinolt és a retinil-észtert szintén 100 nM koncentrációban alkalmaztuk, a retinsavval ellentétben azonban a tenyészeteket a vizsgálat végéig folyamatosan kezeltük ezekkel. Emellett a szérumban a koncentrációját 5%-ra csökkentettük megelőzve az aljzatsejtek túlnövekedését az indukció során.

Az NE-4C sejtek szérumban megvonás – és ezzel növekedési faktorok megvonása – hatására is idegsejteké differenciálódnak, az előzőekhez képest némi időbeli késéssel. Ennek részletezését lásd az eredményekben.

### **3.5. Életképesség mérése**

Az életképesség mérést a sejtek tetrazólium sókat redukáló képességének meghatározásával végeztük (Mossman, 1983). Több (6-8) párhuzamosan kezelt, 50 µl tápoldatban levő mikrotenyészetet (96 lyukú szövettenyésztő tálcában) 0,25 mg/ml végkoncentrációjú 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazóliummal (MTT) 1,5-2 órán keresztül inkubáltunk, 37°C-os CO<sub>2</sub> termosztátban. Ezután háromszoros térfogatú savas (0,08 M HCl tartalmú) izopropil-alkohollal feloldottuk a sejtanyagot és a

keletkezett formazán kristályokat. Az így kapott oldatok optikai denzitását 570 nm-en, 630 nm-es referencia hullámhossz mellett ELISA fotométerben mértük.

### **3.6. Polimeráz lánreakciók – PCR**

#### **3.6.1. RT-PCR**

A PCR amplifikációkhoz a mintákat Trizolban (Sigma) lizáltam. A teljes RNS frakció szerves/szerveetlen extrahálással lett elválasztva. A DNS szennyezés DNase-I (Fermentas) kezeléssel eltávolítottam. Az elválasztott RNS-t RNáz/DNáz mentes vízbe oldottuk 1 µg/µl-es koncentrációban, majd további használatig -70 °C-on tároltuk. A reverz transzkripciót 1,5 µg RNS-ből First strand cDNA synthesis Kit (Fermentas) használatával végeztük, 2 µl RT puffer, 0,8 µl dNTP, 2 µl RT random primer, 1 µl RT enzim, 4,2 µl víz, és 10-10 µl minta felhasználásával. A reakció 25°C-on 10 percig, 37°C-on 120 percig majd 85°C-on 15 másodpercig futott. A PCR reakcióhoz 1 µl cDNS-t, 2,5 µl PCR puffert (10x), 1,5 µl MgCl<sub>2</sub>-ot (25 mM) 2,5 µl dNTP-t (2 mM), 0,2-0,2 µl primert (0,2 µg/µl), 0,1 µl Taq polimerázt (5 u/µl) és 18,5 µl DEPC vizet használtunk. Negatív kontrollként DNS templát nélküli reakcióelegyet alkalmaztunk.

Gén név	denaturáció	anelláció	elongáció	ciklus	primer szekvencia
	95 °C	40 mp	72 °C		

**3. táblázat:** Az RT-PCR reakciónál alkalmazott primer-párok szekvenciája és a kivitelezésnél alkalmazott paraméterek.

A minták cDNS tartalmát a hipoxantin guanin foszforibozil transzferázt kódoló (Hprt) „háztartási” génről átíródó cDNS mennyiségek alapján hasonlítottam össze. A Hprt primerek a 248 bázispár hosszú cDNS mellett felismerik az 1086 bázispár hosszú genomiális szekvenciát is, ezért használatával a genomiális szennyezés kimutatható. A génextpressziós vizsgálatokhoz csak genomiális DNS-től mentes mintákat használtam. Az amplifikációt Qiagen HotStar kittel végeztük. A méréshez Techne TC 512PCR berendezést használtunk. A polimeráz lánc-reakció (PCR) paramétereit minden primer-pár esetén optimalizáltuk. A PCR termékeket etidium-bromid tartalmú 1,25% agaróz gélen futtattuk, majd UV transz-illuminációval tettük láthatóvá.

### 3.6.2. Real-Time PCR

A mérésekhez a teljes RNS kinyeréséhez a mintákat RNazol RT oldatban lizáltuk. A DNS tartalom eltüntetéséhez rDNase kit-et (Macherey-Nagel) használtunk, majd NucleoSpin RNA Clean-up XS kit-et alkalmaztunk. Bár a mérések során intron-spanning primerekkel (4. táblázat) dolgoztunk, a genomiális DNS tartalom ACTB (beta-actin) primerrel is ellenőrizve volt. Az RNS minősége és mennyisége spektrofotometria és gél elektroforézis segítségével történt. A reverz transzkripció menete: 2 µg total RNS, 200 ng Random Primers (Invitrogen, Life Technologies) és 1 µl dNTP (10 mM mindegyik) hozzáadása után 5 perc inkubálás 65°C hőmérsékleten. 2 perc hűtés jégen, majd 200 U SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies), 40 U RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Life Technologies) és 5 mM DTT hozzáadása, a reakció-térfogat 20 µl. Inkubálás 25 °C-on 10 percig a random hexamer anellálásához, 5 óra 50 °C-on a cDNS átíráshoz és 15 perc 70 °C-on az enzim inaktiválásához. Relatív kvantitatív Real-Time PCR: a reakcióhoz 1 µl cDNS-t, 300 vagy 900 nM intron-spanning primert és 10 µl 2x Power Syber Green PCR Master Mix-et (Applied Biosystems) használtunk. A mintákból 3-3 párhuzamost futtattunk. Az amplifikációt StepOnePlus (Applied Biosystems) berendezésen végeztük. Az adatok a HPRT expressziójára lettek normalizálva, a kiértékelés a StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems) segítségével történt a  $\Delta\Delta C_T$  módszert használva. A relatív quantity (RQ) értékek One-Way ANOVA-val voltak analizálva. A Real-Time PCR reakciókat, a kiértékelést és a primerek tervezését Dr. Borsy Adrienn segítségével végeztem az MTA - Kémiai Kutató Központban.

gén név	primer szekvencia	CC	amplikon (nt)

**4. táblázat:** Az Real-Time PCR reakcióknál alkalmazott primerpárok és a reakció során alkalmazott paraméterek.

### **3.7. Különböző sejtek/szövetek endogén retinsav termelésének vizsgálata**

A retinsav termelést egy retinsav szenzitív promoter által vezérelt LacZ riporter-gént hordozó embrionális karcinóma sejtvonallal felhasználásával vizsgáltuk. Az F9 sejteket közvetlenül az asztroglia sejtek felszínére helyeztünk. A mérés mellett párhuzamosan, ellenőrizve, hogy az F9 sejtekben a transzgén működik-e, 100 nM retinsavval kezeltük, és a ko-kultúrákhoz hasonlóan, 37°C-os termosztátban, 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett tartottuk 20 órán keresztül. Az inkubációs idő eltelté után a retinsavval kezelt kontroll sejteket illetve az F9/asztroglia ko-kultúrákat 2%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk. A fixált tenyészeteken a  $\beta$ -galaktozidáz enzim termelődését a kék csapadékot eredményező enzim reakció (XGal; 5-bromo-4-kloro-3-indolil  $\beta$ -D-galaktopiranozid szubsztrát) segítségével mutattuk ki. Az előhívó törzsoldatot (25 mM



$K_4Fe(CN)_6 \times 3 H_2O$ , 25 mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 5 mM  $MgCl_2 \times 6 H_2O$ ) kalcium mentes foszfát pufferben ötszörösére hígítottuk. Ezzel az oldattal hígítottuk a dimetil-formamidba beoldott XGal oldatot (50 mg/ml) úgy, hogy a végkoncentrációja 1 mg/ml lett. A tenyészeteket megmostuk PBS pufferrel, majd hozzáadtuk az 1 mg/ml XGal oldatot, és egy éjszakán keresztül inkubáltuk 37°C-on, sötétben. Az enzimreakciót 0.1 %-os nátrium-azidos PBS-sel állítottuk le. Más esetekben az enzim kimutatásához kvantálható, fotometriás mérést használtunk. A meghatározás első lépéseként a lízis puffert (25 ml végtérfogatú desztillált vízbe oldott 1,485 g HEPES és 0,3843 g CHAPS, pH 7,5) ötszörösre hígítottuk desztillált vízzel. Az oldatokat a mérés során végig jégfürdőben tartottuk. A tenyészeteket a tápoldat leszívása után háromszor mostuk PBS-sel, majd a lízis puffer hozzáadása után 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követte az ultrahangos homogenizálás, majd centrifugálás (+4°C-on, 4300 rpm, 10 perc). A detektáláshoz 96 lyukú tenyésztőedénybe, lyukanként 50-50 µl felülúszót mértünk, majd ugyanennyi mérő puffert. (10 ml végtérfogatú desztillált vízbe oldott 200 mM  $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ , 40,66 mg  $MgCl_2$ , 13,3 mg ONPG [o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid] szubsztrát és 70 µl merkaptotanol, pH 7,5). Az oldatokat pipettával alaposan összekevertük. Az inkubálás 37°C-on, 30 percig történt. Az ONPG szubsztrát a β-galaktozidáz enzim jelenlétében sárga színreakciót ad. A reakciót 150 µl leállító oldattal (50 ml desztillált vízben 5,95 g  $Na_2CO_3$ ) állítottuk le. Végül a mintákat 410 nm hullámhosszon mértük ELISA fotométer segítségével.

### **3.8. HPLC – magas nyomású folyadék kromatográfia**

A mintavétel előtt a tenyészeteket háromszor 5 percig mostuk PBS-sel. A sejteket sejtkaparó segítségével távolítottuk el a petricsészék felületéről, majd PBS-ben eppendorf csövekbe pipettáztuk azokat. A fényérzékeny retinoidok megóvása érdekében a mintavételt tompított fényben végeztük, a mintákat pedig barna színű eppendorf csövekben szállítottuk. A HPLC-MS analízist Dr. Ralph Rühl a Debreceni Orvostudományi Egyetem Biokémia és Molekuláris Biológia Intézetében végezte az alábbiak szerint (Rühl, 2006). 100 mg mintát (ha kevesebb volt a minta, metanollal lett kiegészítve 100 mg-ra) háromszoros térfogatú izopropanollal hígított. A sejteket 10 másodpercig vortexelte, 6 percig rázatta, majd centrifugálta (13000 rpm, +4°C). A centrifugálás után a felülúszót eltávolította. A száraz kivonatokat 60 µl metanollal

reszuszpendálta. Vortexelés és rázatás után 40 µl, 60 mM-os vizes ammónium-acetát oldattal lettek hígítva. Ezután kerültek a minták az oszlopra, a kiértékelés utólag történt.

### **3.9. A retinsav szignalizáció gátlása**

A retinsav szignalizáció gátlásához egy pan-Rar antagonistát, azaz egy retinsav receptorhoz (Rar) kötődni képes vegyületet használtunk (Johnson és mtsai, 1995). A pan-Rar antagonista, az AGN193109 (Allergan) a retinoidokhoz hasonlóan fényérzékeny molekula, így a vegyülettel történő kezeléseket tompított fényben végeztük és a kezelt tenyészeteket fénytől védve tároltuk. Ugyancsak fénytől védve oldottuk be a törzsoldatot (10 mM). A törzsoldat oldószere DMSO volt. A törzsoldatból 100 nM-os hígítást használtunk, amely koncentrációt toxicitás mérések alapján határoztuk meg. A 100 nM antagonista nem csökkenti az őssejtek, illetve a gliasejtek életképességét. A ko-kultúrák kialakítása előtt a különböző őssejtpopulációkat 5 percig előinkubáltuk az antagonistával és csak ezután tettük a sejtszuszpenziót az asztrogliaesjtekre. A tenyészeteken a tápoldatot minden nap cseréltük.

### **3.10. Transzkardiális perfúzió**

Az immunhisztokémiai festésekhez használt agyszeletek előállításának első lépéseként a megfelelő korú egereket és patkányokat elaltattuk. Az altatáshoz Ketamin (10 mg/ml) és Xylazin (2 mg/ml) 2:1-es arányú keverékét használtuk 300 µl/10-15 g-os egér mennyiségben. Patkány esetében a beadott adag a Ketamin (6,25 mg/ml) és Xylazin (1,25 mg/ml) keverékéből 1 ml/ 200 g-os patkány volt. A megfelelő mélységű alvás elérése után feltártuk a mellüregét, és a szív bal kamrájába perfundáló folyadékkal feltöltött kanült vezetünk. A jobb pitvaron ejtett metszés után először PBS-t folyattunk át a testen, amíg a jobb pitvaron át már csak tiszta perfúziós folyadék távozott. Ezután 4% paraformaldehid oldatot áramoltattunk át a teljes fixálódásig. A koponya elválasztása és a bőr eltávolítása után a foramen magnumon át bevezetett ollóval mindkét oldalon felvágtuk a koponyát, majd csipesszel óvatosan felhajtva a koponyacsontot, az agyat kiemeltük, és 4%-os PFA oldatba helyeztük 24 órára. Az utófixálást követően, az agyat 25% glükózt és 0,1% nátrium-azidot tartalmazó oldatba helyeztük, és hisztokémiai feldolgozásig +4°C-on ebben az oldatban tároltuk (maximum 3 hónapig).

### **3.11. Metszetkészítés**

A fixált agyakból származó mikrotóm segítségével 30 µm vastag metszeteket készítettünk. A szárazjéggel keményre fagyasztott mintát a vágótökre rögzítettük néhány csepp PBS-sel. A 30 µm-es metszeteket nedves ecset segítségével távolítottuk el a kés felületéről majd Na-azidos PBS-sel töltött 24-es plate lyukaiba úsztattuk. A metszetek többféle festése érdekében 6-8 feltöltött lyukba helyeztük el egymás után a metszeteket. Így egy adott lyukba minden 7-9. metszet került, amelyek között átlagosan 210-270 µm távolság volt. Az úszó metszeteket további feldolgozásig 4°C-on tároltuk. Az immunfestés az agyszleteken annyiban tért el a tenyésztés-festéstől, hogy a Tritonos feltárást 0,5% koncentrációban 20-25 percig alkalmaztuk.

### **3.12. Immuncitokémiai és immunhisztokémiai festés**

Az üveg fedőlemezen növesztett sejt kultúrákat PBS-sel mostuk, majd 4%-os paraformaldehid (PFA) oldattal szobahőmérsékleten fixáltuk 20 percig. A PBS-sel többször mosott (3x5 perc) preparátumokat 20 percig 0,1%-os Triton-X-100 oldattal kezeltük, hogy a sejtmembránokat átjárhatóvá tegyük. Ezt követően a fixált tenyészeteket 3-5% szérumot (FCS) és 0,1% Na-azidot tartalmazó MEM vagy PBS oldattal inkubáltuk, hogy a nem specifikus kötőhelyeket blokkoljuk. A blokkolás után 0,1% Na-azid tartalmú, 5% FCS-PBS-ben oldott, megfelelő hígítású elsődleges ellenanyaggal egy éjszakán vagy hétvégén át inkubáltuk 4°C-on. A vizsgálatok során használt elsődleges ellenanyagok, alkalmazott hígításuk, és származásuk: *βIII-tubulin*, 1:1000, Sigma; *Gfap*, 1:1000, Sigma; *O4*, 1:500, Chemicon; *SSEA-1*, 1:1000, DSHB; *Titin*, 1:1000, DSHB; *NeuN*, 1:1000, Chemicon; *Nestin*, 1:1000, Chemicon; *β-galaktózidáz*, 1:1000, Invitrogen; *Claudin5*, 1:500, Invitrogen; *Raldh2*, 1:1000, Peter McCafferytől. A PBS-sel történő mosás után második réteggé biotin konjugátumot (1/1000, Vector) használtunk, amelyet 90 percen át hagytunk a mintákon. Harmadik réteggé Na-azid mentes PBS-ben oldott peroxidáz enzimmel vagy fluoreszcens festékekkel (Alexa 488, Alexa 594 vagy Alexa 633) jelölt avidint (Invitrogen) alkalmaztunk (1/1000). A peroxidáz enzim szubsztrátjaként 3,3'-diamino-benzidint (DAB) és 0,03% hidrogén peroxidot használtunk. A barna színű csapadék megjelenésekor 0,1%-os Na-azid tartalmú PBS-sel állítottuk le az enzimreakciót. A

preparátumokat Mowiol 4,88 fedőanyaggal fedtük le. Fluoreszcens immunfestés esetén a Mowiol bis-benzimidet (Hoechst) tartalmazott, amely a sejtmagokat tette láthatóvá. A festési kontrollként használt tenyészeteket, az első réteg ellenanyag kihagyásával, a fentiekkel azonos módon kezeltük. Az idegsejtek számát a neuron-specifikus  $\beta$ III-tubulinnal festett, diamino-benzidinnel előhívott preparátumokon határoztuk meg, a neuronokat a teljes, 12 mm átmérőjű fedőlemezen növesztett tenyészetekben megszámlálva. Mind a kontroll, mind a Rar-antagonistával kezelt tenyészetekből minimum 3-3 párhuzamost vizsgáltunk. A kezelt tenyészeteken a neuronok számát a kontroll százalékában adtuk meg.

### **3.13. Mikroszkópos vizsgálatok**

Az NE-4C és az ES sejtek morfológiai változásait, osztódását és motilitását önmagukban és asztrogliasejtekkel kialakított ko-kultúráikban, fáziskontraszt mikroszkóppal (Leica DM IRB inverz mikroszkóp) követtük nyomon. A „time-lapse” felvételek az ELTE Biológiai Fizika tanszékén készültek, Dr. Szabó Bálint közreműködésével. A tenyészeteket speciális, a mikroszkópok tárgyasztalára erősített, 37°C hőmérsékletet és 5% CO<sub>2</sub> tartalmú gázkörnyezetet biztosító mini-inkubátorokban növesztettük. A mikroszkópok tárgyasztalának pontos beállítását (Z irányú tárgyasztalmozgatás) és a megfelelő fókuszszík megtalálását számítógép vezérelte (Czirók és mtsai, 1998; Schlett és mtsai, 2000). A beállított látóterekről minden tízedik percben felvételeket készítettünk. A digitális kamera (Olympus Camedia 4040z) tízpercenkénti exponálását és a képek élesre állítását szintén számítógép irányította. A tenyészeteken naponta tápoldatot cseréltünk, mivel a kísérletben használt pan-Rar antagonista fényérzékeny, és a rendszeres megvilágítás hatására részben lebomolhatott. A kísérlet végén a tenyészeteket 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk, és immuncitokémiai módszerekkel azonosítottuk a neuron specifikus tubulint kifejező sejteket.

A képek egy részét fluoreszcens mikroszkóp (Zeiss Axiovert 200 M) segítségével készítettem, ahol jobb felbontás vagy nagyobb részletesség volt szükséges, ott konfokális mikroszkópot (NIKON A1R konfokális mikroszkóp – KOKI - NIKON mikroszkóp Központ) használtam.

### **3.14. Fluoreszcencia Aktivált Sejtszortírozó berendezés (FACS)**

A mérés során a Becton-Dickinson FACS Vantage áramlási citométer berendezését használtuk, ami analízisre és sejtválogatásra is alkalmas. Egy speciális, zárt fluidikai rendszerben a sejt/részecske-szuszpenziót a berendezés felszívja majd kontrollálható sebességgel egy vizsgáló cellába juttatja. Itt a folyadékáramra merőlegesen egy lézerfényforrás a folyadékáramot merőlegesen megvilágítja. A lézerfény útjában áthaladó részecskékről/sejtekről kétféle optikai jel képezhető le: az előre irányuló fényszórás (forward scatter) – mely a sejtmérettel/alakkal arányosítható -, és az oldalirányú (90°) fényszórás (side scatter), mely a sejtek/részecskék belső optikai törésmutatójával/optikai sűrűségével arányos. A műszer képes az analizált részecskék/sejtek elkülönítésére is, az előzőleg detektált tulajdonságok alapján, a felhasználó által kijelölt ('kapuzott') módon. Ezt a készülék a detektálási jelektől és a felhasználó által meghatározott paraméterhatároktól függően a sejteket tartalmazó folyadékcseppek szelektív elektromos feltöltésével, majd a tovább haladó folyadékcseppek egy feltöltött lemezpár között történő áthaladása során azok eltérítése révén, különböző felfogó tartályokba (pl. Eppendorf cső, plate lyukak) gyűjti. Főbb technikai paraméterek: 70 µm-es kapilláris méret (nozzle size), 488 nm-es lézerfényforrás, 530 nm és 585 nm emissziós szűrők, a szortírozás során ideális esetben 2000 sejt/másodperc nyomásfüggő sebesség. A méréshez a vizsgálni kívánt tenyészetből, szövet darabból egysejtsuszpenziót készítünk, amelynek ideális koncentrációja félmillió sejt/ml. A válogatás után a sejtek szérumot tartalmazó oldatba kerültek, majd centrifugálás után a kísérletnek megfelelően lizáló pufferbe vagy tenyésztőedénybe tettük őket.

### **3.15. Agilent RNS micro-array**

Az indukció különböző stádiumaiban levő NE-4C tenyészetekből nyert teljes RNS frakciókat AGILENT Mouse Developmental RNA microarray (Kromat Ltd, Budapest, Hungary) módszerrel is analizáltuk. Az RNS minőségét és mennyiségét Agilent 2100 Bioanalyzer készüléken vizsgáltuk meg. A reverz transzkripción keresztüli cDNS jelölést és a hibridizációt a gyártó utasításainak megfelelően a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetének Microarray Core Facility egysége

végezte G4120A Mouse Development Microarray platformon. A vizsgálathoz felhasznált anyagok az RNS tisztításhoz használt RNeasy Mini Kit (Qiagen) kivételével az Agilent (Agilent, Santa Clara, CA 9505, United States) cég termékei.

### **3.16. Statisztika**

Kísérleteink során a mérés típusától függő számú párhuzamos mérést végeztünk. Az eredmények értékelésekor kiszámoltuk az adott mérési csoport adatainak számtani középértékét (átlagát), valamint a korrigált tapasztalati szórást („standard deviation”, SD). A szükséges statisztikai próbákat (Student-féle t-teszt) Microsoft Excel programmal végeztem, szignifikánsnak  $p < 0,05$  értéket tekintettem.

## **4. Eredmények**

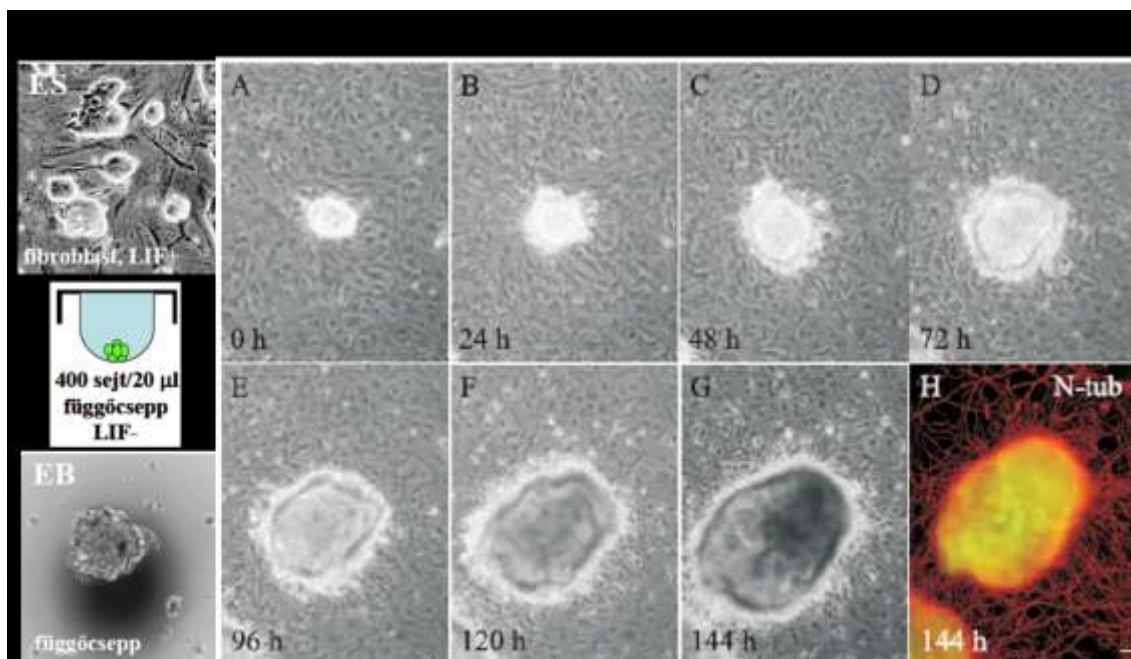
### **4.1. Az asztroglia sejtek retinsav termelésének vizsgálata**

#### 4.1.1. Idegsejtképződés asztroglia sejtek és különböző eredetű őssejtek ko-kultúráiban

A felnőtt agy neurogén régióiban az idegi őssejtek mikrokörnyezetének legfontosabb komponensei közé tartoznak az asztroglia sejtek, amelyek részt vesznek az idegi őssejtek fennmaradásának és differenciálódásának szabályozásában (Doetsch és mtsai, 1999a; Ma és mtsai, 2005). Az őssejtek és asztroglia sejtek kölcsönhatásainak vizsgálatához őssejtként embrionális őssejteket (ES) (Wobus és Boheler, 2005) és NE-4C immortalizált embrionális idegi őssejteket (Schlett és Madarász, 1997) használtunk. A kétféle sejtípust kontakt és nem-kontakt ko-kultúrákban vizsgáltuk (7/D ábra).

##### *4.1.1.1. Embrionális őssejtek neuronális differenciációja asztroglia jelenlétében*

Az ES sejtek és az asztroglia sejtek közötti kölcsönhatás vizsgálatára kontakt ko-kultúrákat hoztunk létre. Kezdetben az ES sejteket fibroblaszt sejtrétegen növesztettük LIF jelenlétében, majd függőcseppekben elő-differenciáltattuk őket (400 sejt/20  $\mu$ l; LIF megvonás) (10/a ábra). Az így kezelt ES-aggregátumokat (embryoid body, EB) asztroglia sejtek felszínére helyeztük. Az ES sejtek morfológiai változásait, osztódását és motilitását time-lapse mikroszkópos felvételekkel is nyomon követtük (10/b ábra). A ko-kultúrákban eltöltött első négy nap során az aggregátumok mérete folyamatosan növekedett, az ES sejtek rendszeresen osztódtak.



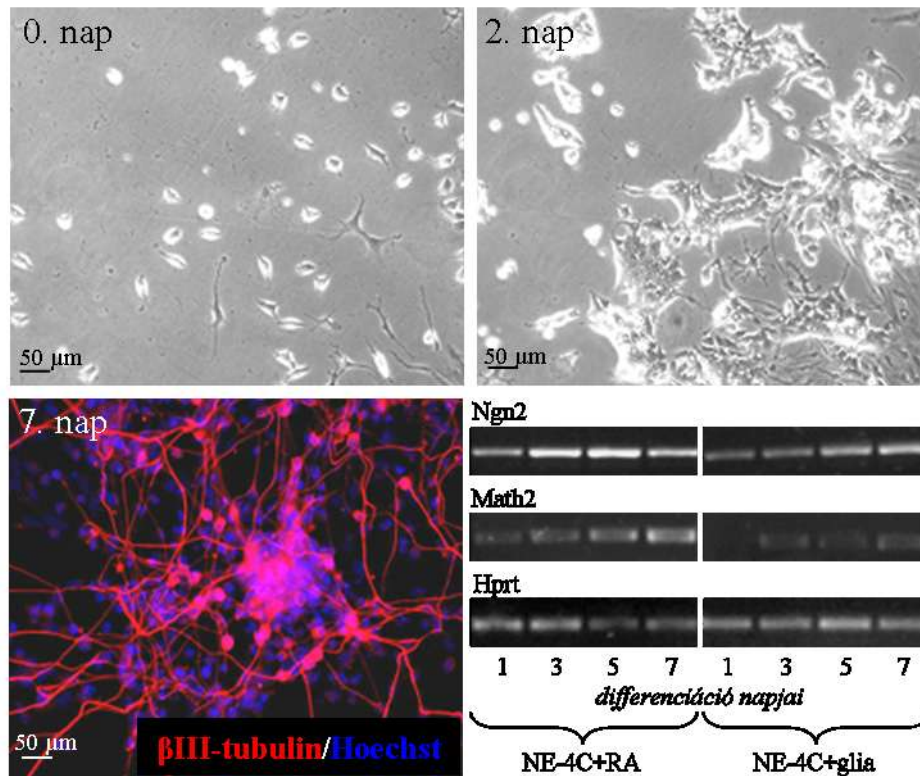
**10. ábra:** Embrionális őssejtek neuronális differenciációja asztroglia sejtek környezetében. **a):** Függőcseppekben az ES sejtek aggregátumokat hoznak létre (EB). **b):** Ezeket tenyésztjük tovább asztroglia sejtekkel kontakt ko-kultúrában. A hatodik napon kiterjedt nyúlványhálózatok voltak megfigyelhetők, amelyeket neuron specifikus  $\beta$ III-tubulin (N-tub) immunfestéssel (piros) azonosítottunk. Mércse: 50  $\mu$ m

A neuronális differenciációra utaló morfológiai változásokat a negyedik naptól kezdve figyelhettük meg. Ekkor jelentek meg az első, aggregátumokból kivándorló sejtek, amelyek jellegzetes nyúlványokat növesztettek és bipoláris morfológiát mutattak. A hatodik napon az aggregátumok körül már kiterjedt nyúlványhálózatokat láttunk. Az ES sejtekből tömeges mértékben képződő idegsejt morfológiájú sejteket neuron specifikus  $\beta$ III-tubulin immunfestéssel azonosítottuk (10/b/H ábra).

#### 4.1.1.2. NE-4C idegi őssejtek neuronális indukciója asztroglia hatására

Az asztroglia sejtekkel kialakított kontakt illetve nem-kontakt ko-kultúrában az NE-4C sejtek a közös tenyésztés második napjára, hasonlóan a retinsavas indukcióhoz, aggregátumokat képeztek (11. ábra). Az aggregátumokból a negyedik nap körül nyúlványos sejtek vándoroltak ki, egy hét elteltével pedig már kiterjedt nyúlványhálózatok voltak megfigyelhetők. Az idegsejtek azonosítása ebben az esetben is neuron specifikus  $\beta$ III-tubulin immunfestéssel történt.





**11. ábra:** NE-4C idegi őssejtek neuronális differenciációja asztroglia sejtek környezetében. A nem-kontakt ko-kultúrákban aggregátumok képződtek a tenyésztés második napjára, a hetedik npra már jelentős nyúlványhálózat keletkezett. A retinsavval illetve gliálisan indukált neuronális differenciáció előrehaladását egyes pro-neurális/neurális gének expressziójának növekedése jelzi. Ezt a folyamatot RT-PCR segítségével vizsgáltuk. A vizsgált gének: Ngn2: korai idegi marker, Math2: érett idegi marker.

A pro-neurális gének a fejlődés korai szakaszában fejeződnek ki, a neurogenesis első lépéseként és lehetővé teszik a sejtek idegi prekursorokká alakulását. A továbbiakban az idegi progenitor sejtekben kifejeződnek a neurális gének, és ennek hatására alakulnak érett idegsejtekké. A pro-neurális és neurális gének vizsgálatával képet kaphatunk a differenciációs folyamat előrehaladásáról. NE-4C sejteket indukáltunk retinsavval illetve asztroglia sejtekkel nem-kontakt ko-kultúrákban. Az indukció különböző napjain (1., 3., 5. és 7. nap) gyűjtött mintákból tisztítottunk RNS-t és RT-PCR segítségével mutattuk ki a Ngn2 (pro-neurális) és a Math2 (neurális) gének mRNS-ét (11. ábra). A vizsgált gének expressziójának időbeli változása az indukció során egymáshoz hasonlóan változott. Az indukció előrehaladásával a Ngn2 expresszió mértéke a retinsav hatására a 3.-5. napon volt a legmagasabb, míg asztroglia

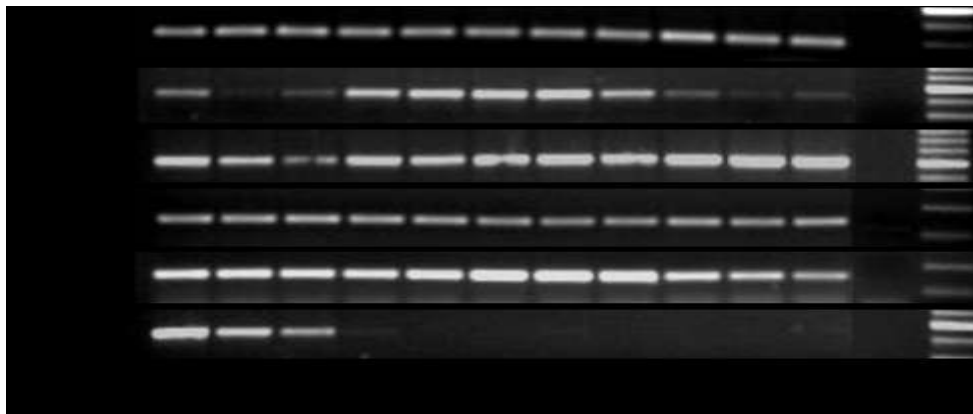
környezetében a 7. napig folyamatosan növekedett. A Math2 mRNS szintje szintén emelkedett a differenciáció során. Ez az emelkedés a retinsavas kezelést követően erőteljesebb volt, mint a gliával közös NE-4C ko-kultúrában.

Vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a gliális és a retinsavas indukció morfológiai változásaiban, időbeli lefutásában illetve a pro-neurális/neurális gének expressziós változásaiban nagyfokú hasonlóságot mutatott. Ezért feltételeztük, hogy az asztroglia sejtek endogén retinsav termelése lehet a felelős különböző összejt populációk neuronális differenciációjának megindításáért a közös tenyészetekben.

#### 4.1.2. Asztroglia sejtek retinsav termelésének kimutatása

##### *4.1.2.1. Retinsav szintetizáló enzimek kimutatása asztroglia sejtekből*

Az asztroglia sejtek retinsav termelő képességének bizonyítása érdekében RT-PCR segítségével vizsgáltuk, hogy az asztrociták expresszálják-e a retinsav szintéziséhez szükséges enzimek mRNS-ét (12. ábra). A retinsav termelés kulcsenzimeit a retinaldehid-dehidrogenázok (Raldh1,2,3), amelyek a sejtekben retinaldehidből all-transz retinsavat állítanak elő egy oxidációs lépésen keresztül. A retinsav előállításához elegendő csak az egyik típusú enzim jelenléte. A vizsgálat során egynapos egerekből, különböző agyterületekről izolált gliasejteket tenyésztettünk 30 napig. Ezekből a tenyészetekből vettünk mintát különböző időpontokban. A minták cDNS tartalmát a Hprt génről átírt cDNS arányok alapján hasonlítottuk össze. Az eredmények azt mutatják, hogy a tenyésztés során végig jelen van a Raldh2 és 3 enzim. Az 1-es típusú enzim mRNS-ének mennyiségében csökkenés tapasztalható a tenyésztés korai és utolsó szakaszában. A tenyészetek ellenőrzése végett megvizsgáltuk a Gfap és a Math2 expressziót is. A Gfap folyamatos jelenléte igazolja, hogy a sejtek valóban asztroglia sejtek, a Math2 fokozatos, de gyors eltűnése a primer tenyészetből pedig bizonyítja, hogy a kezdetben jelen levő idegsejtek kisselektálódnak és eltűnnek a kultúrákból. Az enzimek mRNS-ének jelenléte arra utal, hogy az asztroglia sejtek rendelkeznek a retinsav termelés képességével.

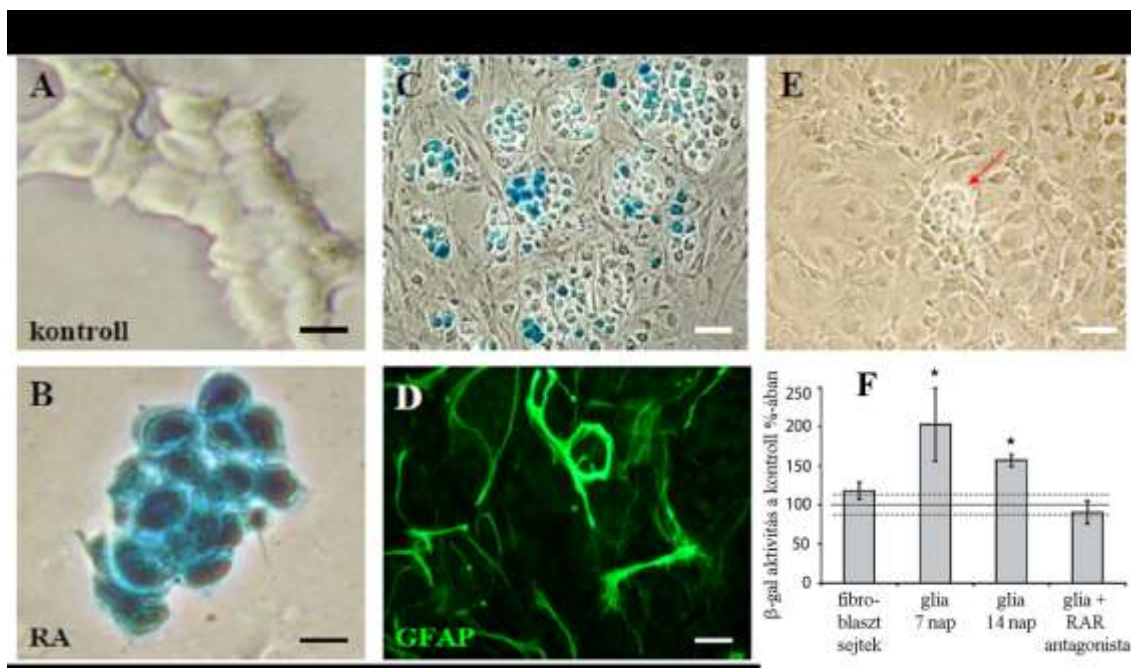


**12. ábra:** A retinsav termeléséhez szükséges kulcsenzimek, a retinaldehid-dehidrogenázok (1, 2, és 3) mRNS-ének kimutatása tenyésztett asztroglia sejtekből, RT-PCR segítségével. A Gfap az asztroglia sejtek markereként, a Math2 pedig az érett idegsejtek markereként jelzi a tenyészetben levő sejtek összetételét.

#### 4.1.2.2. Asztroglia sejtek RA termelésének kimutatása RA-szenzitív bioassay segítségével

A retinsav termelésért felelős enzimek mRNS-ének jelenléte azonban nem bizonyíték a retinsav termelésre. Ezért retinsav érzékeny bioassay-t alkalmaztunk. A különböző sejtek/szövetek endogén retinsav termelése az F9-RARE-lacZ embrionális karcinóma riporter sejt vonal (Sonneveld és mtsai, 1999) segítségével tesztelhető. Retinsav jelenlétében az F9-RARE-LacZ sejtek  $\beta$ -galaktozidáz ( $\beta$ -gal) enzimet termelnek. Ennek az enzimnek a jelenléte megmutatható a kék csapadékot adó szubsztrátjának (XGal) segítségével. Kísérleteim során teljes előagyból tenyésztett asztroglia sejtek és kontrollként primer fibroblaszt sejtek endogén retinsav termelését vizsgáltam. Az F9 sejteket 20 órán keresztül kontakt ko-kultúrákban tenyésztettük a vizsgálni kívánt sejt típusokkal, majd a szubsztrát hozzáadása után vizsgáltuk a kék szín megjelenését. Tapasztalataink szerint az asztroglia sejtek környezetében az F9 sejtek jelentős retinsav mennyiséget jeleztek, míg a kontrollként használt fibroblaszt sejtek esetében nem volt színreakció, jelezve, hogy ezek a sejtek nem termelnek retinsavat.

Annak érdekében, hogy a retinsav termelés mértékét mennyiségileg is meg tudjuk határozni, fotometriás mérést is végeztünk (13/F ábra). Ebben az esetben a  $\beta$ -galaktozidáz enzim szubsztrátja az ONPG volt. Az ONPG a  $\beta$ -galaktozidáz enzim jelenlétében sárga színreakciót mutat és a végtermék optikai denzitása mérhető. Az F9 sejtek már az olyan alacsony retinsav koncentrációra is reagálnak, mint a 1 nM (14/A ábra). A kiértékelések során az F9 sejteken mért alap optikai denzitást tekintettük 100%-nak (kontroll) és ehhez viszonyítottuk a többi tenyészetben mért értéket.



**13. ábra:** Az asztroglia sejtek retinsav termelésének kimutatása retinsav szenzitív F9 sejtek segítségével. **A:** Az F9 riporter sejtek  $\beta$ -galaktozidáz enzim termelése a kontroll tenyészetekben illetve **B:** retinsav kezelés hatására. **C:** F9 sejtek reakciója asztroglia sejtek környezetében. **D:** A C képen látható tenyészet GFAP immunfestés után. **E:** Fibroblaszt sejtek környezetébe helyezett F9 sejtek (piros nyíl). **F:** Az F9 sejtek  $\beta$ -galaktozidáz enzim termelésének kimutatása fotometriás méréssel, sárga színű, ONPG nevű szubsztráttal. Mércse (fekete): 10  $\mu$ m; (fehér): 50  $\mu$ m. ( $p < 0,05$ )

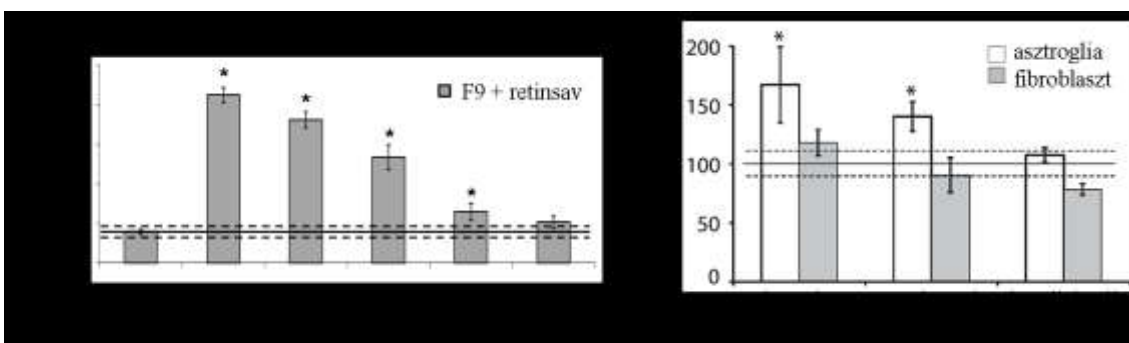
Az optikai denzitás jelentősen megemelkedett az asztroglia/F9 közös tenyészetekben, tehát az F9 sejtek retinsav tartalmat jeleztek a gliális környezetben, amikor egy hétig illetve két hétig fenntartott asztroglia tenyészetekkel dolgoztunk (13/F ábra). Ezzel szemben a fibroblaszt sejtek nem váltották ki az F9 sejtekben az enzim termelődését. Abban az esetben, amikor az asztroglia/F9 ko-kultúrákat retinsav receptor antagonistával kezeltük, gátolva a retinsav szignalizációt, az asztroglia által indukált riporter sejtek aktivációja elmaradt. Ennek magyarázata, hogy a retinsav receptor antagonistával meggátolta, hogy az F9 sejtek környezetében levő retinsav a receptorhoz kötődve elindítsa a  $\beta$ -galaktozidáz mRNS-ének átíródását, és így nem tette lehetővé az enzim szintézisét (13/F ábra).

#### 4.1.2.3. F9 sejtek aktiválódása kontakt és nem-kontakt ko-kultúrákban

Az eddigi kísérletek mindegyikében kontakt ko-kultúrában inkubáltuk együtt az F9 sejteket az asztroglia sejtekkel. Kíváncsiak voltunk, vajon az idegi irányú indukcióhoz hasonlóan, itt is működik-e az aktiválás nem-kontakt ko-kultúrákban, ahol a kétféle sejt típus között nincs közvetlen sejt-sejt kapcsolat. A korábbiakban bemutatott módon (7/D ábra) az F9 sejteket üveglemezen ragasztottuk be az asztroglia tenyészetekbe.

A kapott eredmények (14/B ábra) alátámasztják a korábbi feltevésünket, amely szerint a retinsav kiszabadul az asztroglia sejtekből és a folyadék közegen keresztül hatással van az F9 sejtekre. Ezzel szemben a kondicionált médium, amelyet frissen gyűjtöttünk a 24 órája szérumentes tápban tartott asztroglia sejtekről, nem aktiválta az F9 sejtekben a  $\beta$ -galaktozidáz enzim termelődését. Ez az eredmény azt a korábbi megfigyelést támasztja alá, amely szerint a kondicionált médium nem alkalmas az idegi irányú differenciáció kiváltására sem. Ennek magyarázata lehet, hogy a szérumentes környezetben a retinsav ugyanúgy ki van téve a környezeti hatásoknak (fény, oxidáció), ebben az esetben azonban nincsenek védő hatású szérumalkotók a közegben, mint például a szérum albumin vagy az Rbp.

A tenyésztett asztroglia sejtek tehát rendelkeznek a retinsav előállításához szükséges enzimekkel, és az általuk termelt retinsav kimutatható a retinsav érzékeny bioassay alkalmazásával.



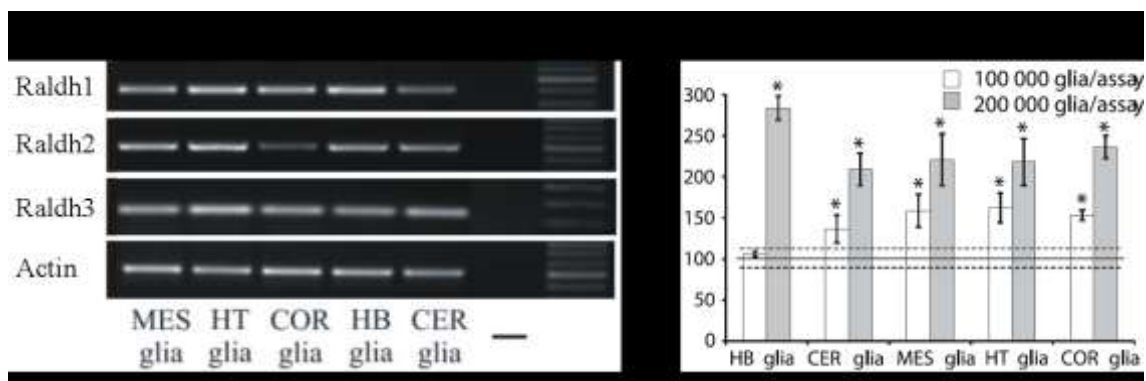
**14. ábra:** **A:** Az asztroglia sejtek érzékenysége retinsav kezelés hatására. A retinsavat különböző koncentrációkban adtuk az F9 sejtek tenyészetéihez ( $10^{-6} - 10^{-10}$  M). **B:** F9 sejtek  $\beta$ -galaktozidáz aktivitása kontakt és nem-kontakt ko-kultúrákban, illetve kondicionált médium kezelés hatására. ( $p < 0,05$ )

#### 4.1.3. Különböző agyterületekből izolált asztroglia retinsav termelésének vizsgálata

A korábban bemutatott kísérletek során teljes agyból tenyésztett asztroglia sejtekkel végeztük el a méréseket. Nem tudtuk azonban, hogy van-e regionális különbség az eltérő eredetű asztroglia sejtek retinsav termelése között. Ezért külön tenyészeteket hoztunk létre középagyi (MES), utóagyi (HB), kisagyi (CER), agykérgi (COR) és hipotalamuszból (HT) származó asztrogliaiból, amelyeket újszülött egerekből (P1-P2) izoláltunk és 2 hétig tenyésztettünk szérumot tartalmazó médiumban.

##### 4.1.3.1. Retinsav szintetizáló enzimek kimutatása asztroglia sejtekből

A két hétig tenyésztett asztroglia sejtekből mintákat vettünk és RT-PCR segítségével vizsgáltuk a retinsav termelés kulcsenzimeinek jelenlétét. A kapott eredmények szerint az eltérő agyterületekből tenyésztett asztroglia sejtek mindegyikében jelen vannak az Raldh1, Raldh2 illetve Raldh3 enzimek mRNS-ei (15/A ábra). Tehát a tenyésztett asztroglia sejtek bárhol is származnak, két hét tenyésztés után potenciálisan rendelkeznek a retinsav termelés képességével.



**15. ábra:** Különböző agyterületekről származó, tenyésztett asztroglia sejtek retinsav termelésének vizsgálata. **A:** A Raldh enzimek mRNS-ének kimutatása RT-PCR segítségével, 14 napos asztroglia tenyészetekből. MES: középagy, HT: hipotalamusz, COR: agykéreg, HB: utóagy, CER: kisagy. **B:** Az F9 sejtek  $\beta$ -galaktozidáz enzim termelésének kimutatása fotometriás méréssel, a különböző agyterületekről származó asztroglia sejtekkel kialakított tenyészetekben. A mérést kétféle sejtszámmal végeztük el (100 ezer és 200 ezer asztroglia sejt/assay). ( $p < 0,05$ )

#### *4.1.3.2. A retinsav termelésének kimutatása F9 sejtek segítségével*

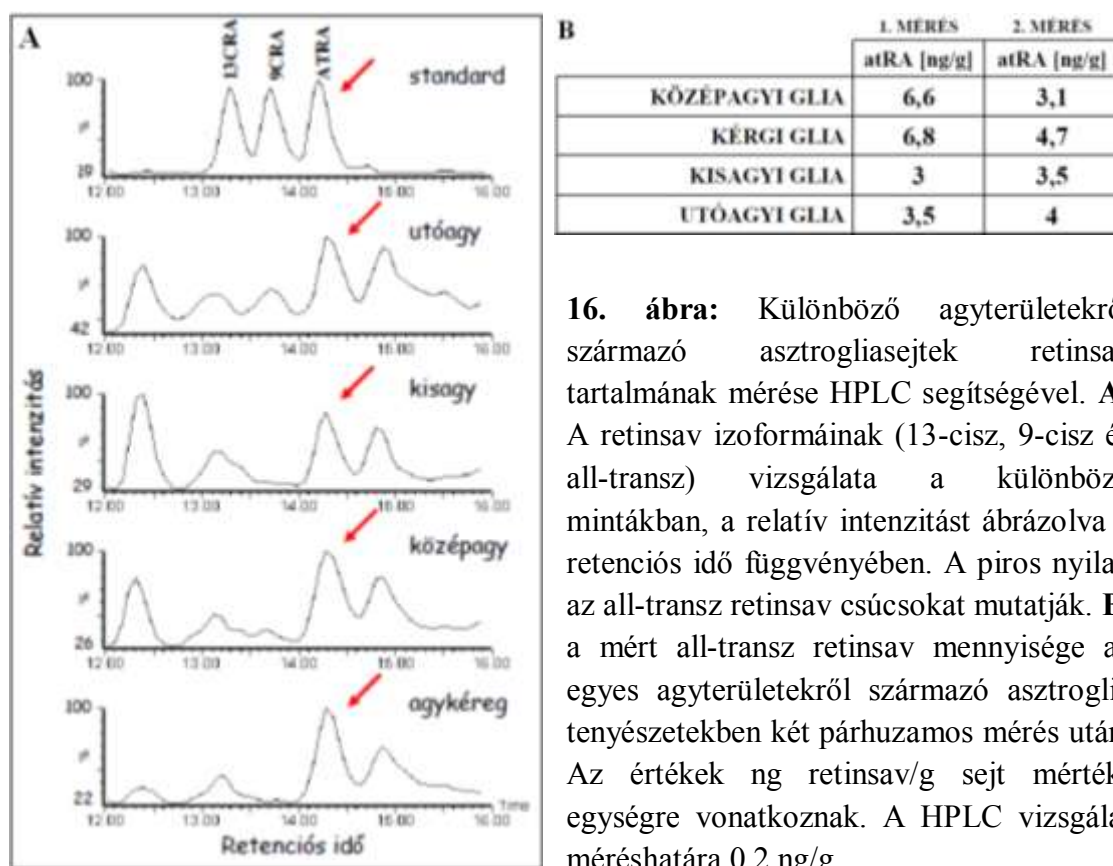
A fentiekben leírt, különböző asztroglia tenyészetekre, 28 nap tenyésztés után helyeztük rá az F9 sejteket és az inkubáció alatt a tenyészeteknek szérumentes közeget biztosítottunk. A  $\beta$ -galaktozidáz enzim ONPG szubsztrátját alkalmazva fotometriás méréseket végeztünk. Két különböző sejtszámmal dolgoztunk, egyik esetben 100 ezer, amíg a másik mérés alkalmával 200 ezer asztroglia sejtet helyeztünk a riporter sejtek környezetébe. A vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy – egyetlen utóagyból származó minta kivételével – minden mintában jelen volt a retinsav és az eltérő eredetű asztroglia tenyészetek retinsav tartalmában nem volt jelentős különbség (15/B ábra). Tehát a tenyésztett asztroglia sejt a származási helyüktől függetlenül termelik a retinsavat, viszont nem emelhetünk ki egyetlen agyterületet sem, amelyik a többinél nagyobb mennyiségben termelné azt. Annak érdekében, hogy az asztroglia sejt által termelt retinsav mennyiségének nagyságrendjét meg tudjuk határozni, retinsav koncentráció sorral kezeltünk F9 tenyészeteket (14/A ábra). Az így kapott retinsavas kalibrációs görbével összehasonlítva a gliális eredményeket megállapíthatjuk, hogy az asztroglia által termelt retinsav mennyisége az 1-100 nM-os retinsav kezelésnek feleltethető meg, függően az asztroglia sejt számától.

#### *4.1.3.3. A retinsav jelenlétének kimutatása asztroglia sejtéből HPLC segítségével*

A retinsav érzékeny bioassay segítségével tehát bizonyítottuk, hogy az asztroglia sejt által termelt retinoidok aktiválják a RARE-LacZ transzgént. Ez a módszer azonban nem alkalmas az all-transz, a 9- illetve a 13-cisz retinsav elkülönítésére, mivel az F9 sejtekben a  $\beta$ -galaktozidáz enzim termelését mindhárom izoforma kiválthatja. Ezért a specifikus kimutatáshoz másik módszert használtunk. Az all-transz retinsav és a többi izoforma jelenlétének direkt kimutatása az asztroglia sejtéből a magas nyomású folyadék kromatográfiával lehetséges. A méréshez különböző agyterületekből izolálva a sejteket, primer asztroglia tenyészeteket készítettünk, amelyeket 28 napig, szérumos tápoldatban tartottunk fenn. A mintavételt megelőzően a sejteket szérum és retinoid mentes tápoldatban tartottuk 24 órán át. A retinsav fényérzékenysége miatt a mintavételt tompított fényben végeztük, a mintákat



pedig barna színű eppendorf csövekben tároltuk és szállítottuk. A sejtek tenyésztését és a mintavételt mi végeztük, a HPLC mérést Dr. Ralph Rühl a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológia tanszékén. A HPLC mérések alapján minden asztroglia mintában kimutatható szignifikáns mennyiségű all-transz retinsav, függetlenül azok származási helyétől (16. ábra). A HPLC mérés alátámasztotta az F9 sejtekkel végzett kísérleteink eredményeit, amelyek szerint az asztroglia sejtek termelik a retinsavat, és kiegészítette azzal az ismerettel, hogy a termelt retinsav jelentős része a vizsgálataink középpontjában álló all-transz izoforma. A kapott értékek mindegyike jóval magasabb volt a módszer méréshatáránál (0,2 ng/g).



**16. ábra:** Különböző agyterületekről származó asztroglia sejtek retinsav tartalmának mérése HPLC segítségével. **A:** A retinsav izoformáinak (13-cisz, 9-cisz és all-transz) vizsgálata a különböző mintákban, a relatív intenzitást ábrázolva a retenciósi idő függvényében. A piros nyilak az all-transz retinsav csúcsokat mutatják. **B:** a mért all-transz retinsav mennyisége az egyes agyterületekről származó asztroglia tenyészetekben két párhuzamos mérés után. Az értékek ng retinsav/g sejt mértékegységre vonatkoznak. A HPLC vizsgálat méréshatára 0,2 ng/g.

A különböző agyterületekről származó, tenyésztett asztroglia sejtek mindegyikében megtalálható a retinsav termeléséhez szükséges enzimek mRNS-e. A tenyészetekben levő retinsav kimutatható a RA riportert sejtvonal segítségével, és a HPLC mérések alapján megállapítható, hogy ennek legnagyobb mennyiségben előforduló izoformája az all-transz retinsav. A tenyésztett asztroglia sejtek tehát származásuktól függetlenül képesek a retinsav termelésére.



#### 4.1.4. A retinsav szignalizáció gátlásának hatása az asztroglia által indukált idegsejtképződésre

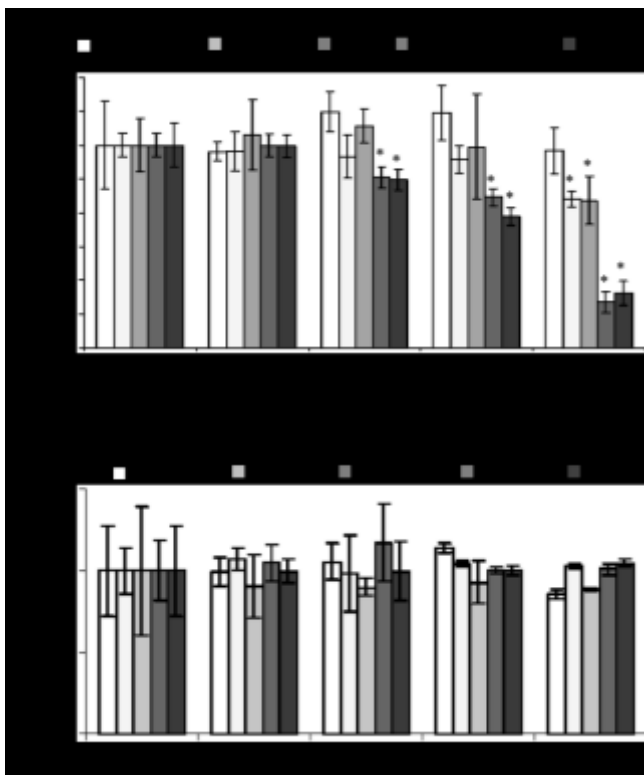
A retinsav a hatását a retinsav receptorokon (Rar és Rxr receptorok) keresztül fejti ki, amelyek a sejtmagban képeznek heterodimereket. Az all-transz retinsav a Rar receptorokhoz kötődve aktiválja számos gén átíródását. A retinsav receptorokon keresztül történő szignalizáció gátlásához egy pan-Rar antagonistát (AGN193109) használtunk. A Rar antagonista alkalmazásával a retinsav Rar-hoz kötődése kivédhető, így a szignalizációs útvonal gátolható. Ez az antagonista minden retinsav-receptor izotípushoz ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) képes kötődni. A Rar antagonista tulajdonképpen inverz agonista: nemcsak elfoglalja a ligandum-kötő helyeket a receptoron, de a transzkripció további gátlásaként segíti egyes ko-represszorok bekötődését is a promoter régióba.

##### *4.1.4.1. A retinsav szignalizációt gátló antagonista koncentrációjának kiválasztása*

A retinsav szignalizáció gátlásához alkalmazott Rar antagonista optimális kezelési koncentrációját a kezelt sejtek életképességének mérésével (MTT-redukció teszt, Mossman, 1983) határoztuk meg. Asztroglia, NE-4C, ES és P19 sejteket az antagonistát különböző koncentrációban tartalmazó szérumentes tápoldatban tenyésztettük 48 órán keresztül. Azért, hogy biztosak legyünk abban, hogy az antagonista nem befolyásolja a sejtek életképességét, megkerestük a legmagasabb, de még nem toxikus anyagkoncentrációt. Az életképesség-mérés eredményei szerint a különböző őssejtek eltérő érzékenységet mutattak a retinsav szignalizáció blokkolására (17/A ábra).

Az NE-4C sejtek életképessége akkor csökkent csak jelentősen, amikor 1  $\mu\text{M}$  vagy annál magasabb koncentrációjú Rar antagonistát alkalmaztunk. Az ES sejtek érzékenysége nagyobb volt (~100-szoros) mint az NE-4C sejteké. Az 1  $\mu\text{M}$  koncentráció már 50 %-os, a 100 nM 10-15 %-os életképesség csökkenést okozott az ES sejtekben. A P19 sejtek az NE-4C sejtekhez hasonlóan reagáltak, esetükben szintén az 1  $\mu\text{M}$  volt a legkisebb toxikus koncentráció. Az általunk vizsgált koncentrációk egyike sem volt hatással az asztroglia sejtek életképességére. Ebben az életképesség-mérésben az asztroglia tenyészetek teljes előagyból származtak. Mivel kísérleteink során az asztroglia sejtek különböző agyterületekről izolált tenyészetekkel is dolgoztunk, ezeken külön is elvégeztük az MTT-tesztet (17/B ábra). A különböző

asztroglia-tenyészeteket, az előző mérésben alkalmazott koncentrációkkal kezeltük. A teszt eredményei azt mutatják, hogy nincs különbség az asztroglia-sejtek életképességében az antagonisták hatására, függetlenül a tenyészetek származási helyétől. A különböző mérések eredményei alapján kísérleteinkben 100 nM pan-Rar antagonisták koncentrációját alkalmaztuk.



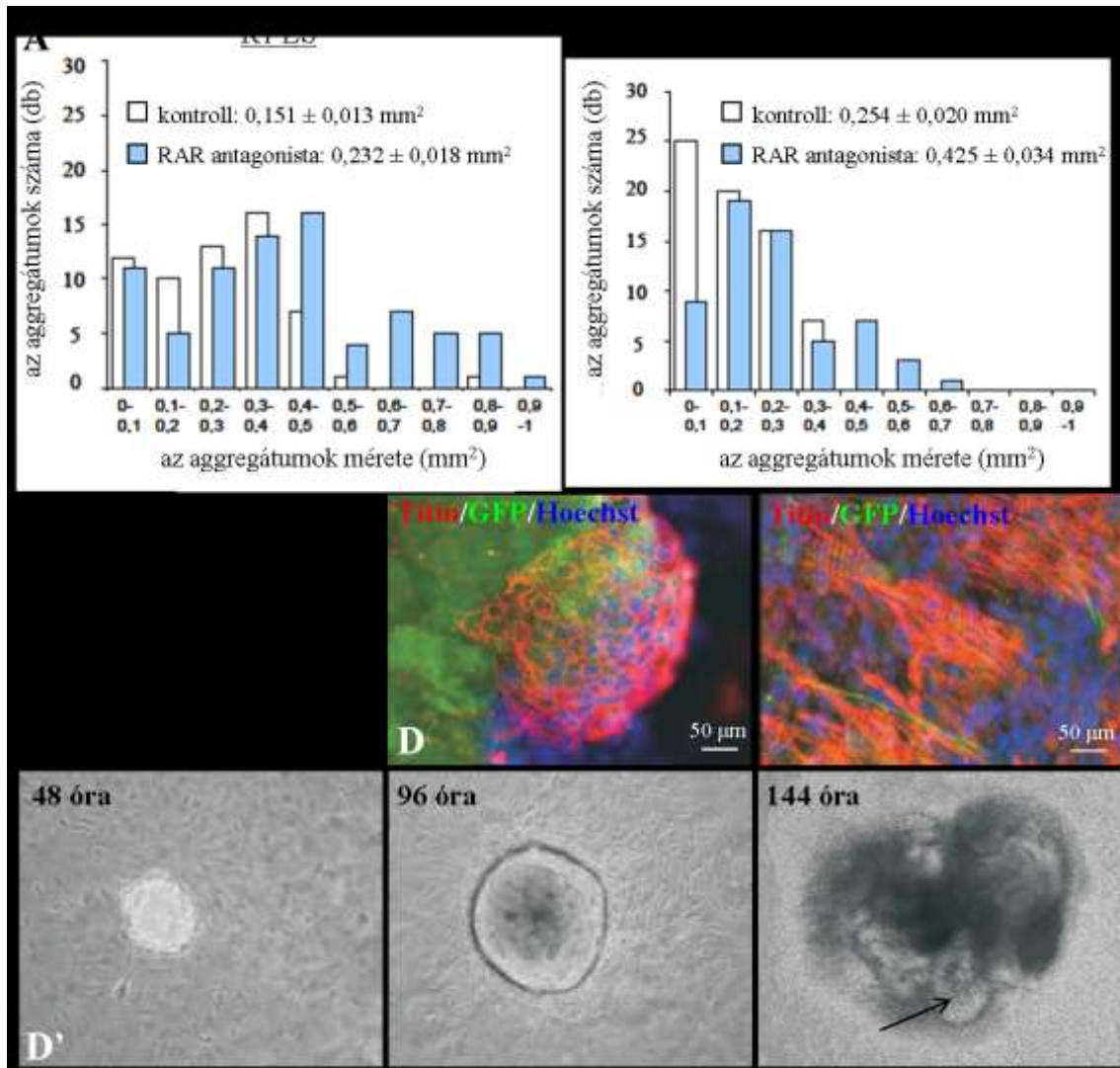
**17. ábra:** Az antagonisták hatása az életképességre. A kezelés szérumentes tápoldatban, 48 órán keresztül történt. A mérés során a nem kezelt sejteken mért optikai denzitás értéket tekintettük 100%-nak, és ennek arányában ábrázoltuk a többi értéket (n = 8). **A:** pan-Rar antagonisták (AGN193109) hatása asztroglia, NE-4C, CD1-GFP ES, R1 ES és P19 sejtek életképességére. **B:** Az antagonisták hatása a különböző agyterületekből származó asztroglia-sejtek tenyészetekre. CER: kisagyi-, HT: hipotalamikus-, MES: középagyi-, HB: utóagyi-, COR: agykérgi glia. (p<0,05)

További vizsgálataink során az asztroglia-sejtek és a különböző eredetű összejtek kontakt ko-kultúráit kezeltük Rar antagonistával. A kísérletektől azt vártuk, hogy kiderül, a retinoid receptorokon keresztül történő szignalizációnak van-e szerepe az asztroglia által indukált neuron képződésben.

#### 4.1.4.2. ES sejtek és asztroglia-sejtek ko-kultúráinak kezelése Rar antagonistával

ES sejtek és asztroglia-sejtek kontakt ko-kultúráiban a retinsav szignalizációt pan-Rar antagonistával gátoltuk, a ko-kultúra indításának kezdetétől folyamatosan a tenyészetek fixálásáig. A ko-kultúrák kialakítása során az asztroglia aljzatra ES aggregátumokat helyeztünk (2db EB/cm<sup>2</sup>). A hatodik napon a mintákat fixáltuk, és a keletkezett idegsejteket neuron specifikus  $\beta$ III-tubulin immunfestéssel azonosítottuk. Bár az ES sejtek esetében a 100 nM Rar antagonisták 10% életképesség-csökkenést

okozott (17/A ábra), mégis ezt a kezelési koncentrációt választottuk, mivel biztosítanunk kellett, hogy a gátlószer a több ezer sejtből álló, nagyméretű ES-aggregátumokba bediffundáljon. Az antagonistával kezelt illetve nem kezelt ko-kultúrákat összehasonlítva azt láttuk, hogy az antagonista hatására az aggregátumok száma nem csökkent jelentősen.



**18. ábra:** A retinsav receptor antagonist hatása az ES sejtek és az asztroglia sejtek ko-kultúráira. **A-B:** Az ES sejtek aggregátumainak méret-eloszlása a tenyésztés 6. napján a kontroll és az antagonistával kezelt tenyészetekben. A diagramokon az átlagos aggregátum-méret és az átlag közepes hibája van feltüntetve. **C:** A neurogén aggregátumok százalékos aránya az asztroglia/ES ko-kultúrákban (összes aggregátum = 100%). Három független kísérlet (I.-II.-III.) és két eltérő ES sejt vonal (R1 és CD1-GFP). **D és D':** ES/asztroglia ko-kultúrák mindennapos kezelése az antagonistával. Az aggregátumokban kivándorló, nyúlványos idegsejtek helyett pulzáló szívizom sejtek jelentek meg. A szívizom sejteket titin immunfestéssel azonosítottuk (piros). A fekete nyíl a harmadik képen a kinagyított területet mutatja.

A kontroll tenyészetekben összesen 199, míg a kezeltékben 193 aggregátumot találtunk. Ezek az adatok 3 független kísérletből származnak, amelyekben két különböző ES sejtípust használtunk. Azonos nagyítással készített mikroszkópos felvételeken számítógépes program (ImageJ) segítségével megmértük az aggregátumok területét (18/A és 18/B ábra).

Tapasztalataink szerint az ES aggregátumok mérete nem csökkent sem az R1-ES/asztroglia (18/A ábra) sem a CD1-GFP-ES/asztroglia (18/B ábra) ko-kultúrákban a Rar antagonistával kezelt tenyészetekben hatodik napjára. A méret-meghatározás szerint az antagonistával kezelt tenyészetekben több lett a nagyméretű (nagyobb, mint  $0.4 \text{ mm}^2$ ) aggregátum, mint a kontrollban.

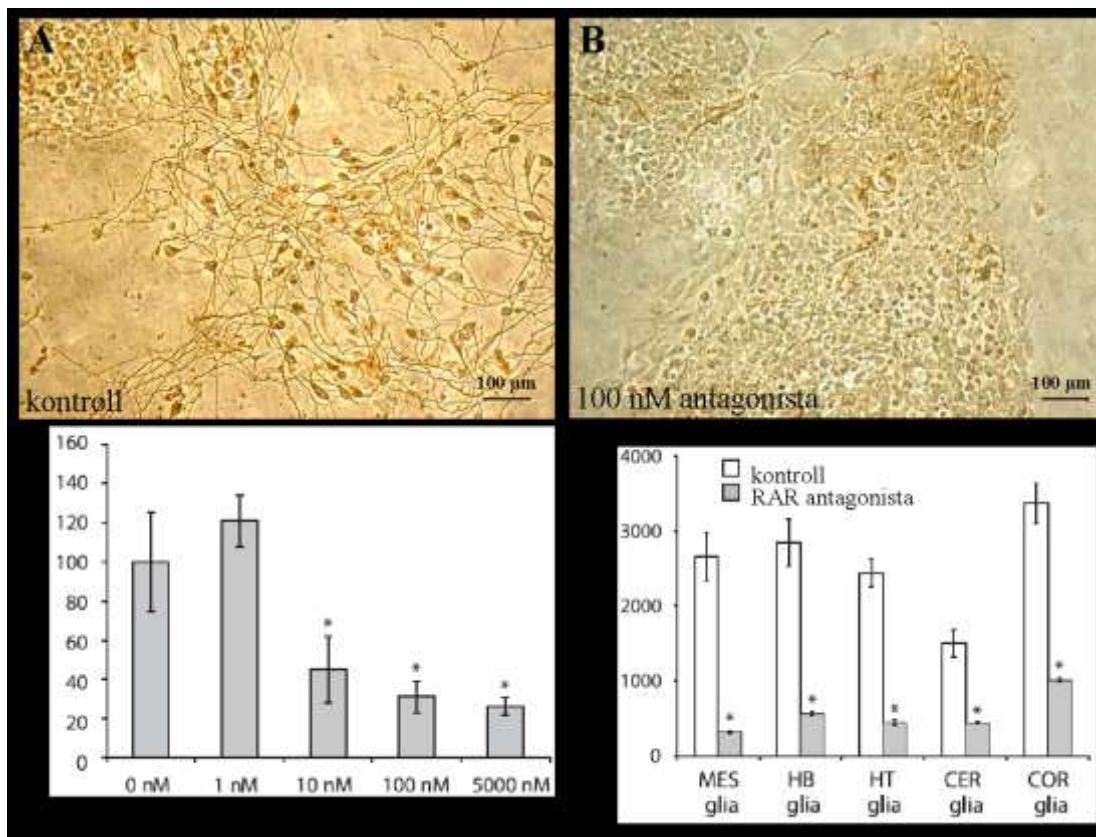
Bár a Rar antagonistával kezelt tenyészetekben az aggregátumok száma nem csökkent jelentősen, szignifikánsan kevesebb volt azon aggregátumok száma, amelyek azonosíthatóan neuronokat tartalmaztak. A kontrollban összesen 168, amíg a kezeltben mindössze 37 neurogén aggregátum volt megfigyelhető. Neurogén aggregátumoknak tekintettük azokat az ES eredetű sejtszuszpenziókat, amelyekben neuron specifikus  $\beta$ III-tubulin immunpozitív idegsejteket figyeltünk meg. A neurogén aggregátumok számát a kezelt és a kontroll tenyészetekben a 18/C ábra mutatja. A táblázat három független kísérlet eredményét tünteti fel, amelyeket két különböző ES sejtvonallal végeztünk. A Rar antagonistával kezelt tenyészetekben jelentős mértékben csökkentette az asztroglia által indukált neuronális differenciációt az ES sejtekben.

Nem várt kísérleti eredményként azt a jelenséget figyeltük meg, hogy a Rar antagonistával kezelt ES/asztroglia ko-kultúrákban keletkező aggregátumok kivándorló, nyúlványos idegsejtek helyett pulzáló sejteket tartalmaztak. Ezeket a sejteket titin immunfestéssel szívizomsejtekként azonosítottuk. (18/D ábra) Ez a jelenség arra utal, hogy a retinsav szignalizáció gátlása hátráltatja az idegi irányú-, de elősegíti az embrionális őssejtek szívizom irányú differenciációját.

#### *4.1.4.3. Az antagonistával kezelt tenyészetekben az NE-4C/asztroglia ko-kultúrákban*

NE-4C idegi őssejtek és asztroglia sejtek ko-kultúráiban is vizsgáltuk a Rar antagonistával kezelt tenyészetekben az aggregátumok méretét. Az NE-4C sejteket egyedi sejtuszuszpenzióként, közvetlenül raktuk az asztroglia sejtek felszínére (19. ábra). Az antagonistával kezelt tenyészetekben naponta frissítve, hét

napig tenyésztettük együtt a sejteket. A ko-kultúrákat a hetedik napon fixáltuk, a fixált tenyészeteket neuron specifikus  $\beta$ III-tubulinnal festettük, majd az így láthatóvá vált idegsejteket számoltuk (19/A-B ábra). Kontrollnak az antagonistával nem kezelt ko-kultúrákban keletkezett neuronok számát tekintettük. A kontroll tenyészetekhez képest az antagonistával kezelt ko-kultúrákban a keletkezett neuronok száma lényegesen kisebb volt. Tehát az antagonistista megakadályozta az asztroglia által indukált idegsejtképződést. Méréseink során ez a gátló hatás koncentráció-függő folyamatnak bizonyult (19/C ábra).



**19. ábra:** Idegsejtképződés az asztrogliasejtek és NE-4C sejtek kontakt ko-kultúráiban az antagonistista kezelést követően. **A:** asztrogliasejtek és NE-4C sejtek kontakt ko-kultúrája,  $\beta$ III-tubulin festés, előhívás DAB-bal. **B:** A ko-kultúrák kezelése az antagonistával,  $\beta$ III-tubulin festés, előhívás DAB-bal. **C:** Az idegsejtek arányának függése a RAR antagonistista koncentrációjától. **D:** Különböző agyterületekről származó asztrogliasejtek és NE-4C sejtek kontakt ko-kultúráinak kezelése a RAR antagonistával. ( $p < 0,05$ )

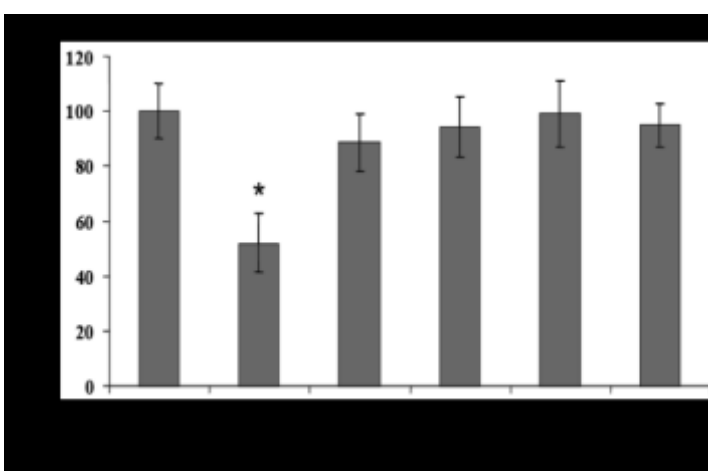
Olyan asztroglia/NE-4C ko-kultúrákat is kezeltünk az antagonistával, amelyekben az asztroglia más-más agyterületekről származott (19/D ábra). Mindegyik tenyészethez azonos koncentrációjú Rar antagonistát használtunk, azonos kezelési feltételek mellett.

A hetedik napon fixált tenyészetekben az idegsejt specifikus  $\beta$ III-tubulin immunfestés után a kezeletlen kontroll-tenyészetekhez viszonyítva számoltuk az antagonistával kezelt ko-kultúrákban keletkezett neuronokat. Az antagonistá minden esetben jelentős mértékben csökkentette az idegi irányú indukció mértékét. A hatásmechanizmus tehát független az asztroglia sejtek származási helyétől.

A retinsav receptoron keresztül történő szignalizációnak tehát bizonyítottan szerepe van az elkötelezetlen sejtek asztroglia által indukált idegi irányú differenciációjának szabályozásában.

#### 4.1.4.4. A retinsav receptoron keresztül történő szignalizáció korai szerepe

A pan-Rar antagonistával való kezelést az eddig bemutatott kísérletek során a ko-kultúrák kialakításának első pillanatától kezdődően azonnal alkalmaztuk: az asztroglia sejtek felszínére kerülő őssejt szuszpenzióit elő-inkubáltuk a Rar antagonistával. Így biztosítottuk, hogy a kétféle sejt típus közvetlen kapcsolatba kerülésekor se legyen lehetőség az indukció kiváltására. Abban az esetben, ha a Rar antagonistá kezelést csak a ko-kultúrában töltött második naptól kezdtük meg, a Rar antagonistá már hatástalannak bizonyult a differenciáció gátlásában (20. ábra). Ezek alapján a neurális differenciáció elindításához szükséges folyamatok egyetlen nap alatt indukálódtak. A retinsavnak tehát korai, iniciáló szerepe van az asztroglia által indukált idegsejtképződés kiváltásában.

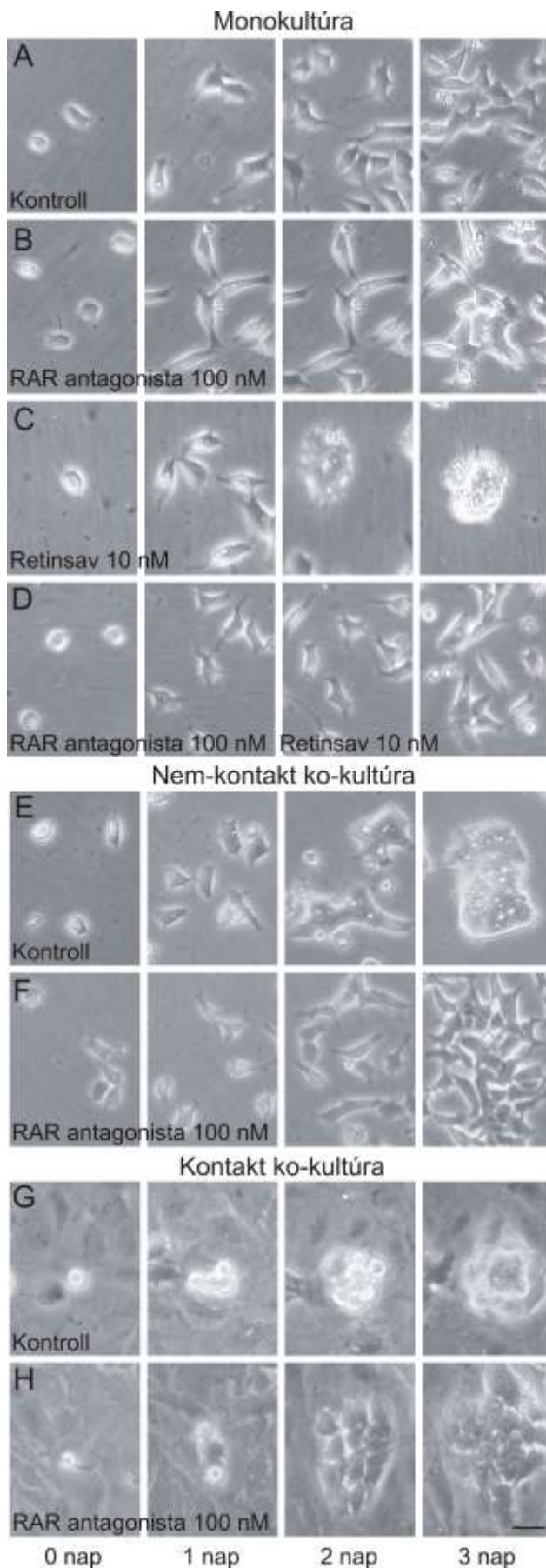


**20. ábra:** A pan-Rar antagonistá hatékonyságának vizsgálata előagyi asztroglia sejtek és NE-4C sejtek ko-kultúráiban a kezelés megkezdésének függvényében. Kontrollnak az antagonistával nem kezelt tenyészetekben számolt neuronokat tekintettük. ( $p < 0,05$ )

Az idegsejtképződés és érés menete nagyon hasonló az asztroglia által indukált és a retinsav által kiváltott neurogenesis során. A differenciáció első megfigyelhető

morfológiai eseménye az aggregátumok kialakulása ~30 órával az indukció kezdete után. Az aggregátumok létrejötte elengedhetetlenül fontos a későbbi idegi irányú differenciációhoz. Ahhoz, hogy lássuk, vajon a retinsav receptoron keresztül történő szignalizáció blokkolása befolyásolja-e ezt a korai differenciációs lépést, 100 nM antagonistával kezeltünk különböző módon indukált NE-4C sejteket (21. ábra) és time-lapse mikroszkópia segítségével nyomon követtük a korai történéseket. Az elemzés során bebizonyosodott, hogy az antagonista nem befolyásolja az indukálatlan sejtek motilitását, de megakadályozza az aggregátumok kialakulását (21/D ábra) amit a retinsavas kezelés vált ki (21/C ábra). Ugyanígy elmaradt az aggregálódás az asztroglia sejtekkel közös, antagonistával kezelt ko-kultúrákban (21/F és 21/H ábra). Az antagonista tehát az idegi irányú elköteleződéshez szükséges aggregációt is akadályozza. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az - asztroglia eredetű - retinsavnak korai hatása van a progenitorsejtek neuronális irányú elköteleződésére, amely folyamat, ha elkezdődik, a szignalizáció gátlása a továbbiakban hatástalan.





**21. ábra:** A retinsav szignalizáció gátlása megakadályozza az NE-4C neuroektodermális progenitor sejtek aggregátum képzését. A time-lapse mikroszkópos felvételek az NE-4C sejtek fejlődését mutatják monokultúrákban (A-D) és ko-kultúrákban asztroglia sejtekkel (E-H). **A:** NE-4C sejtek osztódása a szérummentes tápoldatban 3 napon keresztül. **B:** Az NE-4C sejtek kezelése 100 nM retinsav receptor antagonistával. **C:** 10 nM retinsav jelenlétében az NE-4C sejtek tömött aggregátumokat képeznek. **D:** A 100 nM Rar antagonistá kivédi a 10 nM koncentrációban hozzáadott retinsav hatását, nem történik aggregáció. Asztrogliaival nem-kontakt (E-F) és a kontakt (G-H) ko-kultúrákban az NE-4C sejtek sűrű aggregátumokat hoznak létre (E,G) úgy, mint a retinsavas kezelés hatására (C). A pan-Rar antagonistá gátolja az aggregátumképződést a kontakt (H) illetve a nem-kontakt (F) ko-kultúrákban. A tenyészeteket 3 napig tartottuk fenn. A felvételek time-lapse mikroszkópiával készültek, minden látótérrel 10 percenként, ezekből a képekből válogattuk a feltüntetett fotókat a 0., 1., 2. és 3. napról. Mércse: 25  $\mu$ m

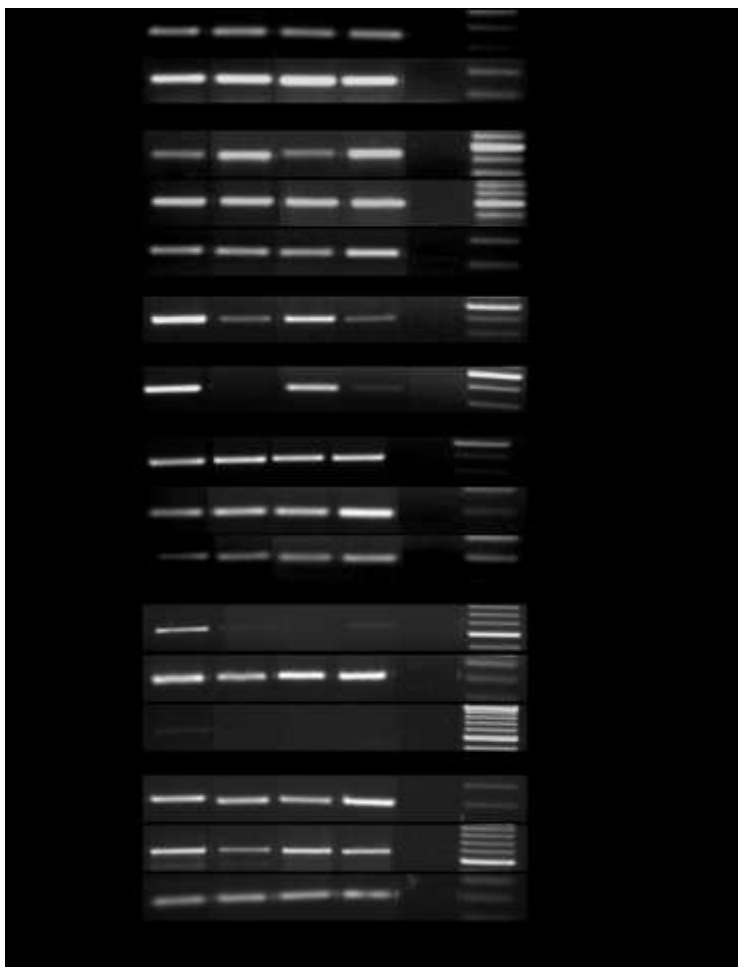


#### 4.1.5. Az asztroglia sejtek *in vivo* retinsav termelésének vizsgálata

Eddigi kísérleteink során bizonyítottuk, hogy a tenyésztett asztroglia sejtek képesek retinsavat termelni, és ezzel indukálni elkötelezetlen őssejtek és idegi őssejtek neuronális differenciációját. Ezek után felmerült bennünk a kérdés, hogy vajon rendelkeznek-e ezzel a képességgel *in vivo* is? Mivel a felnőttkori neurogén régiókban az őssejtek mikrokörnyezetének legfontosabb elemei az asztroglia sejtek, az esetleges retinsav termeléssel szabályozhatják azok idegi irányú fejlődését és ezen keresztül új idegsejtek kialakítását.

##### 4.1.5.1. A retinoid metabolizmus elemeinek vizsgálata RT-PCR alkalmazásával

Ahhoz, hogy az *in vivo* retinsav termelés képességét vizsgáljuk, tenyésztett és frissen izolált asztroglia sejteket hasonlítottunk össze. Az asztroglia sejteket *GFAP-GFP* transzgén egerekből különítettük el fluoreszcencia által aktivált sejtválogatással (FACS).

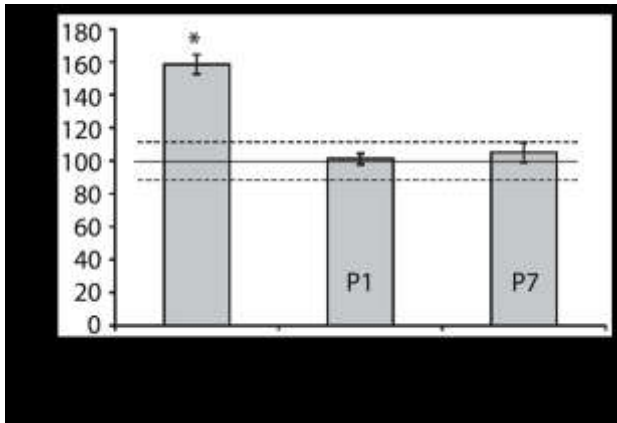


**22. ábra:** Tenyésztett és FACS segítségével izolált asztroglia sejtek retinoid metabolizmusának összehasonlítása. A retinoid metabolizmus elemeinek mRNS szintjeit RT-PCR segítségével vizsgáltuk. **P2:** 2 napos egér előagy minden sejtje, **T7:** 2 napos egér előagy 7 napig tenyésztett asztroglia sejtjei, **F7:** 7 napos egér előagyból akut módon izolált asztroglia sejtek, **FT7:** 2 napos egér előagyból izolált majd 7 napig tenyésztett asztroglia sejtek.

A vizsgálat során összehasonlítottuk, hogy 2 napos egér teljes előagyi mintájában (P2), 2 napos egér előagyából származó 7 napig tenyésztett asztroglia sejtekben (T7), 7 napos egér előagyából akut módon izolált asztroglia sejtekben (F7) és 2 napos egér előagyából FACS segítségével izolált, majd 7 napig tenyésztett asztroglia sejteiben (FT7) hogyan változnak a retinoid metabolizmus elemeinek mRNS szintjei (22. ábra). A kísérletek során kiderült, hogy a retinsav szintéziséért felelős Raldh enzimek mRNS-ei *in vivo* és *in vitro* is jelen vannak. A retinol sejtbe történő felvételéért felelős Stra6 receptor mRNS mennyisége a tenyésztés során lecsökken, de kis mennyiségben jelen van. Hasonló csökkenés figyelhető meg a tenyésztés hatására a raktározásért felelős Lrat enzim esetében is, amely esetében a tenyésztés következtében majdnem teljesen eltűnik a jel. Az intracelluláris megkötést és szállítást biztosító enzimek messenger szintje nem tér el jelentősen, és ez figyelhető meg a retinsav receptorok *in vivo* és *in vitro* összehasonlítása során is. A lebontást végző enzimek közül a *Cyp26a1* mRNS-e mutat érdekes eltérést, a teljes előagyi mintában megtalálható, a FACS módszerrel izolált, *Gfap*-t expresszáló asztroglia sejtekben azonban nem és a tenyésztés során sem jelenik meg. Ez arra enged következtetni, hogy ezt az enzimet az agyban más sejt típus termeli, ami a kultúrákban, a tenyésztés során nem marad életben. Az eredmények alapján tehát kijelenthetjük, hogy az asztroglia sejtek *in vivo* is rendelkeznek a retinsav termelés képességével, hiszen az ehhez szükséges enzimek mRNS-eit expresszálják.

#### 4.1.5.2. A retinsav termelés vizsgálata F9 sejtekkel

A tényleges retinsav termelés kimutatásához az F9 retinsav riporter sejt vonalat alkalmaztuk. Ezeket a sejteket helyeztük FACS alkalmazásával frissen izolált és az izolálás után tenyésztett asztroglia sejtek környezetébe (23. ábra). A mérés során azt tapasztaltuk, hogy a frissen izolált sejtek nem termelnek retinsavat, míg az izolálás után tenyésztett sejtek környezetében az F9 sejtek retinsav jelenlétét mutatták.



**23. ábra:** FACS segítségével izolált és a válogatás után tenyésztett asztroglia sejtek retinsav termelésének összehasonlítása F9 retinsav riporter sejtvonallal. A FACS módszerrel izolált sejtek 1 (P1) illetve 7 (P7) napos egerek előagyából származnak. A tenyésztett sejteket 1 napos egerek előagyából válogatva 7 napig tenyésztettük. Az értékek a kontroll F9 sejtek értékeinek %-ában vannak megadva. ( $p < 0,05$ )

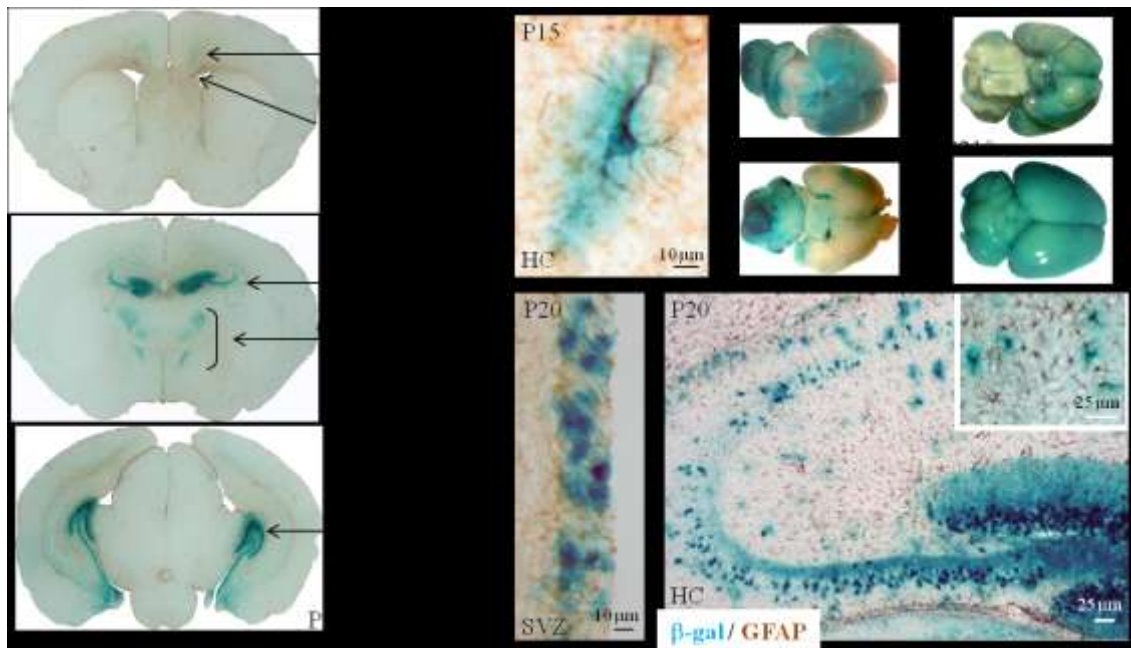
A magyarázat arra, hogy ha a sejtek *in vivo* is rendelkeznek a megfelelő enzimek mRNS-ével, még sincs kimutatható retinsav termelés, többféle lehet. Elképzelhető, hogy a termelt retinsav mennyisége olyan kicsi, hogy az F9 sejtek érzékenysége nem elegendő a kimutatáshoz. Másik lehetőség, hogy az asztroglia sejtek az agy szövetében valamilyen gátlás hatása alatt állnak és ez alól a gátlás alól kiszabadulva a tenyésztés során megjelenik a termelés. Harmadik lehetőség szerint a tenyésztés során egy olyan sejtpopulációt szaporítunk fel, amelyekben a retinsav termelés valamiféle előnyt jelenthet a többi sejt szaporodásához képest. Mindezek mellett elképzelhető, hogy nem csak az asztroglia sejtek rendelkeznek ezzel a képességgel, hanem esetleg az őssejtek vagy más sejt típusok is termelhetnek retinsavat, befolyásolva ezzel a neurogenézist, és számos más agyi funkciót, amelyre hatással van a retinsav felnőtt korban (1.2.2.4. fejezet).

## **4.2. Retinsav termelés a központi idegrendszerben**

### **4.2.1. A retinsav jelenléte az agyban**

Az *in vitro* kísérletek mellett ellenőriztük, hogy jelen van-e a retinsav az agyban, és ha igen, akkor vajon honnan származik, és milyen szerepe lehet?

A retinsav lipídoldékony, könnyen diffundáló molekula. E tulajdonságai miatt *in vivo* nehezen kimutatható, az alap immunhisztokémiai módszerek nem alkalmasak erre. Ezért kísérleteink során más módszert alkalmaztunk. A retinsav jelenlétét az agyban a *RARE-hspLacZ* transzgén egértörzs (Rossant, 1991) segítségével vizsgáltuk. A retinsav riporter egerek, az F9 sejtekhez hasonló transzgén konstrukciót expresszálnak. A pozitív reakció jelzi, ha a sejtek környezetében illetve a sejtekben retinsav van jelen, azonban nem bizonyítja, hogy ezek a sejtek maguk termelik a retinsavat. Így ebben az esetben nem retinsav termelő hanem retinsav reszponzív/szenzitív sejtekről beszélhetünk. A retinsav szenzitív sejtek elhelyezkedését különböző életkorú riporter egerekben vizsgáltuk. Erre vonatkozó kísérleteket már több munkacsoport végzett, a lokalizációra vonatkozó eredményeink összhangban vannak vizsgálataikkal. (Wagner és mtsai, 2002, 2006; Mey és McCaffery, 2004; Lane és Bailey, 2005; Környei és mtsai, 2007). Elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy a felnőtt agyban találunk-e bármilyen bizonyítékot arra, hogy a retinsav befolyásolhatja-e az idegsejtek képződését. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy felnőtt egér agyában a retinsav jelenléte erősen lokalizált. Ezek a felnőttkori neurogén régiók (SGZ és SVZ), néhány talamikus mag és az agykéreg mélyebb rétegei (24. ábra). Mindezek mellett erős színreakciót mutatott az agyhártya is, azt jelezve, hogy a meningeális képletek a teljes élet során jelentős mennyiségű retinsavat tartalmaznak (24. és 28. ábra). A retinsav az agyhártyából könnyedén juthat a szomszédos parenchimába diffúzióval.

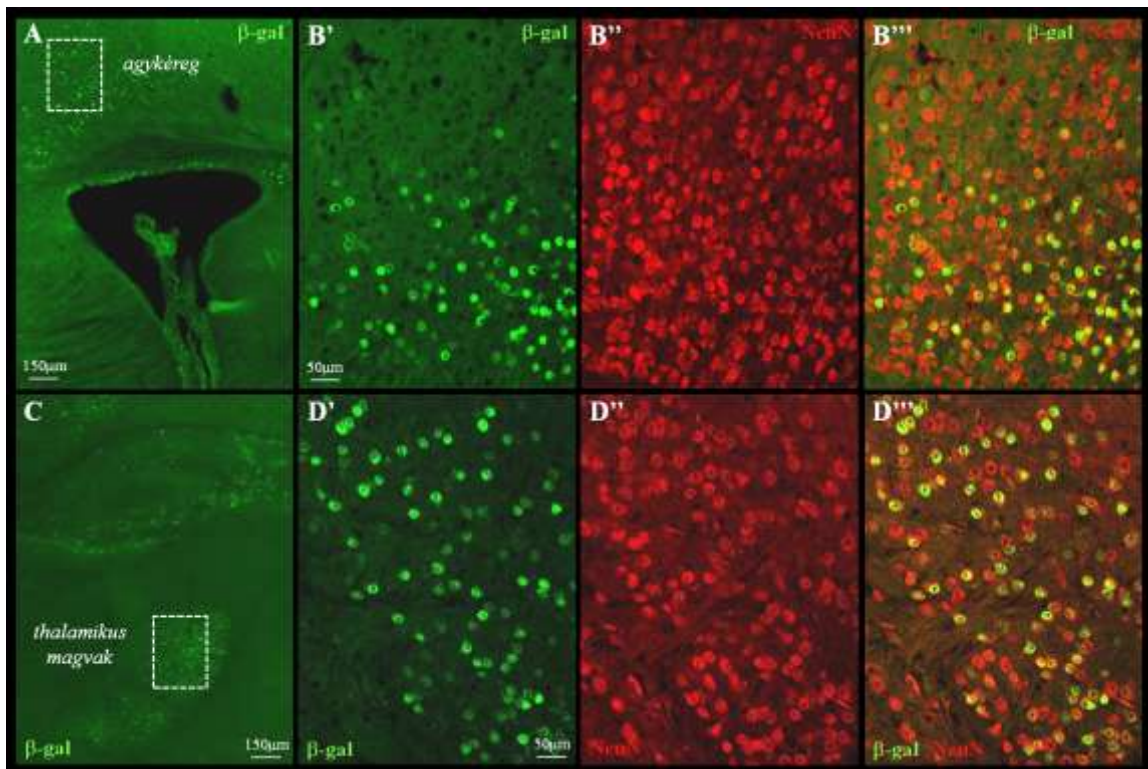


**24. ábra:** Különböző korú *RARE-hspLacZ* transzgén egérből származó agyak és agyszeletek. A  $\beta$ -galaktozidáz enzimet a kék csapadékot adó szubsztrátjával az X-Gal-lal mutattuk ki. Az asztroglia sejteket GFAP festéssel azonosítottuk (barna).

A további vizsgálatainkhoz a  $\beta$ -galaktozidáz enzimet felismerő ellenanyagot használtunk és fluoreszcens festéssel tettük láthatóvá. Az egyes sejttípusok azonosításához a  $\beta$ -galaktozidáz mellé asztroglia sejtekre (Gfap), érett idegsejtekre (NeuN) és fiatal progenitor sejtekre (nestin) specifikus markereket festettünk. A fluoreszcens jelölésnek köszönhetően az értékeléshez a felvételeket nagyobb felbontást biztosító fluoreszcens és konfokális mikroszkóppal készítettük. Vizsgálataink során végigjártuk azokat az agyterületeket, amelyeken transzgén-aktiválódást figyeltünk meg az X-Gal festéssel.

A nem neurogén zónákban, így az agykéreg mélyebb rétegeiben és a talamikus magvakban a  $\beta$ -galaktozidáz pozitív sejtek nem mutattak kettős jelölődést a Gfap és a nestin markerekkel, ezzel szemben a sejtek mindegyike NeuN immunpozitív volt (25. ábra).

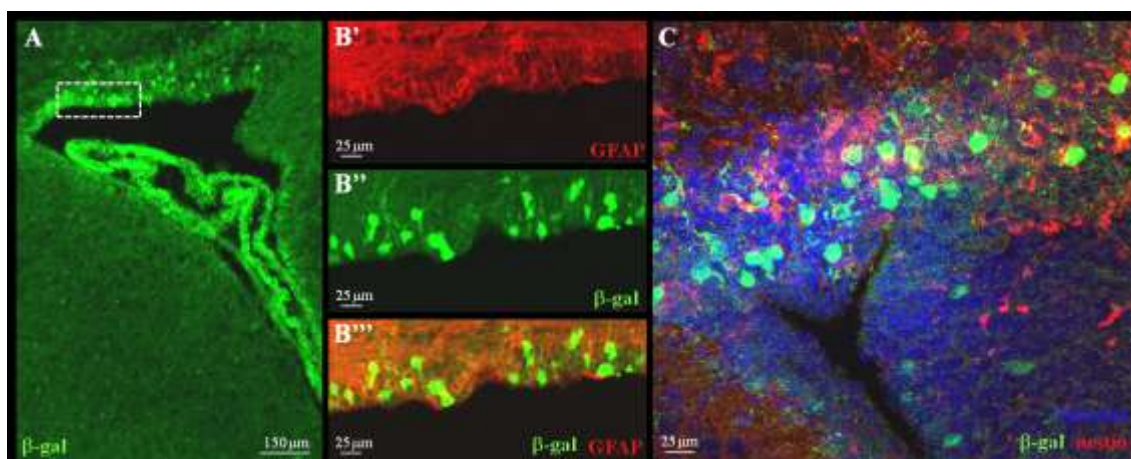
Tehát ezen a két agyterületen a retinsavra érzékeny sejtek érett idegsejteknek bizonyultak. Ezekben a régiókban tehát a retinsavnak nem a neurogenesisben, hanem valamilyen más, általunk nem vizsgált folyamatban lehet szerepe.



**25. ábra:** 65 napos *RARE-hspLacZ* riporter egér agyszeletein fluoreszcens festéssel jelölt  $\beta$ -galaktozidáz (zöld) és NeuN (piros). **A:**  $\beta$ -gal jelölés az oldalkamra környékén, a fehérrel keretezett rész jelöli az agykéreg azon részét, amely a B jelzésű képeken nagyobb nagyítással látható. **B:** Az agykéreg mélyebb rétegeiről készült nagyobb nagyítások, ugyan arról a látótérrel. **C:**  $\beta$ -gal jelölés a thalamikus magvak és a hippocampus területén. A fehérrel keretezett rész a D jelzésű képeken nagyobb nagyítással látható. **D:** A thalamikus magvokról készült nagyobb nagyítások, ugyan arról a látótérrel.

A szubventrikuláris zóna a felnőttkori idegsejtképződés egyik helyszíne. Az itt keletkező új idegsejtek a rostrális migrációs ösvényen vándorolva és érésüket befejezve jutnak a szaglógumókba. Ezen az agyterületen nem találtunk olyan retinsav szenzitív sejteket amelyek NeuN festődést mutattak, tehát nincsenek érett neuronok, amelyek reagáltak volna a környezetükben levő retinsavra. Ezzel szemben vannak a  $\beta$ -galaktozidáz enzimre és a Gfap-ra, illetve a nestinre kettősen jelölődő sejtek (26. ábra). Tehát a kamrafal-menti sejtpopulációban a retinsavra érzékeny sejtek egy kis része asztroglia-sejt, egy részük pedig idegi progenitor. Az oldalkamrában elhelyezkedő choroid plexus is erős és egyértelmű  $\beta$ -gal immunfestődést mutat.

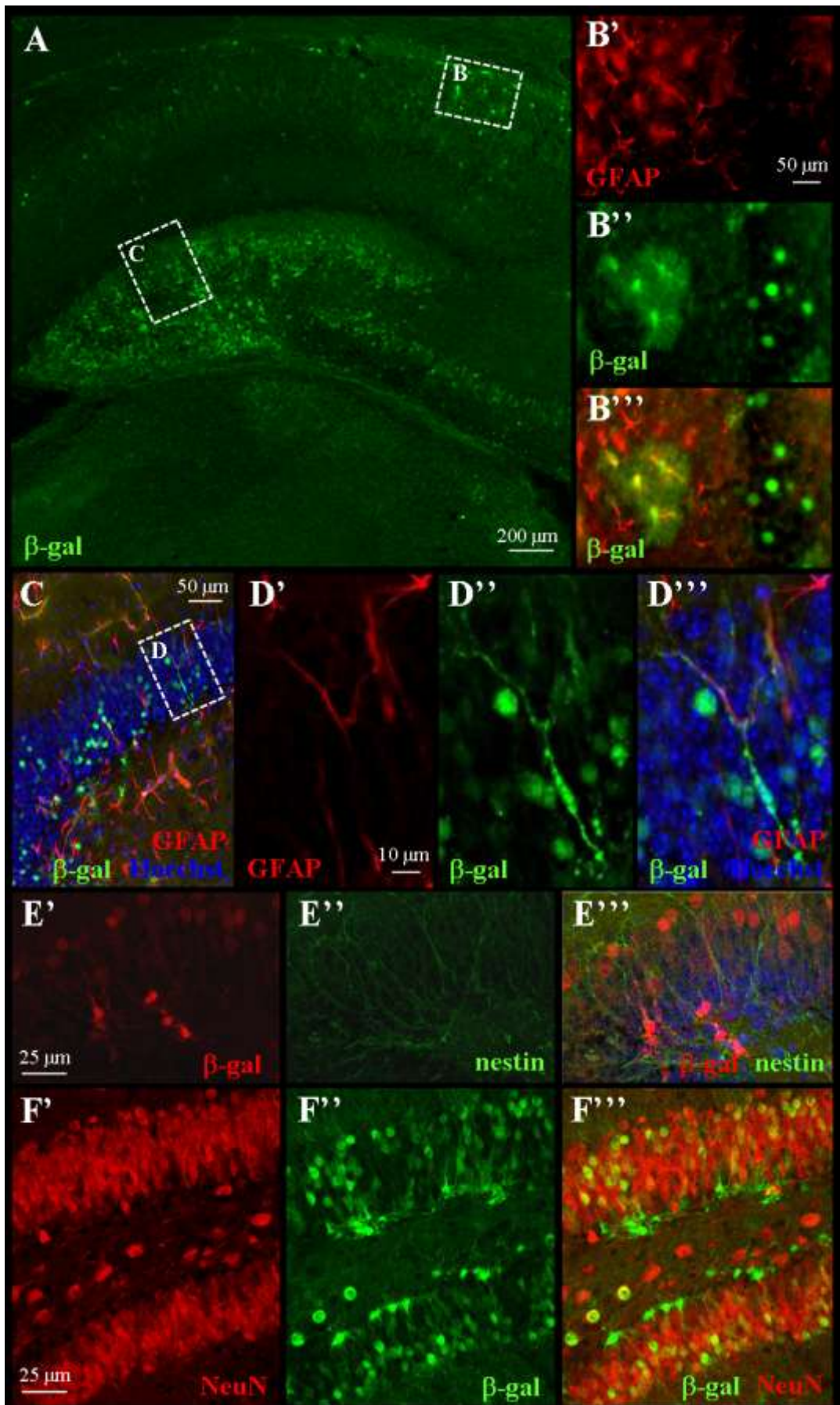




**26. ábra:** Retinsav érzékeny sejtek 65 napos *RARE-hspLacZ* riportter egér oldalkamrájának falában. **A:**  $\beta$ -gal festődés (zöld) az oldalkamra környékén. A fehérrel keretezett rész kinagyítva a B jelű képeken. **B:** nagyobb nagyítás az oldalkamra faláról, GFAP pozitív (piros) és retinsav szenzitív (zöld) sejtek. **C:** konfokális mikroszkópos felvétel a kamra faláról, nestinnel (piros) és  $\beta$ -galaktozidázzal (zöld) jelölt sejtekkel. A sejtmagok Hoechsttel (kék) vannak jelölve.

A hippocampus szubgranuláris rétege a felnőtt agyban zajló idegsejt képződés másik helyszíne. Az itt található őssejtek a hippocampus granuláris rétegének szemcsesejtjeit pótolják. A hippocampusban levő retinsav szenzitív sejtek (27. ábra) nem csak a szubgranuláris rétegre korlátozódtak, hanem megfigyelhetőek voltak a granuláris rétegben és a gyrus dentatus polymorf rétegében is. Ezen sejtek túlnyomó része az immunfestések alapján érett szemcsesejtként azonosítható (27/F ábra). A szubgranuláris rétegben elhelyezkedő  $\beta$ -gal pozitív sejtek közül egyesek Gfap, mások nestin jelölődést mutattak. A festődés, a lokalizációjuk és a morfológiájuk alapján ezek a sejtek hasonlóságot mutatnak az Alvarez-Buylla és munkatársai által őssejtként jellemzett populációval (3/B ábra).

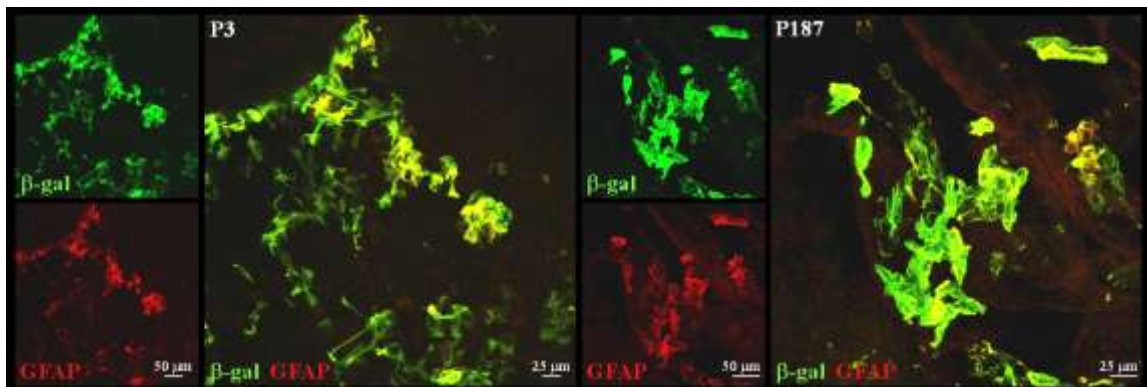
**27. ábra:** Retinsav szenzitív sejtek 65 napos *RARE-hspLacZ* riportter egér hippocampusában. **A:**  $\beta$ -gal jelölés a hippocampusban. A fehérrel keretezett részek kinagyítva is láthatóak a B és C képeken. **B:** Nagyított részlet a hippocampus CA1 régiójából,  $\beta$ -gal (zöld) és GFAP (piros) jelöléssel. **C:** A gyrus dentatus egy részlete nagyítva  $\beta$ -gal (zöld) és GFAP (piros) jelöléssel. **D:** A gyrus dentatus nagyobb nagyítással,  $\beta$ -gal (zöld) és GFAP (piros) jelöléssel. **E:** 12 napos egér gyrus dentatusa,  $\beta$ -gal (piros) és nestin (zöld) jelöléssel. **F:** Képek a gyrus dentatusról,  $\beta$ -gal (zöld) és NeuN (piros) jelöléssel.





Az agyhártya körülöleli a teljes agyat, rendkívül jó a vérellátása és a belőle kilépő erek behálózják az agyszövetet. Szembetűnő volt, hogy az X-Gal jel egész életen át erős volt benne. Ennek jelentősége nagy lehet, ugyanis az agyhártya szorosan a hippocampusra borul és a retinsav termelése befolyással lehet az itt végbemenő neurogenesis szabályozására. Kérdéses azonban, hogy az itt jelenlevő retinsavat milyen sejttípusok tartalmazzák, és vajon mi lehet a szerepe?

Az agyhártya és az agy felszínét borító asztroglia végtalpak kapcsolata a fejlődés során egyre erősödik, így a posztnatális agyból készített agyhártya nyúzatok nagy mennyiségben tartalmaznak leszakadt asztroglia végtalpakat. Ezért a retinsav riporter egérből készült preparátumokon Gfap és  $\beta$ -galaktozidáz kettős festéseket végeztünk (28. ábra).



**28. ábra:** Retinsav érzékeny sejtek 3 és 187 napos *RARE-hspLacZ* riporter egér agyhártya nyúzataiban. Az agyhártyában levő leszakadt asztroglia végtalpakat GFAP jelöli, emellett zölddel  $\beta$ -gal jelölés van.

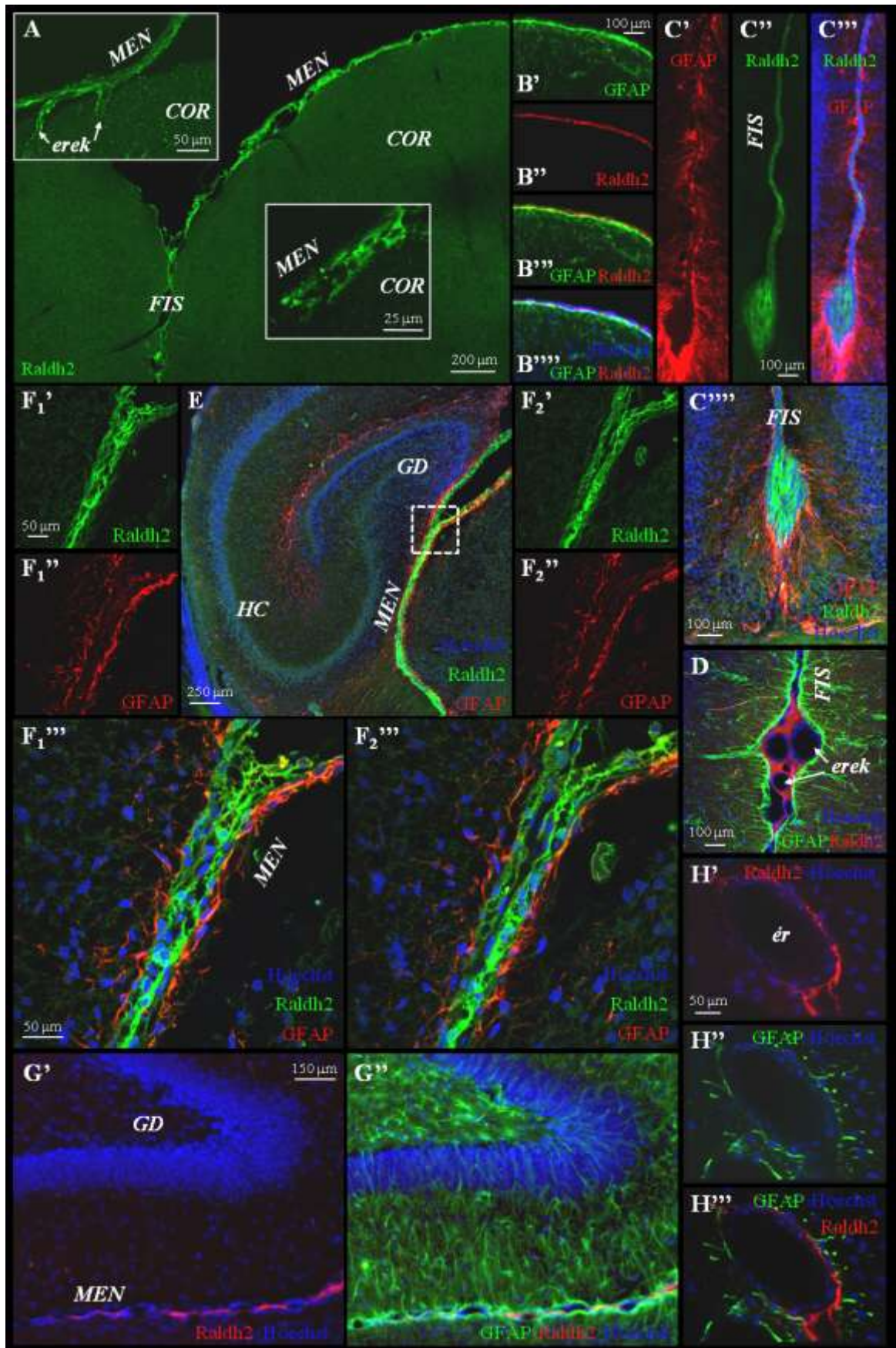
A kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy az agyhártyához asszociált retinsav szenzitív sejtek nagy része Gfap-t expresszáló asztrogliasejt. Újszülött (P3) és felnőtt (P187) egérből származó minták mindegyikén ezt tapasztaltuk. A  $\beta$ -galaktozidáz enzimet tartalmazó sejtek közül azonban nem mindegyik bizonyult asztrogliasejtnak, tehát valamilyen más sejttípus is van az agyhártyában ami retinsav reszponzív. Ezeknek a sejteknek az azonosítása a további terveink között szerepel.

#### 4.2.2. Retinsav termelés az agyban

A *RARE-hspLacZ* transzgén egerekkel végzett kísérletek arra adnak csak választ, hogy a retinsav az agyban mely sejtekben, vagy mely sejtek környezetében van jelen. Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy valójában mely sejtek termelnek aktív retinoidokat, a retinsav szintéziséért felelős Raldh2 enzimeket kell vizsgálnunk. A 3 féle, all-transz retinsavat előállító enzim közül a Raldh2 enzimre specifikus ellenanyag állt rendelkezésünkre. Kísérleteink során patkányból származó mintákkal dolgoztunk az ellenanyag fajspecifitása miatt. Az azonosításhoz a Raldh2 enzim mellé asztroglia sejtekre specifikus markert (Gfap) festettünk (29. ábra).

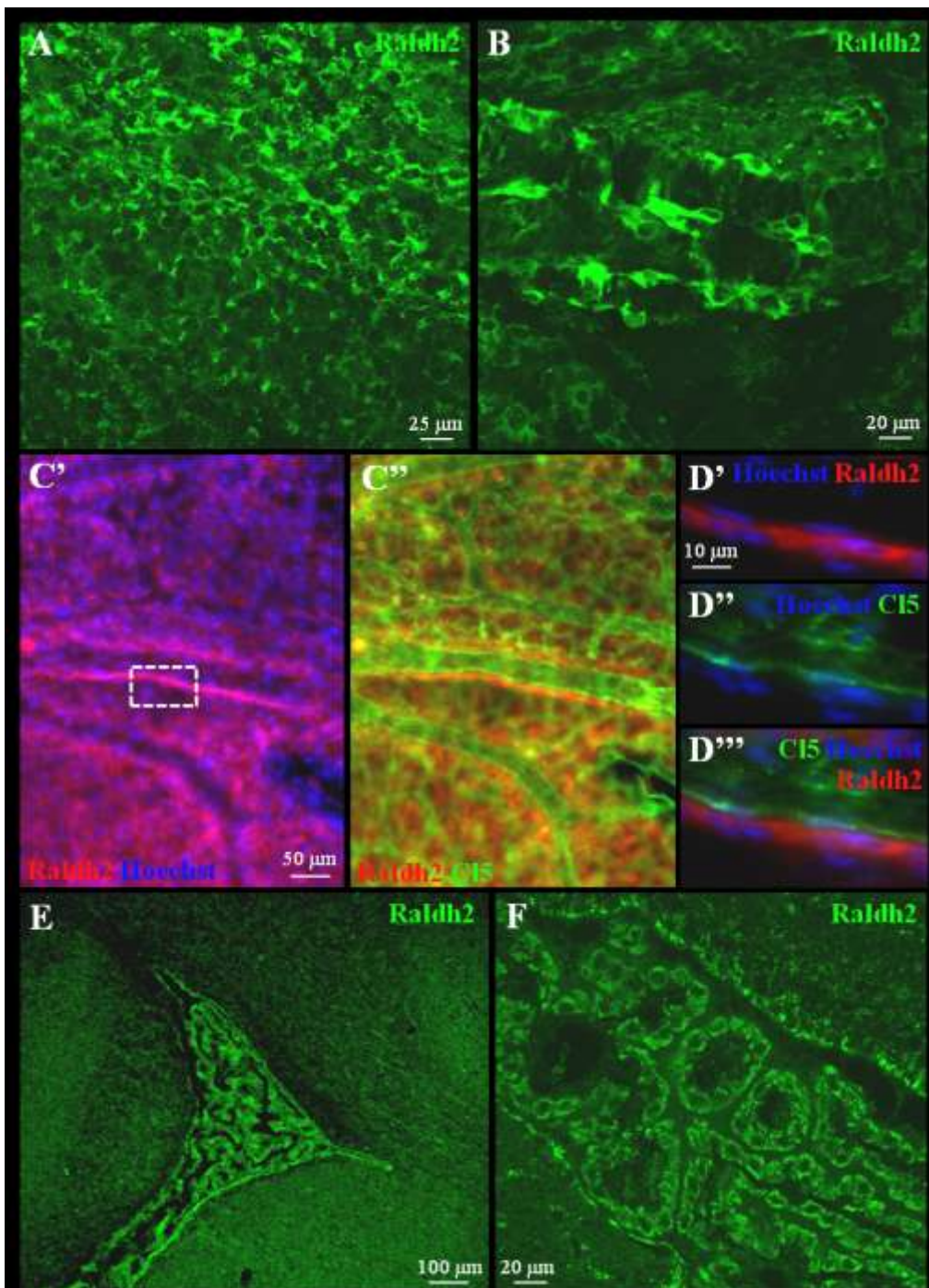
A vizsgálatok során az agyszövetben nem találtunk olyan sejtípust, amely Raldh2 enzimet termel. Ezzel szemben erős jelölődést kaptunk mind az agy felszínén, mind pedig az agyszövet betűrődéseit is követő agyhártyában. A kettős festések azt bizonyítják, hogy nincs, vagy nagyon kismértékű a Gfap/Raldh2 ko-lokalizáció. De az asztroglia sejteken kívül valamilyen más sejtípus(ok) is rendelkezik a retinsav termelés egyik kulcsenzimével.

**29. ábra:** Raldh2 és asztroglia specifikus GFAP immunfestések újszülött (P2) patkány agyszeleteken. **A:** Raldh2 (zöld) immunfestés, felvétel az agykéreg egy részéről és a felszint borító agyhártyáról. **B:** Nagyobb nagyítások az agykéregről és az agyhártyáról, Raldh2 (piros), GFAP (zöld) és Hoechst (kék) jelöléssel. **C:** Raldh2 (zöld), GFAP (piros) és Hoechst (kék) festés a két agyfélteke közötti fissura longitudinalis cerebri keresztmetszetén. **D:** Raldh2 (piros), GFAP (zöld) és Hoechst (kék) festés a fissura longitudinalis cerebri és néhány ebben futó ér keresztmetszetén. **E:** Raldh2 (zöld), GFAP (piros) és Hoechst (kék) jelölés a hippocampus területén és a hozzáfekvő agyhártyában. **F:** Az E képen szaggatott vonallal határolt területről készült nagyobb nagyítás, konfokális mikroszkópos felvétel, az F<sub>1</sub> és F<sub>2</sub> ugyan arról a látótérrel, különböző Z síkban készült képek. **G:** Raldh2 (piros), GFAP (zöld) és Hoechst (kék) immunfestés a hippocampusban és a mellette levő agyhártyában és az azokban futó erekben. **H:** Raldh2 (piros), GFAP (zöld) és Hoechst (kék) immunfestés a hippocampushoz fekvő agyhártyában húzódó nagyobb ér keresztmetszetén. *Rövidítések:* COR: agykéreg, FIS: fissura longitudinalis cerebri, HC: hippocampus, GD: gyrus dentatus, MEN: agyhártya





Az immunfestéseket megismételtük agyhártya nyúzatokon is, hogy nagyobb részletességgel is vizsgálhassuk a Raldh2 lokalizációját (30. ábra).



**30. ábra:** Raldh2 és endotél specifikus claudin5 (Cl5) immunfestések újszülött (P2) patkány agyhártya nyúzatában (A-D) és agyszeleteken (E, F). **A:** Raldh2 (zöld) immunjelölés az agyhártya nyúzatban. **B:** Raldh2 (zöld) immunjelölés az agyhártya nyúzatban futó nagyobb ér hosszmetzetén. **C:** Raldh2 és Cl5 kettős festés néhány ér hosszmetzetén. **D:** a C ábrán szaggatott vonallal jelzett terület nagyobb nagyítása. **E:** Az oldalkamrában található choroid plexus festése Raldh2-vel (zöld). **F:** nagyobb nagyítású kép Raldh2-vel (zöld) festett choroid plexusról.

Az agyhártyában nem találtunk Raldh2/Gfap kettősen jelölt sejteket, tehát valamilyen más sejttípus lehet felelős a retinsav termeléséért. Mivel a Raldh2 lokalizációja szorosan követni látszik az agyhártyában futó ereket, endotél specifikus claudin5 (Cl5) festéssel kombináltuk (30/C, D ábra). A festésekből azonban kiderült, hogy a Raldh2-vel festődő réteg a többek között claudinnal szorosan kapcsolt endotél sejtek rétegén kívül van.

Az agyhártya mellett az oldalkamrában található choroid plexus is expresszál Raldh2 enzimet. A 30/F ábra alapján a Raldh2-t expresszáló sejtek a choroid plexus epitél sejtjei illetve a kamra falát borító ependyma sejtek, amelyek pontos azonosításán jelenleg dolgozunk.

Az eredményeink tehát azt mutatják, hogy az agyszövetben nincsenek vagy nagyon kis mennyiségben fordulnak elő Raldh2-t termelő sejtek. Ezzel szemben az agyhártyában és a choroid plexusban is jelentős mértékű a Raldh2-t expresszáló sejtek aránya. Ezek egy kis része asztroglia sejt, a nagyobb részét azonban még nem azonosítottuk. Emellett elképzelhető, hogy a retinsav előállításához szükséges másik két enzim (Raldh1 és Raldh3) felhasználásával történik retinsav termelés.

### **4.3. Idegi őssejtek retinsav termelésének vizsgálata**

Az asztroglia sejtek retinsav termelő képessége mellett kíváncsiak voltunk, vajon az idegi őssejtek is rendelkeznek-e ezzel a képességgel? Felmerült bennünk a kérdés, hogy vajon a differenciálódás során az idegi őssejtek endogén retinsav termelése hozzájárul-e a neuronális elköteleződés autokrin regulációjához? Ennek megállapításához vizsgáltuk különböző idegi őssejtek neuronális differenciációjának különböző szakaszait. A kísérletekhez NE-4C idegi őssejtek és radiális gliasejtek indukált tenyészeteit használtuk.

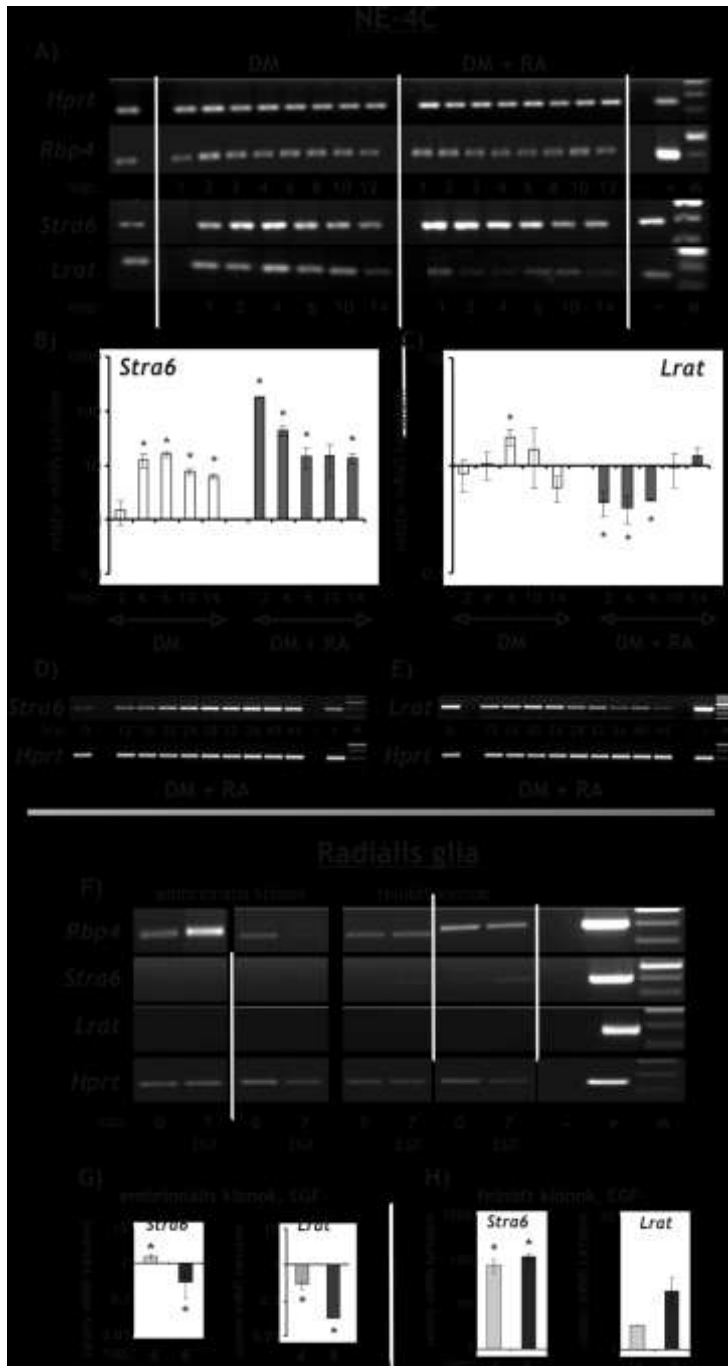
#### **4.3.1. A retinsav metabolizmus elemeinek expressziós változásai az idegi irányú differenciáció során**

A retinoid metabolizmus elemeinek változásait mRNS szinten vizsgáltuk RT-PCR és Real-Time PCR segítségével. A kísérletek során elkötelezetlen és a differenciáció különböző stádiumaiban levő idegi őssejteket hasonlítottunk össze. A kapott eredményeket a retinsav metabolizmus komponenseinek funkció szerinti csoportosítása alapján mutatom be.

##### *4.3.1.1. Az A vitamin felvételéért és raktározásáért felelős komponensek vizsgálata*

A retinol extracelluláris szállítását végző fehérje, az Rbp4 mRNS-e kismértékben ugyan, de jelen van mind az NE-4C, mind pedig a radiális gliasejtekben, függetlenül a differenciáció állapotától (31. ábra). A sejtek felszínén levő Stra6 (Kawaguchi, 2007) az Rbp4 receptora, amely az A vitamin felvételt teszi lehetővé. A *Stra6* mRNS-e a radiális gliasejtekből hiányzik vagy nagyon kis mennyiségben expresszálódik (31/F ábra) és csak a felnőtt klónban figyelhető meg növekedés a mennyiségében (31/H ábra). Ezzel szemben az NE-4C sejtekben jelen van a *Stra6* mRNS-e (31/A,B,D ábra). A retinsav hozzáadására a *Stra6* egy gyors és szignifikáns növekedéssel válaszol, majd a differenciáció előrehaladásával a szintje fokozatosan csökken. A szérummegvonással indukált sejtekben ez a növekedés időben később, néhány napos csúszással jelentkezik. A raktározott forma, a retinil-észter létrehozásáért felelős Lrat enzim mRNS-e nem

található meg vagy kis mennyiségben jelenik meg a radiális gliasejtekben (31/F ábra) és az idegi irányú differenciálódás során sem tapasztalunk jelentős eltérést ettől (31/G,H ábra). Az indukátlan NE-4C sejtekben jelen van (31/A,C,E ábra), szintje a differenciálódás során csökken. A retinsav hatására ez a csökkenés erőteljesebb, amíg a szérummegvonás után szintje eleinte kismértékű növekedést mutat és csak a 14. napra csökken a szintje a differenciátlan állapot szintje alá (31/C ábra).



**31. ábra:** A retinol vérben való szállításáért (*Rbp4*), felvételéért (*Stra6*) és raktározásáért (*Lrat*) felelős enzimek mRNS-ének vizsgálata RT-PCR és Real-Time PCR módszerekkel, NE-4C (A-E) és radiális gliasejtekben (F-H). **A:** Az enzimek mRNS-ének változása 12 illetve 14 napos retinsavas és szérummegvonásos indukció során (RT-PCR). **B-C:** A *Stra6* és az *Lrat* relatív mRNS szintjének változása 14 napos retinsavas és szérummegvonásos indukció során, (Real-Time PCR). **D-E:** A *Stra6* és az *Lrat* mRNS szintjének változása 44 órás retinsavas indukció során. **F:** Az enzimek mRNS-ének változása 7 napos indukció hatására (RT-PCR). **G-H:** A *Stra6* és az *Lrat* relatív mRNS szintjének változása 8 napos indukció során (Real-Time PCR). **Rövidítések:** *DM*: definiált médium, *DM+RA*: definiált médium + retinsav, *nap*: az indukció napjainak száma, *óra*: az indukció óráinak száma, \* $p < 0,05$

#### 4.3.1.2. A retinsav szintézis komponensei

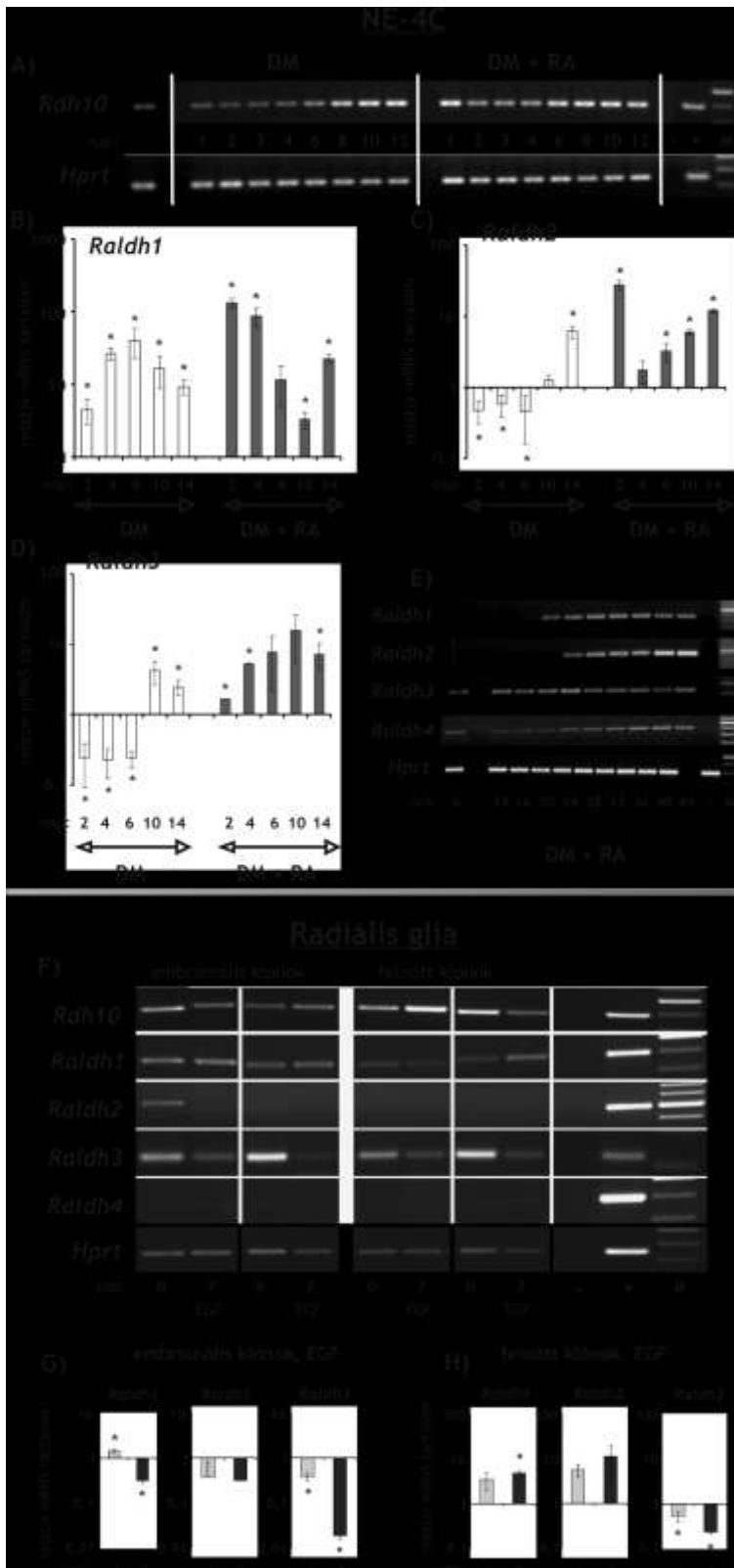
A sejtekben a retinsav szintézise attól függ, hogy jelen vannak-e a retinol/alkohol illetve a retinaldehid-dehidrogenáz enzimek (6. ábra). A retinol-dehidrogenáz 10 (Rdh10) enzim végzi az első lépést az A vitamin átalakításában. Az általunk vizsgált két sejttípus mindegyikében megtalálható mRNS szinten a differenciálatlan és a differenciált állapotban is (32/A,F ábra). Az NE-4C sejtek indukciója során szintje fokozatosan növekszik, a retinsav hatására egy nagyobb mértékű, gyors növekedés figyelhető meg (32/A ábra).

Az indukálatlan NE-4C sejtekben csak az *Raldh3* és *Raldh4* mRNS-e mutatható ki (32/E ábra). A differenciáció során a *Raldh1* jelentős növekedést mutat (32/B ábra), összehasonlítva a többi Raldh enzimmel a legnagyobb változással ez rendelkezik (32/B,C,D ábra). A *Raldh1* és *Raldh2* gyors (24-28 óra) növekedéssel (32/E ábra) reagál a retinsav kezelésre, majd a hirtelen emelkedés után szintjük újra lecsökken (32/B,C ábra). A *Raldh3* nem mutat ilyen reakciót a retinsav hatására (32/D ábra), szintje fokozatosan gyarapodik az indukció során, csakúgy, mint a *Raldh4* mRNS-e (32/E ábra). Szérummentes környezetben a *Raldh1* szintje emelkedik jelentősen, a hatodik napon megfigyelhető csúccsal (32/B ábra), amíg a *Raldh2* és *Raldh3* az első hét során kismértékben csökken és csak a továbbiakban mutat enyhe expressziós növekedést (32/C,D ábra).

A *Raldh1* és a *Raldh3* mRNS-e megtalálható a differenciálatlan radiális gliasejtekben, a *Raldh2* azonban nem, vagy csak kis mennyiségben fejeződik ki (32/F ábra). A Real-time PCR adatok finom növekedést mutatnak a *Raldh1* és *Raldh2* esetében a felnőtt klónokban (32/H ábra), amíg az embrionális sejtekben a 8. napra lecsökken a szintjük (32/G ábra). A *Raldh3* szintje minden radiális glia klónban csökken a neuronális differenciáció során (32/G,H). A *Raldh4* nincs jelen egyik radiális glia klónban sem, függetlenül a differenciáltság állapotától (32/F ábra).

A Raldh enzimek expressziós mintázata megerősítette a korábbi (Környei és mtsai, 2007; Hádinger és mtsai, 2009) és az újabb eredményeinket, amelyek szerint az elkötelezetlen és a differenciálódó idegi őssejtek rendelkeznek a retinsav termelés képességével.



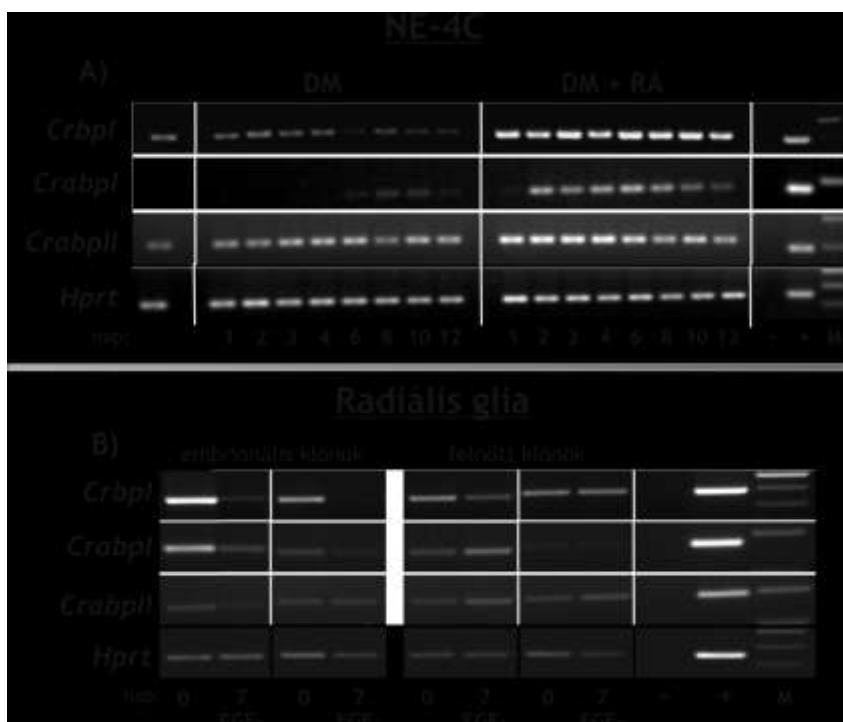


**32. ábra:** A retinol retinaldehiddé (Rdh10) majd a retinaldehidet retinsavvá alakításáért (Raldh 1,2,3,4) felelős enzimek mRNS-ének vizsgálata RT-PCR és Real-Time PCR módszerekkel, NE-4C (A-E) és radiális gliasejtekben (F-H). **A:** Az Rdh10 enzim mRNS-ének változása 12 napos retinsavas és szérumszint megvonással történő indukció során. **B-D:** A Raldh1, 2, 3 enzimek relatív mRNS szintjének változása 14 napos retinsavas és retinsav nélküli, szérumszint mentes indukció során, Real-Time PCR-rel. **E:** A Raldh1, 2, 3, 4 enzimek mRNS szintjének változása 44 órás retinsavas indukció során. **F:** Az Rdh10 és Raldh enzimek mRNS-ének változása 7 napos indukció hatására a radiális gliasejtekben. **G-H:** A Raldh1, 2, 3 enzimek relatív mRNS szintjének változása 8 napos radiális glia indukció során, Real-Time PCR-rel. *Rövidítések:* DM: definiált médium, DM+RA: definiált médium + retinsav, nap: az indukció napjainak száma, óra: az indukció óráinak száma, \*p<0,05

#### 4.3.1.3. Intracelluláris retinol és retinsav transzport

A retinol kötő fehérje (CrbpI) mRNS szintje növekszik az NE-4C sejtekben a retinsav hatására (33/A ábra) és a differenciáció későbbi stádiumaiban nem változik. A szérumentes indukció során a szintje közel állandó marad. Az mRNS-e megtalálható a differenciálatlan radiális gliasejtekben (33/B ábra). Az idegi irányú differenciáció előrehaladásával az embrionális eredetű klónokban csökken az expresszió, amíg a felnőttékből származó sejtekben ilyen változás nem figyelhető meg.

Az indukálatlan NE-4C sejtekben a *CrbpI* nem jelenik meg, a *CrabpII* viszont igen (33/A ábra). Mindkét enzim mRNS mennyisége növekszik a retinsavas kezelés hatására, ez a jelenség a *CrabpII* esetében erőteljesebb. A II-es típusú celluláris retinsav kötő fehérje (CrabpII) mRNS-e viszonylag alacsony szinten expresszálódik a radiális gliasejtekben (33/B ábra), hasonlóan a *CrabpI* expressziójához, amely csak az egyik differenciálatlan embrionális klónban ad erősebb jelet a többinél.

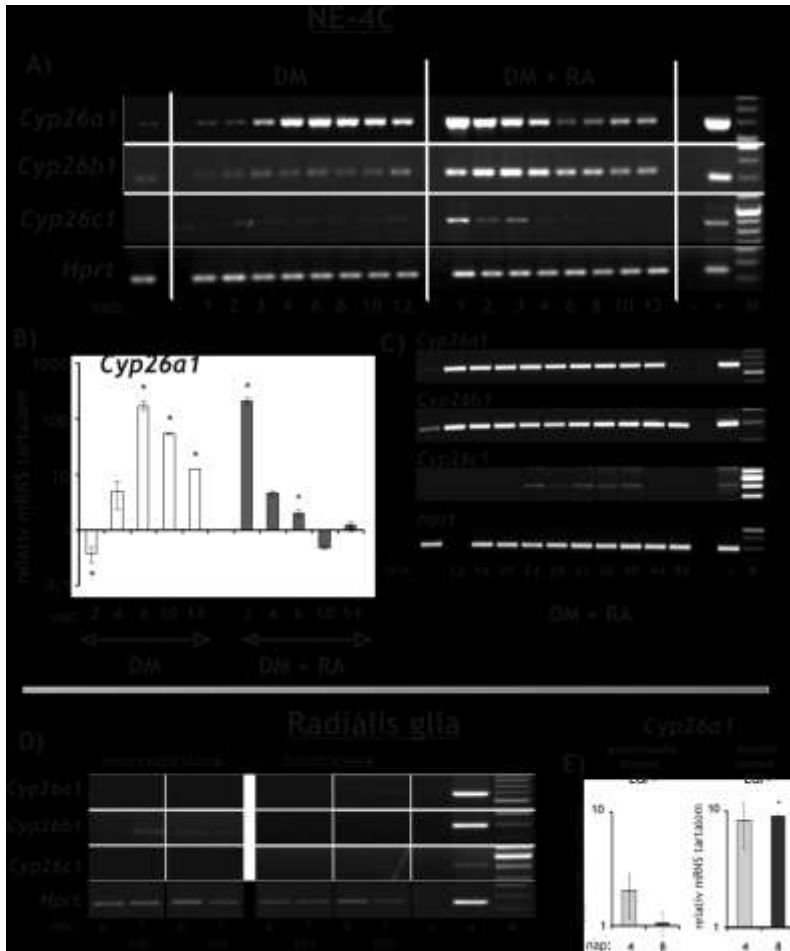


**33. ábra:** A retinol (Crbp) és a retinsav (Crabp) sejten belüli megkötéséért és szállításáért felelős enzimek vizsgálata RT-PCR segítségével NE-4C (A) és radiális gliasejtekben (B). **A:** Az enzimek mRNS-ének változása 12 napos retinsavas és szérumentes indukció során. **B:** Az enzimek mRNS-ének változása 7 napos indukciót követően. *Rövidítések:* DM: definiált médium, DM+RA: definiált médium + retinsav, nap: az indukció napjainak száma.

#### 4.3.1.4. A retinsav lebontását végző enzimek vizsgálata

A felesleges retinsav átalakításáért a citokróm P450 család tagjai, a Cyp26 enzimek a felelősek (6. ábra). Az indukátlan idegi őssejtek, az eredetüktől függetlenül, nem tartalmazzák a háromféle enzim egyikének mRNS-ét sem. Egyetlen kivétel a *Cyp26b1*, amely kis mértékben ugyan, de kifejeződik az NE-4C sejtekben (34/A ábra). Az NE-4C sejtekben a *Cyp26* expresszió megnövekszik a retinsav hatására (34/A ábra). Ez a változás nagyon hamar, már 12 óra elteltével megfigyelhető (34/C ábra), de a továbbiakban fokozatos csökkenés figyelhető meg (34/A ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a retinsav elősegíti a lebontó enzimek expresszióját. A retinsav nélküli, szérummentes indukció során is növekszik a *Cyp26a1* mRNS mennyisége, összehasonlítva a retinsavas indukcióval azonban ez a változás néhány nappal később figyelhető meg és kevésbé robosztus. Ez a jelenség azt sugallja, hogy a differenciálódó sejtek talán képesek annyi retinsavat termelni, ami elegendő a lebontó enzim átírásának aktiválásához, mivel a *Cyp26a1* egy direkt retinsav rezponzív gén. Esetleg, a Cyp26 enzimek szabályozását befolyásolhatják a retinsav hatására bekövetkező differenciációs folyamatok és változások.

Az embrionális eredetű radiális glia klónokban alacsony *Cyp26b1* expressziót figyeltünk meg (34/D ábra). A felnőtt klónokban azonban nem tudtuk detektálni egyik lebontó enzimet sem. A Real-time PCR kismértékű növekedést mutatott a *Cyp26a1* expressziójában (34/E ábra).



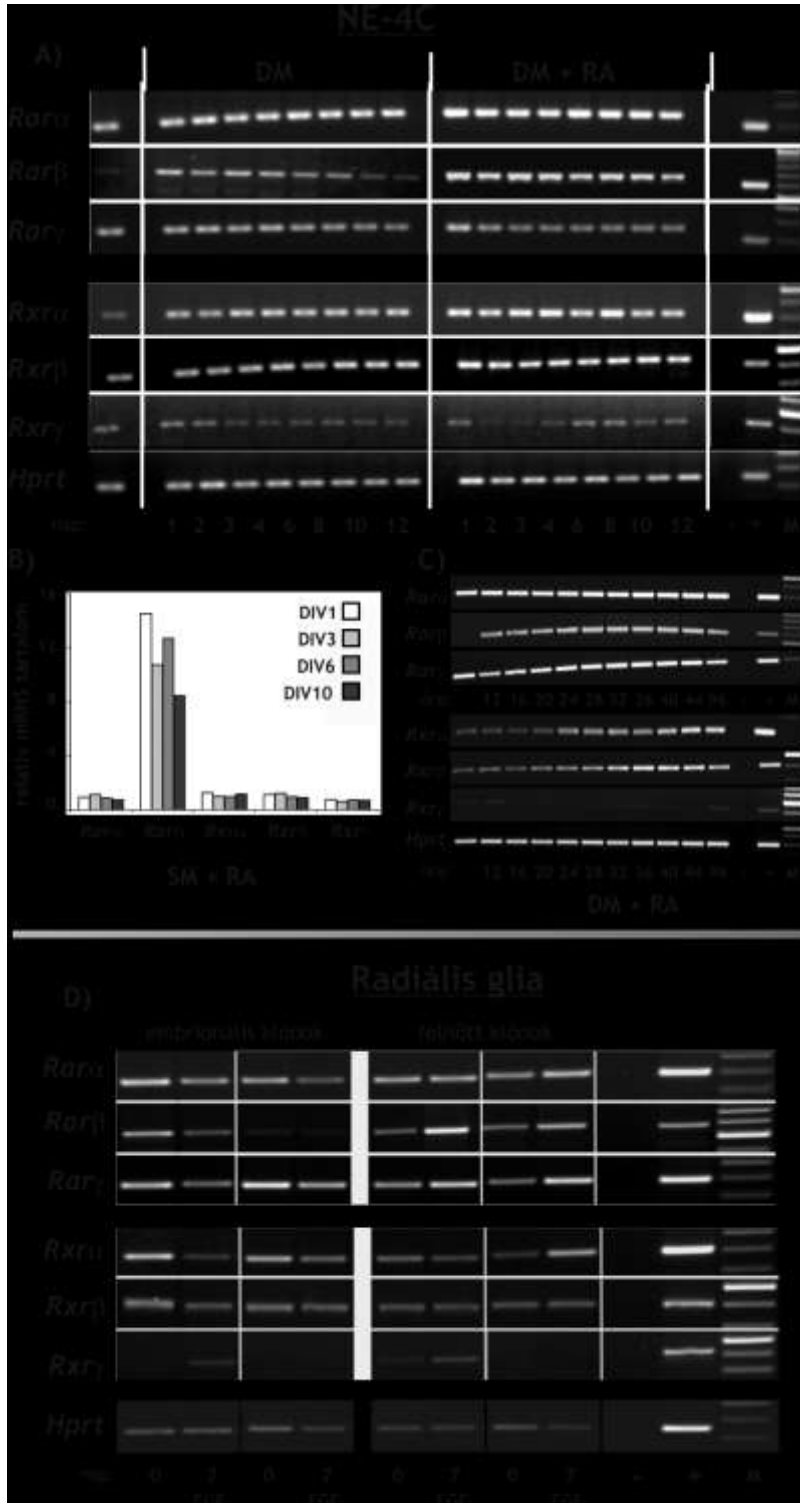
**34. ábra:** A retinsav lebontásáért felelős enzimek (Cyp26a1, b1, c1) mRNS-ének vizsgálata RT-PCR és Real-Time PCR módszerekkel, NE-4C (A-C) és radiális gliasejtekben (D-E). **A:** A Cyp26 enzimek mRNS-ének változása 12 napos retinsavas és szérummegvonással történő indukció során. **B:** A *Cyp26a1* relatív mRNS szintjének változása 14 napos retinsavas és retinsav nélküli, szérummentes indukció során, Real-Time PCR-rel. **C:** A Cyp26 enzimek mRNS szintjének változása 96 órás retinsavas indukció során. **D:** A Cyp26 enzimek mRNS-ének változása 7 napos

indukció hatására. **E:** A *Cyp26a1* enzim relatív mRNS szintjének változása 8 napos indukció hatására. *Rövidítések:* DM: definiált médium, DM+RA: definiált médium + retinsav, nap: az indukció napjainak száma, óra: az indukció óráinak száma, \* $p < 0,05$

#### 4.3.1.5. Retinoid receptorok

A Rar és Rxr (6. ábra) alegységek mindegyikének mRNS-e kimutatható az összes differenciálatlan idegi őssejtben (35. ábra), kivéve az *Rxr $\gamma$*  alegységet, amely nincs jelen a radiális gliasejtekben (35/D ábra). A radiális glia klónokban a differenciáció során nem történik jelentős változás az expressziós szintekben. Az NE-4C sejtekben a *Rar $\beta$*  mRNS szintje a differenciálatlan mintában nagyon alacsony, majd szignifikánsan növekszik a differenciáció kezdetével retinsavas illetve szérummegvonással kiváltott indukció esetén is (35/A ábra). Ez a változás a retinsavas indukció során erőteljesebb, de mindkét esetben csökkenés figyelhető meg a differenciáció későbbi napjain. A PCR vizsgálatok mellett a receptorok mRNS-ének szintjét Agilent RNS micro-array

segítségével is elemeztük (35/B ábra). A kapott értékek megerősítették a PCR-rel kimutatott eredményeket.



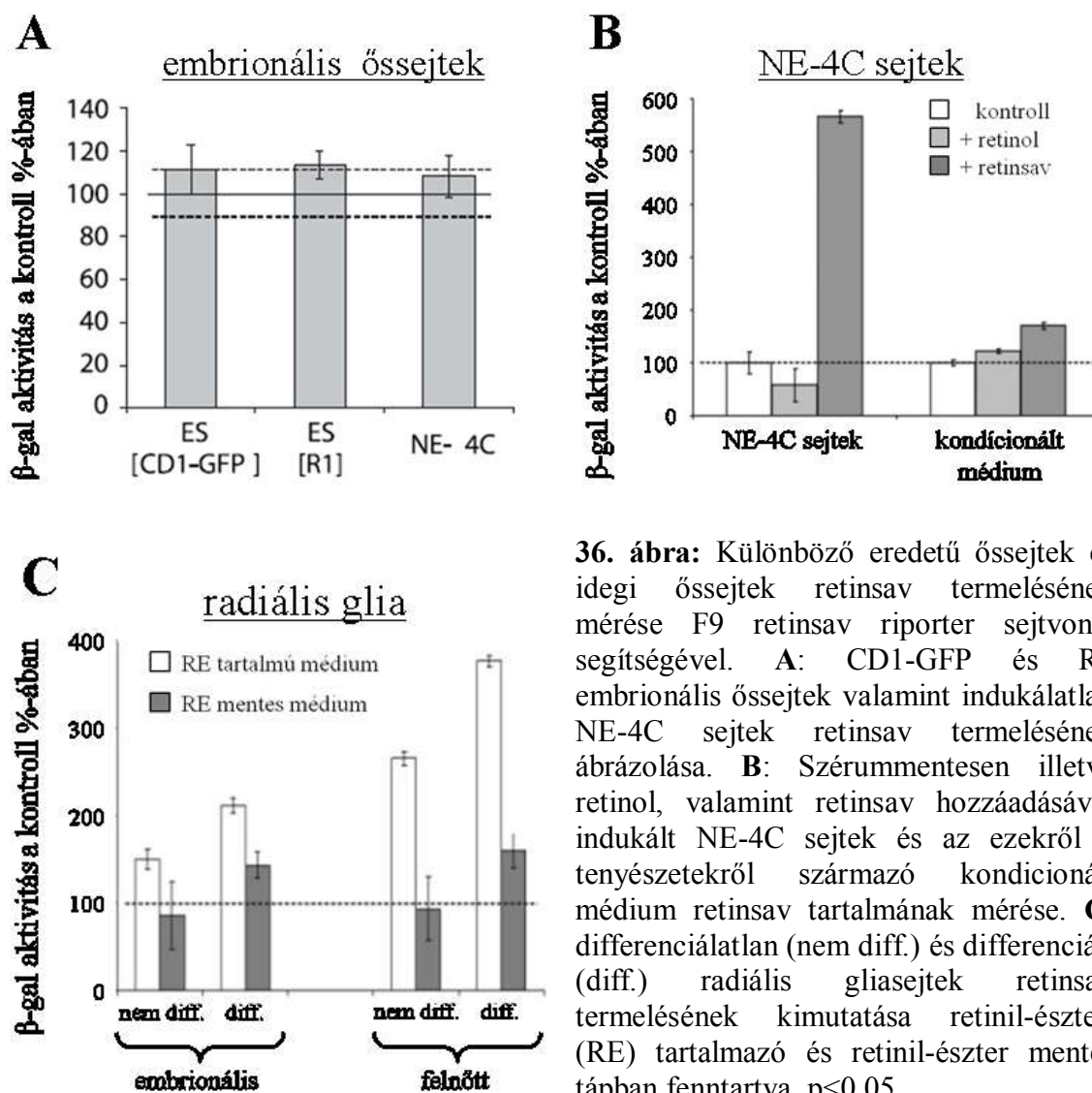
**35. ábra:** A retinsav (Rar) és a retinoid „X” (Rxr) receptorok mRNS-ének vizsgálata RT-PCR-t alkalmazva, NE-4C (A-C) és radiális gliasejtekben (D). **A:** A Rar és Rxr receptorok mRNS-ének változása 12 napos retinsavas és szérumszintű megvonással történő indukció során. **B:** A Rar és Rxr receptorok relatív mRNS tartalmának ábrázolása, az értékek az Agilent RNS micro-array-ről származnak. **C:** A Rar és Rxr receptorok mRNS szint változása 44 órás retinsavas indukció során. **D:** A Rar és Rxr receptorok mRNS-ének változása 7 napos indukció hatására a radiális gliasejtekben.

*Rövidítések:* *DM:* definiált médium, *DM+RA:* definiált médium + retinsav, *nap:* az indukció napjainak száma, *óra:* az indukció óráinak száma, *SM+RA:* szérumszintű tartalmazó médium + retinsav.

Méréseink alapján megállapíthatjuk, hogy az idegi őssejtek rendelkeznek a retinsav szintéziséhez szükséges enzimek és receptorok mRNS-ével, tehát elméletileg képesek a retinsav termelésére. Ahhoz, hogy kiderítsük, valóban termelnek-e retinsavat, más módszereket alkalmaztunk.

#### 4.3.2. A retinsav termelés vizsgálata idegi őssejtekben

A tényleges retinsav termelés kimutatásához a gliális vizsgálatok mintájára különböző eredetű őssejtek és F9 retinsav riporter sejtek ko-kultúráit hoztuk létre, majd mértük a  $\beta$ -galaktozidáz enzim termelődésének mértékét (36. ábra).



**36. ábra:** Különböző eredetű őssejtek és idegi őssejtek retinsav termelésének mérése F9 retinsav riporter sejtvonal segítségével. **A:** CD1-GFP és R1 embrionális őssejtek valamint indukátlan NE-4C sejtek retinsav termelésének ábrázolása. **B:** Szérummentesen illetve retinol, valamint retinsav hozzáadásával indukált NE-4C sejtek és az ezekről a tenyészetekről származó kondicionált médium retinsav tartalmának mérése. **C:** differenciálatlan (nem diff.) és differenciált (diff.) radiális gliasejtek retinsav termelésének kimutatása retinil-észter (RE) tartalmazó és retinil-észter mentes tápban fenntartva.  $p < 0,05$

Az indukátlan embrionális őssejtek (CD1-GFP és R1) és az indukátlan NE-4C sejtek jelenlétében az F9 sejtek nem expresszálják detektálható mennyiségű  $\beta$ -galaktozidáz enzimet (36/A ábra). Az elkötelezetlen őssejtek tehát vagy nem termelnek retinsavat, vagy olyan kis mennyiségben termelik, hogy az nem elegendő az F9 sejtekben a transzgen aktiválásához. Abban az esetben, ha az NE-4C sejteket retinsavval indukáljuk, a differenciálódó sejtek olyan mennyiségű retinsavat termelnek, ami aktiválni képes a RARE-LacZ transzgent (36/B ábra). Amennyiben az NE-4C sejtekhez a szérum megvonás után retinsav helyett retinolt adunk, nem tapasztalunk  $\beta$ -galaktozidáz enzimtermelődést. A differenciált sejtekről származó kondicionált médium csak a retinsavval kezelt tenyészetek esetében tartalmazott annyi retinoidot, ami elegendő volt egy kismértékű reakció kiváltására az F9 sejtekben. Az NE-4C sejtekkel ellentétben az indukátlan radiális gliasejtek termelnek a riportert sejtvonallal kimutatható mennyiségű retinsavat, függetlenül attól, hogy embrióból vagy felnőtt állatból származó klónokat vizsgáltunk (36/C ábra). Az EGF megvonással differenciált radiális gliasejtek pedig még az elkötelezetlen sejteknél is magasabb szintű retinsav termelést mutattak. A mérések azonban jól mutatják, hogy a retinsav termelés nagymértékben függ a tápoldatban levő retinsav elő-alka, a retinil-észter (RE) jelenlététől. Amennyiben ez nem elérhető a sejtek számára, nem tapasztalunk retinsav termelést.

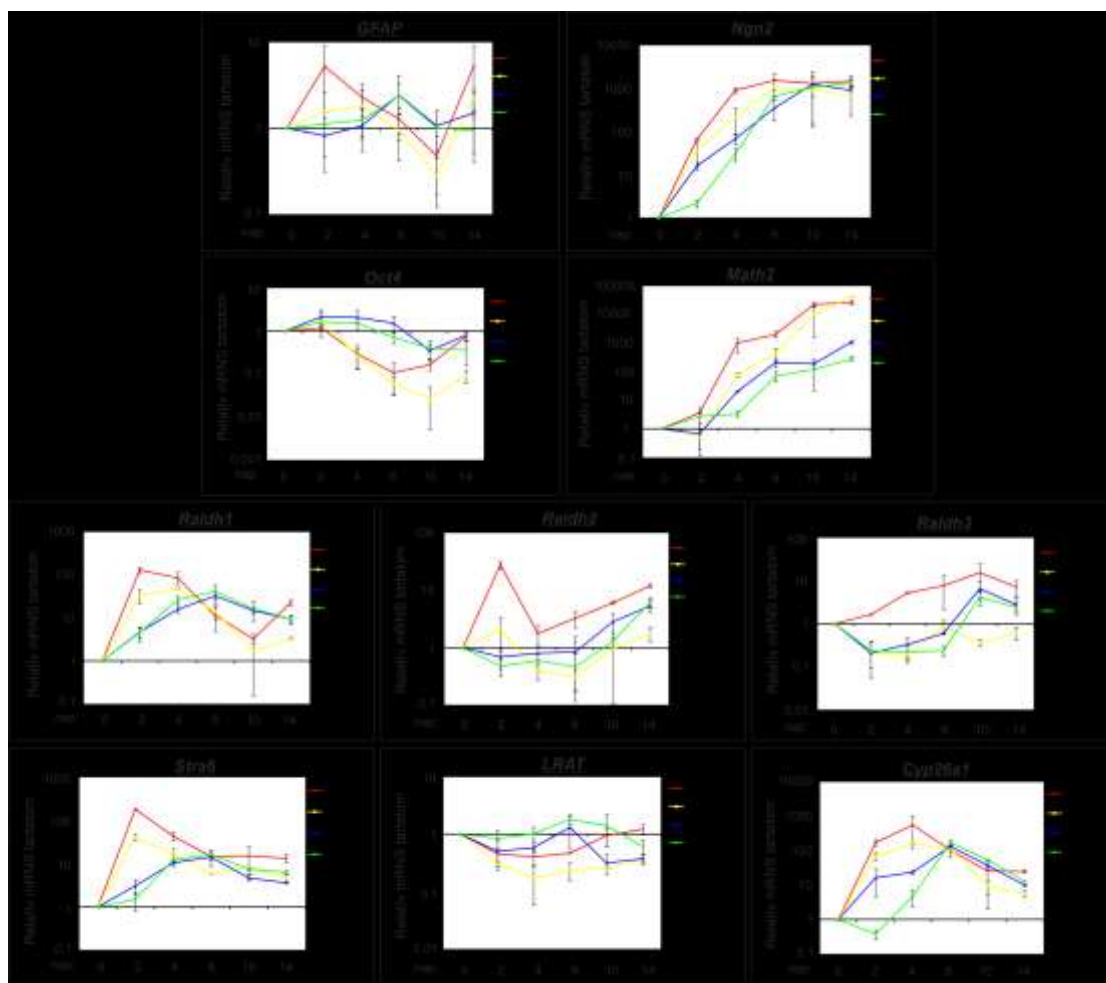
A differenciáció során tehát az idegi őssejtek termelnek retinsavat. A következő kérdésünk az, hogy ennek van-e valamilyen hatása a neuronális differenciáció folyamatára?

#### 4.3.3. A differenciáció során termelődő retinsav hatása az elköteleződés folyamatára

Annak vizsgálatára, hogy a differenciáció során termelődő retinsav hatással van-e magára a differenciációs folyamatra, többféle indukciót hasonlítottunk össze. Mivel az idegi őssejtek retinsav termelése függ a tápoldatban elérhető retinoidok mennyiségétől, a szérummentes és a retinsavas indukció (korábbi eredmények ismertetve a 4.3.1. fejezetben) mellett retinil-észterrel és retinollal kiegészített szérummentes tápoldattal is indukáltuk az idegi őssejteket.

#### 4.3.3.1. A retinsav metabolizmus elemeinek vizsgálata mRNS szinten az idegi irányú differenciáció során

Első lépésként a differenciáció előrehaladását jellemző géneket és a retinsav metabolizmus elemeinek mRNS változásait vizsgáltuk az NE-4C sejtekben Real Time-PCR módszert használva (37. ábra).



**37. ábra:** A retinsav metabolizmus elemeinek mRNS szintekben történő változásainak vizsgálata NE-4C sejtek retinsavas, retinolos, retinil-észteres és szérummegvonással kiváltott indukciója során Real-time PCR segítségével. Rövidítések: DM: definiált médium, DM+RA: definiált médium + retinsav, DM+ROL: definiált médium + retinol, DM+RE: definiált médium + retinil-észter.

Az első szembetűnő különbségeket rögtön a differenciációs markerek vizsgálata során tapasztaltuk. A tenyészetekben fennmaradó, differenciálatlan és osztódni képes sejteket jelző *Oct4* a retinsav és a retinol hozzáadását követően jelentős csökkenést mutatott, ezzel szemben a szérummentes és a retinil-észteres mintákban közel azonos



maradt az expresszió mértéke, mint az indukátlan sejtekben, utalva arra, hogy ezekben a tenyészetekben lényegesen nagyobb arányban maradtak elkötelezetlen sejtek. A retinsav markáns differenciáltató hatása tehát valószínűleg ezekben a sejt kultúrákban kevesebb sejtre volt hatással. A korai idegsejtekre jellemző *Ngn2* mRNS-e a retinsavas mintákban érte el először a legmagasabb szintet, ezt követte a retinolos, majd a retinil-észteres és végül a retinoid mentes médiumban differenciáltatott mintasor. Az indukció előrehaladásával azonban közel azonos szintet ért el az expresszió mind a négyféle kezelés során. Ez arra utalhat, hogy a keletkező fiatal idegsejtek számában nincs nagy eltérés csak az időzítés más az egyes indukciók között. Ezzel azonos időbeni késés figyelhető meg az érett idegsejtek által kifejezett *Math2* gén esetén, azzal a különbséggel, hogy ennek az expressziója a differenciáció 14. napjára sem ért el azonos szintet. A mennyiségi csökkenés szintén a korábban megfigyelt  $DM+RA > DM+ROL > DM+RE \geq DM$  sorrendet követi. Tehát a retinsavval kezelt tenyészetekben figyelhető meg a legnagyobb mennyiségben az érett idegsejtet jelző *Math2*, amíg a többi mintában vélhetően később, az általunk már nem vizsgált időszakban lehetett volna megfigyelni hasonló szintű növekedést.

Az asztroglia sejtekre jellemző *Gfap* expressziót vizsgálva szintén egy érdekes dologra figyelhetünk fel. Az NE-4C sejtek differenciációja során ugyanis csak akkor keletkeznek asztroglia sejtek, ha az indukció során jelen volt a retinsav. Ezek a megfigyelések összhangban vannak a korábbi vizsgálódásainkkal (Hádinger és mtsai, 2009). A szérummegvonás hatására ugyanis – ahogy a PCR eredmények is alátámasztják – nem keletkeznek gliasejtek, ezzel szemben a retinoidokat tartalmazó tenyészetekben igen. Ez az eredmény már utalhat arra, hogy a sejtek képesek a retinoid előalakokat retinsavvá alakítani és ezzel elősegíteni az asztroglia sejtek keletkezését.

A *Raldh1* szintén ilyen időbeli eltolódást mutat. A *Raldh2* mRNS-e a retinsav hozzáadása után jelentős növekedést mutatott, retinol hatására kisebb mértékűt, amíg a retinil-észteres és a szérumentes tápban a mennyisége az indukció kezdetén csökkent. A *Raldh3* mRNS-e egy kissé eltér a többi gén „viselkedésétől”, itt ugyanis a retinsavas mintától elkülönülve a többi kezelés mintáiban megfigyelhető expressziós szint közel azonos szinten és azonos időben változik az indukció elején.

A *Strab6* esetében az ugrásszerű növekedés az indukátlan és az indukált sejtek között a retinsav hatására már az első napon megfigyelhető, retinol esetében a

növekedés mértéke kisebb, majd ezt követi a retinil-észteres és a retinoid mentes mintákban megfigyelhető érték.

A raktározott forma kialakítását végző enzim, az Lrat mRNS-ének szintje a differenciálódás során csökken, leghamarabb a retinsav hatására, majd a retinol, retinil-észter és a retinoid mentes táp esetében.

A retinsav lebontást végző Cyp26a1 enzim mRNS-e is erős függést mutat a retinoidok formájától, retinsavas kezelést követően mutatott hirtelen, nagymértékű növekedést, retinol esetén kisebb mértékűt és később, a retinil-észteres indukció esetén időben tovább csúszva, végül a szérumentes tápban mutatta a legkésőbb a változást.

Az eredmények alapján tehát időbeli eltolódást figyeltünk meg különböző retinoidokkal kezelt tenyészetek között. Eszerint a retinsav okozza a leggyorsabb változásokat, és a legtöbb esetben a legjelentősebb mértékűeket is. A retinol áll a sorrendben a második helyen, utána következik a retinil-észter és a retinoid mentes, definiált médiumban lezajló differenciálódás során történik minden változás a legkésőbb, illetve a legkisebb mértékben.

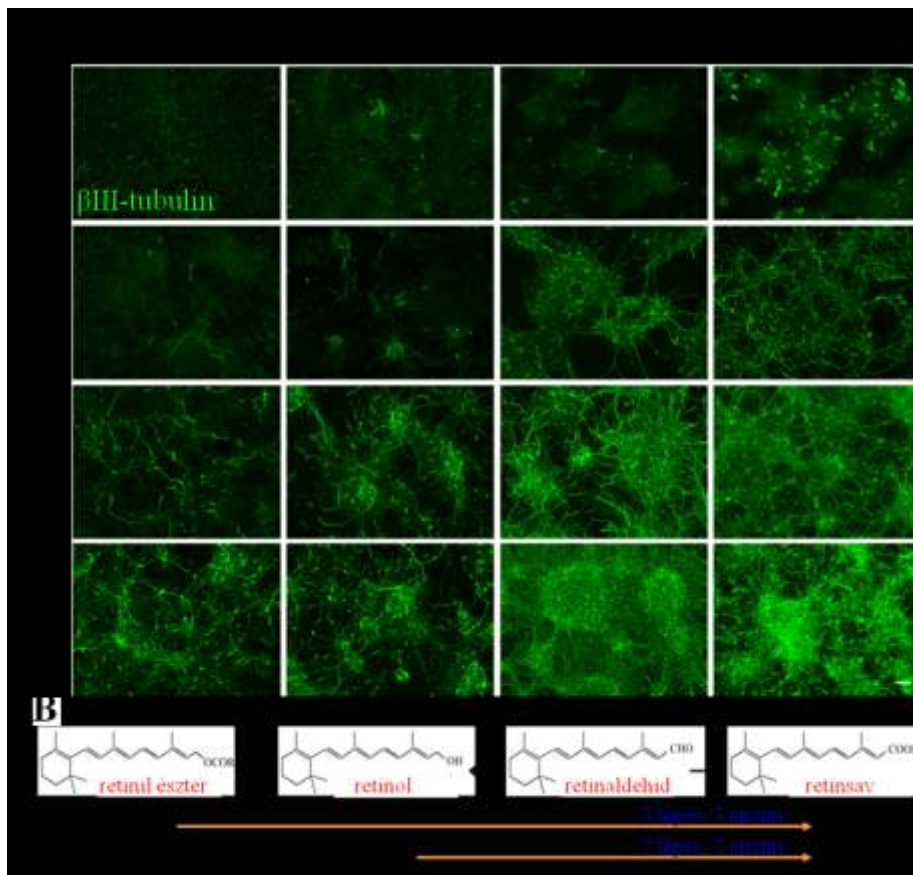
#### *4.3.3.2. Az NE-4C sejtek differenciálódásának vizsgálata fehérje szinten*

Az mRNS szintjén történő változások jellemzése után vizsgáltuk az NE-4C sejtek differenciációját a négy különböző indukciós hatásra fehérje szinten is. Az így kezelt tenyészeteket fixáltuk és immuncitokémiai festések segítségével ellenőriztük a differenciáció folyamatát (38. ábra). A vizsgálatok során az idegsejtek megjelenésével és mennyiségével jellemeztük a folyamat előrehaladását.

Kísérleteink során azt figyeltük meg, hogy a szérumentes táphoz hozzáadott retinil-észter és retinol hatására is tapasztalható az idegi irányú differenciáció, csakúgy, mint a retinsavas és retinoid mentes indukció hatására. Az idegsejtek keletkezésében azonban megfigyelhető a már RNS szinten is szembetűnő időbeli és mennyiségi eltolódás. A sorrend fehérje szinten is a már felvázolt  $DM+RA > DM+ROL > DM+RE \geq DM$  egymásutánosság.

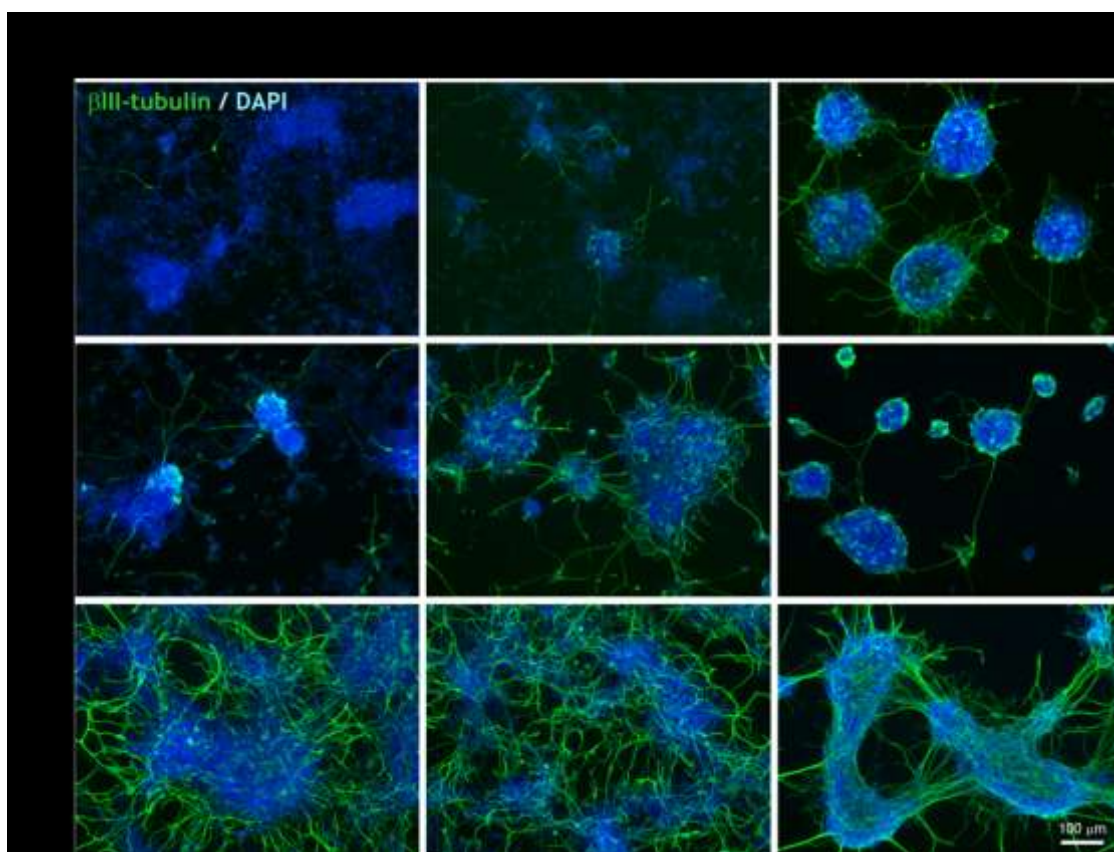
A késés tükrözi a retinsav szintézis lépéseinek (38/B ábra) sorrendjét, ahol a retinil-észter átalakításához 3 lépésre van szükség és 3 féle enzimnek kell a megfelelő mennyiségben jelen lennie, míg a retinol retinsavvá alakítása 2 lépésös folyamat és 2 féle enzimnek kell megfelelő mennyiségben elérhetőnek lennie és működni. Nagyon valószínű tehát,

hogy az időbeli eltolódásért az enzimszintézis a felelős, amely a több részből álló folyamat esetén időigényesebb.



**38. ábra:** Az NE-4C sejtek 4 féle indukciója. **A:** A különböző indukciók (szérummentes, retinil-észteres, retinolos és retinsavas) során keletkezett idegsejtek  $\beta$ III-tubulin immunfestéssel jelölve a differenciáció különböző napjain. **B:** a retinil-észter és a retinol retinsavvá alakításának folyamatábrája.

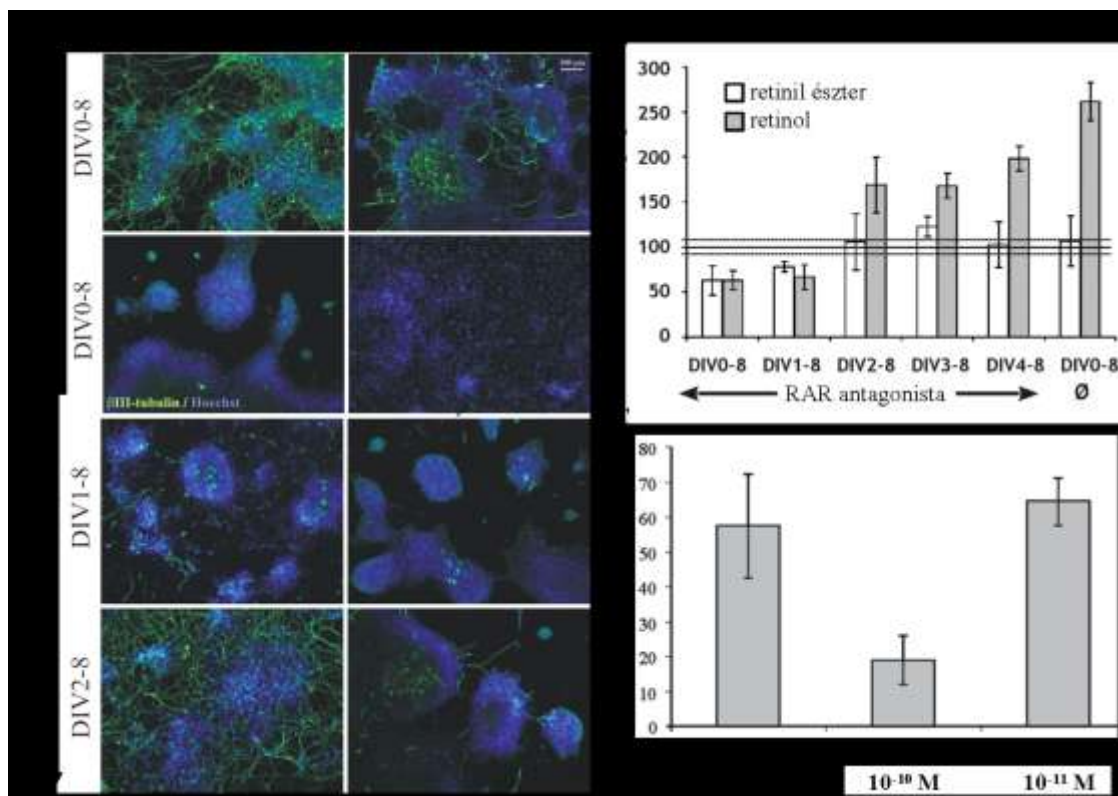
Vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a különböző retinoidokkal történő indukciók mindegyike koncentrációfüggő (39. ábra). Szérummentes közegben a retinsav akár pikomólos mennyiségben is hatásos, 100 nM koncentrációt alkalmazva az 5. napon már tömegesen figyelhetőek meg az idegsejtek. 100 nM retinol hatására az ötödik napon már megjelennek ugyan az idegsejtek, de számuk messze elmarad a retinsavas kezeléshez képest. A retinil-észter esetében az első neuronok megjelenéséhez – az 5. napra - tízszeres, vagyis 1  $\mu$ M koncentráció szükséges. A koncentrációk növelése dúsabb, nagy mennyiségű idegsejtet tartalmazó, kompaktabb aggregátumokat eredményez az NE-4C sejtek differenciációja során.



**39. ábra:** NE-4C sejtek indukciója különböző koncentrációban hozzáadott retinoidokkal (retinil-észter, retinol, retinsav). A tenyészetek az 5. napon lettek fixálva. Az idegsejteket  $\beta$ III-tubulin (zöld) festéssel azonosítottuk, a sejtmagokat Hoechsttel (kék) jelöltük.

Annak érdekében, hogy kiderítsük, a retinol és a retinil-észter kezelés valóban a retinsav szignalizációs útvonalon keresztül fejt ki a hatását, az ezekkel indukált tenyészeteket retinsav receptor antagonistával kezeltük. Az antagonistát különböző időintervallumokban adtuk a sejt kultúrákhoz (40. ábra).

A kísérletek azt mutatták, hogy az antagonistával kezelt, majd retinollal illetve retinil-észterrel indukált tenyészetekben csökkent a neurogenesis. Tehát a retinsav szignalizáció gátlásával jelentős mértékben csökkenthető a retinoid előalakok differenciáló hatása. Ez pedig azt igazolja, hogy a retinol és a retinil-észter is a retinsav receptorokon keresztül fejt ki hatását, közvetett bizonyítékot szolgáltatva arra, hogy a sejtek a retinoidokat retinsavvá alakítják, és ezzel elősegítik saját differenciációjukat.



**40. ábra:** Retinollal és retinil-észterrel indukált NE-4C sejtek kezelése Rar antagonistával. **A:** különböző időintervallumokban antagonistával kezelt indukciók, az idegsejtek immunfestése  $\beta$ III-tubulinnal (zöld) történt, a sejtmagokat Hoechst jelöli (kék). **B:** az tenyészetekről készített képek denzitometráálásának eredménye grafikonon ábrázolva. **C:** a retinollal indukált NE-4C sejtek kezelése kétféle koncentrációjú antagonistával. *DIV*: az indukció napjainak száma. ( $p < 0,05$ )

Vizsgálódásaink során észrevettük, hogy az antagonista csak akkor gátolta jelentősen az idegsejtek képződését, ha a retinolos illetve retinil-észteres indukciót követő 24 órán belül adtuk a tenyészetekhez (40/B ábra). Az ennél később adagolt antagonista csökkentette ugyan a neuron képződést, de nem tudta teljes mértékben megakadályozni. A neurogenézist csökkentő hatás koncentrációfüggést mutatott (40/C ábra), a  $10^{-10}$  M még hatásosnak bizonyult, a  $10^{-11}$  M koncentráció azonban már nem.

Az eredmények tehát arra utalnak, hogy az NE-4C sejtek képesek a hozzáadott retinolból és retinil-észterből retinsavat előállítani, ami a retinsav receptoron keresztül autokrin módon hatva befolyásolja a neurogenézist. Mivel az elkötelezetlen sejtekből F9 retinsav riporter sejtek segítségével nem tudtunk termelést kimutatni, feltételezhető, hogy a retinsav olyan kis koncentrációban termelődik, amely nem képes a riporter

transzgen kellő mértékű aktiválására, ugyanakkor a differenciációs folyamatok beindításához elegendő.

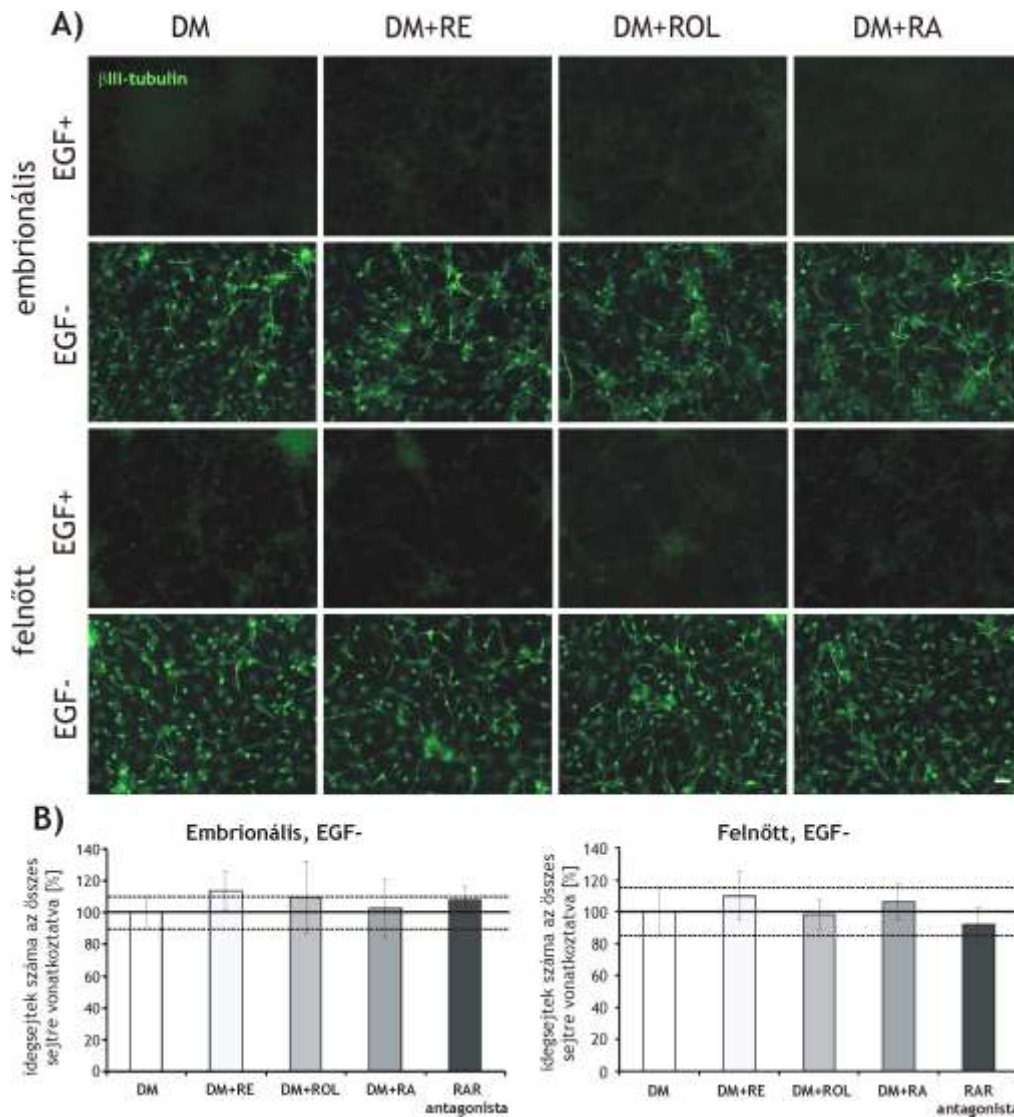
#### 4.3.4. A retinsav hatása a radiális gliasejtek differenciálódására

A retinoidok hatását az NE-4C idegi őssejtek mellett az embrionális és felnőtt eredetű radiális glia klónokon is vizsgáltuk, amelyek a kísérletek előtt legalább két hétig retinoid mentes tápban voltak fenntartva. (A retinoidok megvonása a környezetből nem befolyásolja a sejtek idegsejtképző képességét.) Első lépésként EGF jelenlétében, az indukálatlan tenyészetekhez adtunk retinsavat, retinolt és retinil-észtert (41. ábra). A  $\beta$ III-tubulin immunfestéssel ellenőrzött tenyészetekben nem keletkeztek idegsejtek az indukció 6. napjára. Tehát az NE-4C sejtekkel ellentétben az elkötelezetlen radiális gliasejtekben nem váltották ki a hozzáadott retinoidok az idegi irányú differenciálódást.

Az EGF megvonással neuronális irányba indukált tenyészeteket szintén kezeltük retinoidokkal (41. ábra). A kezelés hatására nem történt változás az idegsejtek számában és időbeli megjelenésében a kontroll, retinoiddal nem kezelt tenyészetekhez képest. Mindezek mellett kezeltük a tenyészeteket retinsav receptor antagonistával is (41/B ábra) és azt tapasztaltuk, hogy a retinsav szignalizáció gátlása sem befolyásolta a neurogenesis mértékét a mintákban.

A radiális gliasejtek idegi irányú differenciációjára tehát nincsenek hatással sem a hozzáadott, sem az endogén retinoidok.





**41. ábra:** Retinoidok hatása a radiális gliasejtekre. **A:** Retinoidokkal kezelt embrionális és felnőtt eredetű radiális glia klónok indukciójának 6. napja, idegsejtek festése βIII-tubulinnal (zöld). **B:** Idegi irányba differenciáltatott radiális glia tenyészetek kezelése RAR antagonistával, a keletkezett idegsejtek azonosítása βIII-tubulin immunfestéssel. A tenyészetekről készült fluoreszcens felvételeket denzitometráltuk és az eredményt grafikonon ábrázoltuk. ( $p < 0,05$ )

Összességében tehát kijelenthetjük, hogy a fiatalabb (9,5 napos) embrióból származó NE-4C sejtek képesek a retinoidokból retinsavat szintetizálni és ezzel befolyásolni a saját idegi irányú elköteleződésüket. Ezzel szemben a 14,5 napos embrióból illetve felnőtt állatból származó radiális gliasejtek klónjai nem igénylik a retinoidokat a neuronális differenciációs programjuk elindításához.

## **5. Megbeszélés**

Az utóbbi évek számos kutatása bizonyította, hogy az asztroglia sejtek képesek az elkötelezetlen őssejtek fejlődését idegi irányba terelni (Song és mtsai, 2002; Nakayama és mtsai, 2003; Luo és mtsai, 2004; Környei és mtsai, 2005; Guo és mtsai, 2013; Tang és mtsai, 2013). Az általunk vizsgált elkötelezetlen embrionális őssejtek és az NE-4C idegi őssejt vonal asztroglia sejtekkel közös ko-kultúrákban idegi irányú differenciációt mutattak. Ez a folyamat morfológiailag és időbeli lefutásában nagyon hasonló volt a sokak által már régóta alkalmazott retinsavas differenciálathoz. Ebből a megfigyelésből származott az a feltételezés, amely szerint az asztroglia sejtek által termelt retinsav az egyik kulcsfontosságú jelátviteli molekula, amely felelős az asztroglia által indukált neurogenesisért a különböző eredetű őssejt populációkban. Ezért munkám során először az asztroglia sejtek és az őssejtek kölcsönhatásait vizsgáltam, különös tekintettel a retinsavra.

### **5.1. Az asztroglia sejtek retinsav termelése**

Kísérleteink során retinoid szenzitív bioassay alkalmazásával bizonyítottuk, hogy a tenyésztett asztroglia sejtek biológiailag aktív retinoidokat termelnek, amelyek aktiválják a Rar szignalizációs útvonalat a körülöttük levő sejtekben. A módszerrel nem tudunk különbséget tenni a termelt retinsav izomerek között, ezért HPLC segítségével is vizsgáltuk a mintákat. A HPLC analízis igazolta, hogy az all-transz retinsav jelen van a tenyésztett asztroglia sejtekben. Az asztroglia sejtek képességét a retinsav termelésre alátámasztja a retinsav szintézis kulcsenzimeinek, a Raldh enzimeknek a jelenléte a sejtekben. Már régóta ismert tény, hogy a kisagyi és az agykérgi asztroglia sejtek Raldh profilja jelentős eltéréseket mutat (McCaffery és mtsai, 2004). Munkánk során mindhárom Raldh enzim mRNS-ét megfigyeltük az asztroglia mintákban és csak kis különbségeket találtunk a különböző agyterületekről származó sejtek között. Ezekkel az eredményekkel megegyezően, nem találtunk jelentős különbséget a retinsav termelésben a riporter assay segítségével sem. A HPLC mérés felfedezett néhány regionális különbséget: az agykéregből származó asztroglia sejtek tartalmazták a legnagyobb mennyiségű all-transz retinsavat. Ez az eltérés közel kétszeres volt a többi



agyterülethez viszonyítva. Megfigyeléseinket alapul véve feltételezhetjük, hogy a retinsav termelés egy általános jellemzője az újszülött egerekből származó, tenyésztett asztroglia-sejteknek.

A tenyésztett sejtekkel ellentétben a frissen izolált asztroglia nem termel kimutatható mennyiségű retinsavat. Ezt az eltérést a tenyésztett és a frissen izolált sejtek között többféleképpen is magyarázhatjuk. Az egyik feltevés szerint az *in vitro* körülmények hatására kiszelektálódik a sejtek egy olyan populációja, amelyik retinsavat termel, esetleges előnyhöz jutva ezzel a tenyésztetben levő többi sejttel szemben. Elképzelhető az a lehetőség is, hogy az agyszövetben az asztroglia-sejtek korlátozott hozzáféréssel rendelkeznek az előállító enzimek szubsztrátjaihoz, míg *in vitro* a tápoldatokban ezek elérhetőek a sejtek számára. Lehetséges magyarázat továbbá, hogy az izolált és *in vitro* fenntartott sejtek felszabadulnak egyfajta gátlás alól, ami akadályozza a retinsav előállítását *in vivo*. Ezek az elképzelések önmagukban vagy kombinálva jelenthetik a megoldást arra, hogy miért látunk szignifikáns retinsav termelést a tenyésztett asztroglia-sejtekben a származási helyüktől függetlenül és miért nem tapasztalunk termelést az agyból frissen izolált asztroglia-sejtekben. Eredményeink más kutatók számára is kiindulópontnak számítottak. Shearer és munkatársai immuncitokémiai festésekkel megmutatták (Shearer és mtsai, 2012), hogy a felnőtt rágcsáló agyban az asztroglia-sejtek nem termelnek detektálható mennyiségű Raldh enzimet. Munkájuk során igazolták, hogy a retinoidok elnyomják a Raldh enzimek expresszióját. Az A vitamin szintjének csökkentése *in vivo* például az asztroglia-sejtek Raldh2 termelésének növekedéséhez vezet a patkány hippocampusban. Eredményeik alapján azt feltételezik, hogy a központi idegrendszerben kimutatható retinoidok tartják a retinsav szintéziséért felelős Raldh enzimeket alacsony expressziós szinten az asztroglia-sejtekben, amelyek ezen keresztül szabályozzák az agy retinoid homeosztázisát.

Mindemellett, a retinsav riporter egerek segítségével felnőtt rágcsálók agyában retinsav érzékeny asztroglia-sejteket mutattunk ki a felnőttkori neurogén zónákban, az oldalkamra mentén a szubventrikuláris zónában és a hippocampus szubgranuláris zónájában. Ezeket a sejteket munkánk során asztroglia és progenitor sejtekként azonosítottuk. A hippocampusban megfigyelhető Gfap és nestin pozitív sejtek valószínűleg azonosak azokkal a sejtekkel amelyeket Alvarez-Buylla és munkatársai

össejtként azonosítottak. Retinsav hozzáadása illetve a retinsav szignalizáció gátlásának szignifikáns hatása van a neurogén régiókban található progenitorok proliferációjára és differenciációjára (Denisenko-Nehrbass és mtsai, 2000; Wang és mtsai, 2005). A neurogén régiókon kívül egyes talamikus magvakban és a mélyebb agykérgi rétegekben is találtunk retinsav érzékeny sejtek. Ezek vizsgálataink során érett idegsejteknek bizonyultak, itt a retinsavnak tehát nem a neurogenesisben van szerepe.

Mindezek mellett nagyon fontos kérdés az, hogy vajon a retinsav érzékeny sejtek azonosak-e a retinsavat termelő sejtekkel, számos esetben ugyanis nem fed át teljesen a két sejtpopuláció.

## **5.2. Az asztroglia eredetű retinsav hatása az őssejtekre**

Az NE-4C idegi őssejtek idegsejteké differenciálthatóak all-transz retinsav vagy asztroglia sejtek jelenlétében (Környei és mtsai, 2005). Ezt figyelhetjük meg az ES sejtek esetében is, azzal az eltéréssel, hogy az ES sejtek egy elődifferenciáltató lépést is igényelnek, amely során embriócsomókat hozunk létre. A sejtek ebben az állapotban már képesek reagálni azokra a jelekre, amelyek a neurális differenciáció irányába terelik őket.

Az asztroglia/őssejt ko-kultúrákban a retinsav szignalizáció blokkolása gátolja az idegsejtek képződését az elkötelezetlen embrionális őssejt aggregátumokban és az NE-4C sejtek tenyésztéseiben. Ez az eredmény alátámasztja az asztroglia eredetű retinsav szerepét az idegi irányú differenciáció kiváltásában. Az asztroglia sejtek termelnek más olyan faktorokat is, amelyek képesek befolyásolni az őssejtek elköteleződését azzal, hogy támogatják a sejtosztódást és a pluripotens állapot fenntartását (Wobus és Boheler, 2005). Ilyen faktorok például az FGF-2 (Chadashvili és Peterson, 2006) és a LIF (Aloisi és mtsai, 1994).

Az elődifferenciáltott ES sejteket asztroglia tenyésztésre helyezve és pan-Rar antagonistával kezelve nem csak azt tapasztaltuk, hogy nagymértékben csökkent a neurogenesis, hanem az aggregátumokban pulzáló sejtek csoportjait figyeltük meg. Ezeket a sejteket szívizom sejtekként azonosítottuk. Tehát az idegi irányú elköteleződés gátlása lehetővé teszi a szívizom irányú differenciációt, amelyet a retinsav gátol. Ezt a megfigyelést más irodalmi adatok is alátámasztják (Aouadi és mtsai, 2006). Ez a

megfigyelés indirekt bizonyítéka annak, hogy az asztroglia sejtek retinsavat termelnek, és azt sugallja, hogy a retinsav szignalizáció befolyásolja a multipotens őssejtek elköteleződését idegi vagy szívizom irányba.

Fontos megjegyeznünk, hogy a retinsav szignalizáció gátlása nem szünteti meg teljesen az idegsejtek képződését. Ennek többféle oka lehet. Elképzelhető, hogy a gátlás során az antagonisták nem fedték le teljesen az összes retinsav kötő helyet a receptorokon. Egy másik kézenfekvő magyarázat szerint a retinsav mellett vannak más faktorok is a rendszerben, amelyek képesek a neurális indukció kiváltására. Az irodalomban találhatóak olyan adatok, amelyek szerint az asztroglia által termelt Wnt szintén képes elindítani a neurogenézist elkötelezetlen őssejtekben (Castello-Branco és mtsai, 2006; Lie és mtsai, 2005). A Wnt útvonal gátlása azonban nem szüntette meg teljesen az asztroglia által indukált idegsejtképződést. Ezek az adatok és a mi eredményeink együttesen arra utalnak, hogy az asztroglia eredetű retinsav és más gliális faktorok – mint például a Wnt – kiegészítik egymás hatását. Ezek egyidejű vagy egymást követő induktív hatása eredményezi az idegi irányú elköteleződést és az idegi fenotípus meghatározását.

Az asztroglia/NE-4C tenyészeteken eltérő időintervallumokban alkalmazott pan-Rar antagonisták másként hatottak a sejtekre. A neurogenézist csak abban az esetben csökkentette, ha a ko-kultúra kialakításának kezdetétől jelen volt, egy napos késéssel hozzáadva már hatástalannak bizonyult. Ez arra utal, hogy a retinsav szerepe az idegi irányú elköteleződés iniciációja. Az antagonisták kezelés hatására egy korai lépés gátlódik, a sejtek nem aggregálódnak, ez pedig elengedhetetlen lenne a differenciációhoz (Tárnok és mtsai, 2002).

Mindezeket együttvéve az adataink azt jelzik, hogy a tenyésztett asztroglia sejtek olyan mennyiségben termelnek retinsavat, amely hatékonyan váltja ki a neuronális elköteleződést az őssejtekben a retinsav receptoron keresztül történő szignalizációs útvonalat aktiválva.

### **5.3. Retinsav produkció a központi idegrendszerben**

A retinsav, mint fontos szabályozó faktor a központi idegrendszer fejlődése során, már régóta a kutatások középpontjában áll. Alapos vizsgálatoknak vetették alá, hogy hol

fejti ki hatását, milyen génekre hat és azoknak milyen a térbeli és időbeli eloszlása, milyen szerepe van a neurogenesis szabályozásában (Maden, 2002; 2007). Az utóbbi évekig azonban nem került előtérbe, hogy esetleg a felnőtt idegrendszerben is lehet feladata. A retinsav hatása a posztnatális agyban csak bizonyos, erősen lokalizált régiókban érhető tetten (35. ábra). Ma már számtalan bizonyíték támasztja alá, hogy a hippocampus területén befolyásolja a szinaptikus plaszticitást (Misner és mtsai, 2001; Aoto és mtsai, 2008; Chen és Napoli, 2008), szabályozza a proliferációt és a neurogenesis a szaglóhámában, a szubventrikuláris zónában és a szubgranuláris régióban (Asson-Batres és mtsai, 2003; Haskell és LaMantia, 2005; Wang és mtsai, 2005; Jacobs és mtsai, 2006).

A szubventrikuláris zónában a retinsav elősegíti a progenitorok osztódását és neuronális differenciációját is (Haskell és LaMantia, 2005; Wang és mtsai, 2005). Munkánk során ebben a régióban megfigyeltünk retinsav reszponzív asztroglia sejteket és idegi progenitorokat, a retinsav szintéziséért felelős enzimek jelenlétét azonban nem tudtuk bizonyítani. Ezzel szemben az oldalkamrában található choroid plexus jelentős mértékű Raldh2 immunpozitivitást mutatott.

A hippocampus szubgranuláris zónájában található retinoid reszponzív sejtek nagy többségét szemcsesejteként azonosítottuk. A hippocampális sejtek neuronális differenciációjához és túléléséhez nélkülözhetetlen az A vitamin, de a szemcsesejtek osztódásához nem szükséges (Jacobs és mtsai, 2006). Irodalmi adatok támasztják alá, hogy in situ hibridizációs és immunhisztokémiai kísérletekkel nem lehet kimutatni a Raldh enzimeket rágcslók hippocampusában (Goodman és mtsai, 2012; Shearer és mtsai, 2012). Ezek az eredmények alátámasztják az általunk kapott képet, amely szerint az agyszövetben – és így a hippocampusban sem – figyeltünk meg Raldh2 immunpozitív sejteket. Nagyon fontos fejlemény azonban, hogy a Raldh2 enzim jelen van a hippocampust is borító agyhártyában, amely így potenciális retinsav forrása a környező szöveteknek, amelyekbe a retinsav diffúzióval gradiens szerűen bejut (Goodman és mtsai, 2012).

#### 5.4. Az idegi őssejtek retinsav termelése

Vizsgálataink során jelentős különbséget figyeltünk meg az NE-4C idegi őssejtvonal (E9,5) és a radiális gliasejtek (E14,5 illetve P62) retinoid metabolizmusában és a retinsav rezponzivitásában. Az NE-4C sejtek idegi őssejt tulajdonságokkal rendelkeznek és különböző hatásokra idegsejtekké, asztroglia-sejtekké vagy oligodendroglia-sejtekké differenciálhatóak (Schlett és mtsai, 1997; Jelitai és mtsai, 2007; Hádinger és mtsai, 2009; Markó és mtsai, 2011).

Karakterisztika		Idegi őssejt/progenitor klónok		
		NE-4C cells	Radial glia like cells (RGI)	
Eredet		embrionális (E9) anterior agyhólyag	embrionális (E14,5) előagy	fejnőtt (P62) SVZ, HC
Az izolálás elve		folyamatos osztódás szérumban	szelektív adhézió és fenntartás AK-c(RGDfC) peptiden, szérumban	
Sejtciklus ideje		16 óra	~20 óra	22-24 óra
Cítokémiai markerek	nestin	+	+	+
	RC2	-	+	+
	GFAP	-	-	+
	βIII-tub	-	-	-
Gén expresszió (RT-PCR adatok alapján)	Oct 4	+	-	-
	Nanog	+	-	-
	Sox2	+	+	+
	Pax6	-	+	+
	B1bp	+	+	+
	GLAST	+	+	+
	Ngn2	-	+	+
	Mash1	-	+	+
Math2	-	-	-	
Az idegi irányú elköteleződés kiváltása/differenciálódott utódok		retinsav vagy szérumban megvonás (neuronok és asztroglia-sejtek)*	EGF megvonás (neuronok); szérumban mennyiség növelése (asztroglia-sejtek); PDGF + FGF + forskolin / T3 + AA (oligodendroglia)	

**5. táblázat:** Az NE-4C idegi őssejtek (Schlett és mtsai, 1997) és a radiális gliasejtek klónjainak (Markó és mtsai, 2011) jellemzése. \* Az NE-4C sejtek differenciációját oligodendroglia-sejtekké csak lézionált agykéregbe implantált sejtek esetében figyeltünk meg (Anderová és mtsai, 2006).

A sejtek gén és fehérje expressziós jellemzői arra engednek következtetni, hogy az NE-4C sejtek „radiális neuroepitel” sejtpopulációként viselkednek (5. táblázat) (Götz és Huttner, 2005). Ezek a sejtek az idegi irányú indukcióhoz retinsavat igényelnek, ezt bizonyítja az is, hogy a retinsav receptor antagonistá alkalmazásával a neurális differenciáció megakadályozható.

A radiális gliasejtek – függetlenül a származási helyüktől és az egér korától – hosszúkás sejtalakkal rendelkeznek, RC2 fehérjét tartalmazzák, radiális glia markereket expresszálnak és a megfelelő körülmények között idegsejteké, asztroglia-sejteké és oligodendroglia-sejteké differenciálhatóak (Markó és mtsai, 2011). A radiális gliasejtek tulajdonságai (5. táblázat) arra utalnak, az NE-4C sejtekhez képest előrehaladottabb progenitor állapottal rendelkeznek. A különböző életkorokból izolált radiális gliasejtek igazolják, hogy a teljes élet során létezik az egerekben egy olyan progenitor populáció, amely bármilyen életkorban képes lehet osztódásra és új idegi elemek létrehozására. Az NE-4C sejtekkel ellentétben azonban ezek a sejtek nem igénylik a *potens*, *in vitro* neuronális induktor hatású all-transz retinsavat idegi irányú differenciációjukhoz.

Vizsgálataink során igazoltuk, hogy az elkötelezetlen NE-4C sejtek kevesebb retinsavat termelnek, mint a radiális gliasejtek. A kis mennyiségű retinsav termelés pedig e sejtek esetében összefügg a magas retinsav szenzitivitással. Az ES sejtekhez hasonlóan (Götz és Huttner, 2005) az NE-4C sejtek már pikomólos retinsav koncentráció hatására képesek idegsejteké differenciálódni és elegendő mennyiségű retinsavat termelnek ahhoz, hogy ez – autokrin módon - neurális indukciót válthasson ki. A retinoidok metabolizmusának képességét támasztja alá, hogy más retinoidok (retinil-észter és retinol) hozzáadása is differenciációt idéz elő, amely gátolható a retinsav receptor antagonistá hozzáadásával. Ezekkel a megfigyelésekkel egybevágóan a génexpressziós eredmények: az indukálatlan NE-4C sejtekben *Stra6*, *Lrat*, *Rdh10* és *Raldh3* mRNS-ét mutattuk ki. További bizonyítékként szolgál a különböző retinoidok jelenlétében megfigyelt időbeli késés az idegsejtek keletkezése során (lásd 31/B ábra), valamint a direkt retinsav reszponzív gének (*Cyp26a1*, *Rara* és *Rarb*) kifejeződésében megfigyelt időbeli eltolódás, amit feltehetően az aktív retinoidok akkumulációja okoz. Mivel a retinsav riporter assay segítségével nem tudtunk retinsav termelést kimutatni, feltételezzük, hogy annak mennyisége a módszer érzékenységi határa alatt van (1nM)

(Környei és mtsai, 2007). Mindezek alapján tehát feltételezhetjük, hogy a sejtek rendelkeznek egy bizonyos szintű retinsav szintézissel, amelynek mértéke befolyásolható hozzáadott retinoidokkal vagy a sejtek saját metabolizmusának megváltozásával. Mindez felveti az idegi őssejt differenciáció autokrin szabályozásának lehetőségét.

Az NE-4C sejtek magas retinsav rezponzivitását magyarázhatja, hogy a lebontásért felelős Cyp26 enzimek mRNS-ei nem, vagy csak kis mennyiségben expresszálódnak az elkötelezetlen sejtekben, de az idegi irányú differenciáció során a mennyiségük megnövekszik. Ezek az enzimek olyan biológiailag aktív retinoid metabolitokat hoznak létre – mint például a 4-oxo retinsav és a 4-hidroxi retinsav -, amelyek közreműködnek például az ES sejtek (Langton és Gudas, 2008) illetve az idegi progenitorok (Goncalves és mtsai, 2009) differenciációjában.

Az NE-4C sejtekkel ellentétben a radiális gliasejtek módszereinkkel is kimutatható mennyiségű retinsavat termelnek, de differenciációjukhoz nem igényelnek retinsavat. A keletkező idegsejtek arányát nem befolyásolja sem a hozzáadott retinsav, sem a retinsav receptor antagonisták alkalmazása. A retinoid mentes közegben izolált és nevelt sejtek pedig ugyanúgy képesek EGF megvonás hatására neuronokká differenciálódni.

Az eredetileg szérumban ismert retinol kötő fehérje, az RBP4 mRNS-e jelen van az NE-4C és a radiális gliasejtekben is, függetlenül attól, hogy azok milyen fejlődési állapotban vannak. Az *Rbp4* valószínűleg hozzájárul az A vitamin elérhetőségének szabályozásához az idegi őssejtek és progenitor sejtek (Haskell és LaMantia, 2005; Wang és mtsai, 2005) vagy fejlődő és érett idegsejtek (Komatsu és mtsai, 2005; Chen és Reese, 2011) számára. Meglepő eredmény ugyanakkor, hogy a radiális gliasejtekből hiányzik az A vitamin felvételéért felelős Stra6 receptor mRNS-e. Ez magyarázhatja ezekben a sejtekben a retinol rezponzivitás hiányát, viszont nem ad választ arra, hogy a retinsav prekursorok hogyan kerülnek a sejtbe. Elképzelhető, hogy a retinolt alternatív módon veszik fel a sejtek, például a megalin mediált A vitamin transzport alkalmazásával (McCarthy és Argraves, 2003; Huang és mtsai, 2012).

A radiális gliasejtek retinsav termelése a külső retinoid forrástól függ. Ez magyarázhatja azt is, hogy ezekben a sejtekben nincs *Lrat* expresszió, amely enzim a retinol retinil-észter formájában történő raktározásáért felelős. Az *Lrat* gén inaktivitása

arra utal, hogy sejten belüli raktár helyett a radiális gliasejtek a sejten kívül elérhető szubsztrátokból állítja elő a retinsavat.

Számos adat bizonyítja, hogy retinsav rezponzív sejtek vannak a posztnatális rágcsáló agy őssejt niche-ében (Wagner és mtsai, 2002; Mey és McCaffery, 2004; Lane és Bailey, 2005; Wagner és mtsai, 2006; Környei és mtsai, 2007, Fragoso és mtsai, 2012). A retinoidok számos ponton szabályozzák az idegrendszer sejtjeinek fejlődését, hatással vannak a regionális és fenotípus determinációra (Kim és mtsai, 2009), a gliogenezisre (Hádinger és mtsai, 2009), a nyúlványnövekedésre (Clagett-Dame és mtsai, 2006), a szinaptikus működésre (Aoto és mtsai, 2008) és számos más folyamatra, amelyek tárgyalása továbbmutatna e dolgozat anyagán. Eredményeink azt mutatják, hogy a retinsav hatása az idegi őssejtek és progenitorok különböző fejlődési és differenciálódási stádiumaiban eltérő lehet.

Eredményeink alapján a retinsav hatása a neuronális és gliális differenciációra csak a kevéssé elkötelezett, korai fenotípusú őssejt populációkban nyilvánul meg. Ezek a sejtek rendelkeznek a teljes, retinoid metabolizmushoz szükséges enzimkészlettel, így hozzá tudnak járulni neuronális elköteleződésük autokrin regulációjához.

A radiális gliasejtek retinsav termelésének szerepe ma még nem teljesen átlátható. A sejtekben nem mutatható ki az összes retinoid átalakításhoz szükséges elem, így hiányoznak például a raktározásért és a lebontásért felelős enzimek, függetlenül attól, hogy milyen differenciációs állapottal rendelkeznek éppen. Mindez azt sugallja, hogy az autokrin retinsav hatás – mint a parakrin szignalizáció (Sockanathan és Jessell, 1998) és a retinsav által kiváltott növekedési faktor függés (McCaffery és Drager, 2000) - hozzájárulhat a radiális glia-szerű idegi őssejt fenotípus fenntartásához.



## **6. Következtetések**

- Az asztroglia sejtek *in vitro* körülmények között képesek indukálni különböző eredetű, őssejt-sajátságokkal rendelkező sejtek neuronális differenciációját.
- A különböző agyterületekről származó, tenyésztett asztroglia sejtekben jelen van a retinsav szintéziséhez szükséges kulcsenzimek mindegyike és a tenyészetekből többféle módszer alkalmazásával kimutatható az all-transz retinsav direkt jelenléte.
- A retinsav szignalizáció gátlásakor a neuronális differenciáció mértékében tapasztalt csökkenés bizonyítja, hogy az asztroglia sejtek által termelt retinsav a retinsav receptorokon keresztül fejt ki indukációs hatását.
- Az *in vitro* tapasztalatokkal ellentétben az asztroglia sejtek *in vivo* nem termelnek retinsavat, annak ellenére, hogy rendelkeznek a szükséges enzimkészlet mRNS-ével. Az asztroglia sejtek retinsav termelése valószínűleg a tenyésztés során erősödik fel.
- Az asztroglia sejtek mellett az általunk vizsgált idegi őssejtek is termelnek retinsavat, produkciójuk azonban függ a rendelkezésre álló metabolitok mennyiségétől. Ha azonban ezek rendelkezésre állnak, akkor a sejtek képesek a szubsztrátok felhasználásával retinsavat szintetizálni, amely elősegíti a saját differenciációjukat.
- A felnőttkori neurogén zónákban jelen van a retinsav. Asztroglia sejtek és idegi progenitorok környezetében kimutatható, ezekben a sejtekben azonban a termeléshez szükséges egyik enzim, a Raldh2 nem expresszálódik. Ezek szerint az itt levő retinsavat ezek a sejtek másik enzimek segítségével állítják elő, vagy az agyhártya felől kapják diffúzióval. Az ugyanis a teljes élet során termel jelentős mennyiségben retinsavat.

## 7. Összefoglalás

A retinsav széles körben alkalmazott indukciós faktor, amely különböző eredetű multipotens sejtpopulációk (embrionális karcinóma, embrionális és idegi őssejtek valamint iPS sejtek) neuronális differenciációját képes kiváltani *in vitro*. A retinsav *in vivo* fontos szerepet játszik az agy embrionális fejlődésében, és ahogyan azt mi is bizonyítottuk, a felnőtt agy neurogén régióiban is jelen van. Az adatok azt mutatják, hogy a retinsavnak a teljes élet során szerepe van az idegi őssejtek elköteleződésének és differenciációjának szabályozásában. Vizsgálataink során az idegi őssejtek retinsav reszponzívnek bizonyultak, mégis keveset tudunk i; az idegi őssejtek retinsav előalakokat átalakító képességéről és ii; a retinsav metabolizmus/szignalizáció komponenseinek átrendeződéséről az idegi őssejtekben a fejlődés során. Dolgozatomban bemutattam az idegi őssejtek/progenitorok retinsav reszponzivitását és retinsav termelő képességét. Továbbá szemléltettem a differenciációfüggő változásokat a retinoid metabolizmus tagjainak génexpressziójában. Eredményeim azt mutatják, hogy a korai, embrionális neuroektodermális (NE-4C) őssejtek és a késői embrionális illetve felnőtt eredetű radiális glia progenitorok képesek bioaktív retinoidokat termelni, de különbözőképpen reagálnak a retinoid szignálra. A radiális gliasejtek neuronális differenciációjával szemben, amely retinsavval nem indukálható, az NE-4C sejtekből idegsejtek formálódnak a retinsav és előalakjai (retinol és retinil-észter) hatására is. Adataink azt mutatják, hogy az endogén retinsav produkció hozzájárulhat egyes idegi őssejt populáció neuronális differenciációjának autokrin regulációjához.

További adataim bizonyítják, hogy az asztroglia sejtek fontos szabályozói az őssejtek differenciációjának. Az asztroglia sejtek hatására ugyanis az elkötelezetlen őssejtek idegi irányba fejlődnek; *in vitro* all-transz retinsavat termelnek; valamint bizonyítom, hogy ez a gliális retinsav felelős a különböző őssejtek idegi irányú differenciációjáért. Ezek az *in vitro* adatok azt sugallják, hogy az asztroglia potenciális retinsav forrás lehet a központi idegrendszerben. Másfelől azonban, a posztnatális agyból izolált asztroglia sejtek nem termelnek retinsavat és a gliális Raldh expresszió erősen szabályozott *in vivo*. Tehát az asztroglia regulált forrása lehet a retinsavnak és jelentős szerepet játszhat az agy retinoid homeosztázisának fenntartásában.

Végül, az eddig azonosítatlan meningeális sejt típusok teljes élet során történő retinsav termelése előre vetíti, hogy a retinoidok, amelyek összetett gyulladáscsökkentő funkcióval rendelkeznek, fontos immun-szabályozó szereppel bírhatnak az agy perifériáján.

## **8. Summary**

Retinoic acid has been widely used as a potent inducer of neuronal differentiation in various multipotent cell populations (ES, iPS cells, embryonic carcinoma and neural stem cells), *in vitro*. *In vivo* retinoic acid plays a major role in the regulation of embryonic brain development and – among others – we have also demonstrated, that retinoic acid is present in the major neurogenic niches within the adult brain too. The data indicate that retinoic acid signaling is involved in the regulation of neural stem cell commitment and differentiation throughout life. While neural stem cells were shown to respond to retinoic acid, little is known about i; the potential of neural stem cells to utilize retinoic acid precursor molecules and ii; the rearrangement of the components of retinoid metabolism/signaling during neural stem cell development. Here I provide data on the retinoid responsiveness and retinoic acid production of distinct neural stem cell/neural progenitor populations. In addition, I demonstrate differentiation-related changes in the expression of genes encoding proteins of the retinoid machinery, including components responsible for uptake (Stra6) and storage (Lrat) of vitamin A, transport of retinoids (Rbp4, CrbpI, CrabpI,II), synthesis (Rdh10, Raldh1-4), degradation of retinoic acid (Cyp26a1-c1) and retinoic acid signaling (Rar $\alpha,\beta,\gamma$ , Rxr $\alpha,\beta,\gamma$ ). The data show that both early embryonic neuroectodermal (NE-4C) stem cells and late embryonic or adult derived radial glia like progenitors are capable to produce bioactive retinoids but respond differently to retinoid signals. However, while neuronal differentiation of radial glia like cells can not be induced by retinoic acid, neuron formation by NE-4C cells is initiated by both retinoic acid and retinoic acid precursors (retinol or retinyl acetate). The data indicate that endogenous retinoic acid production, at least in some neural stem cell populations, may result in autocrine regulation of neuronal differentiation.

I also present data supporting the view that astroglial cells are key regulators of stem cells differentiation. Namely, I show, that astroglial cells instruct noncommitted stem cells to adopt a neuronal fate; provide strong *in vitro* evidence, that astrocytes actively produce all-trans retinoic acid; and demonstrate, that astroglia-derived retinoic acid is a key factor in glia induced neuronal differentiation of various stem cell populations. These *in vitro* studies suggest that astrocytes may be a potential source of retinoic acid in the CNS. On the other hand, our data on the lack of retinoic acid production by glial cells sorted directly from the postnatal brain along with some recent findings on moderate glial Raldh expression *in vivo* suggest, that astrocytes act as a regulated source of retinoic acid and may have a key role in maintaining retinoid homeostasis in the brain.

Finally, our observations on the life-long retinoic acid production by some yet unidentified meningeal cell types predicts, that retinoids, known to have multiple anti-inflammatory functions may play important immune regulatory role at the brain periphery.

## **9. Irodalomjegyzék**

- Aaku-Saraste E, Hellwig A, Huttner WB. (1996) Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev Biol.* 15;180(2):664-79.
- Aaku-Saraste E, Oback B, Hellwig A, Huttner WB. (1997) Neuroepithelial cells downregulate their plasma membrane polarity prior to neural tube closure and neurogenesis. *Mech Dev.* 69(1-2):71-81.
- Abu-Abed S, Dollé P, Metzger D, Beckett B, Chambon P, Petkovich M. (2001) The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev.* 15, 226–240
- Adams J, Lammer E. (1991) Relationship between dysmorphology and neuropsychological function in children exposed to isotretinoin “in utero.” In: Fujii T, Boer GJ, editors. Functional neuroteratology of short term exposure to drugs. Tokyo: Teikyo University Press. pp. 159–170.
- Adams J, Lammer EJ. (1993) Neurobehavioral teratology of isotretinoin. *Reprod Toxicol* 7:175–177.
- Adams J. (1993) Structure-activity and dose-response relationships in the neural and behavioral teratogenesis of retinoids. *Neurotoxicol Teratol* 15:193–202.
- Aloisi F, Rosa S, Testa U, Bonsi P, Russo G, Peschle C, Levi G. (1994) Regulation of leukemia inhibitory factor synthesis in cultured human astrocytes. *J. Immunol.* 152, 5022–5031
- Altman J, Das GD. (1965) Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature.* 207(5000):953-6.
- Alvarez CV, Garcia-Lavandeira M, Garcia-Rendueles ME, Diaz-Rodriguez E, Garcia-Rendueles AR, Perez-Romero S, Vila TV, Rodrigues JS, Lear PV, Bravo SB. (2012) Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *J Mol Endocrinol.* 49(2):R89-111.
- Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F. (1988) Mapping of radial glia and of a new cell type in adult canary brain. *J Neurosci.* 8(8):2707-12.
- Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F. (1990a) Proliferation "hot spots" in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron.* 5(1):101-9.
- Alvarez-Buylla A. (1990b) Mechanism of neurogenesis in adult avian brain. *Experientia.* (9):948-55.
- Alvarez-Buylla A, Lois C. (1995) Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells.* 13(3):263-72.
- Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F. (2002) Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull.* 57(6):751-8.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA. (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron.* 41(5):683-6.
- Anderová M, Kubinová S, Jelítai M, Neprasová H, Glogarová K, Prajerová I, Urdzíkóvá L, Chvátal A, Syková E. (2006) Transplantation of embryonic neuroectodermal progenitor cells into the site of a photochemical lesion: immunohistochemical and electrophysiological analysis. *J Neurobiol.* 66(10):1084-100.

- Aoto J, Nam CI, Poon MM, Ting P, Chen L. (2008) Synaptic signaling by all-trans retinoic acid in homeostatic synaptic plasticity. *Neuron* 60(2):308-20.
- Aouadi M, Bost F, Caron L, Laurent K, Le Marchand Brustel Y, Binetruy B. (2006) p38 mitogen-activated protein kinase activity commits embryonic stem cells to either neurogenesis or cardiomyogenesis. *Stem Cells* 24, 1399–1406
- Applebury ML, Hargrave PA. (1986) Molecular biology of the visual pigments. *Vision Res.* 26, 1881-1895.
- Arlappa N, Laxmaiah A, Balakrishna N, Harikumar R, Brahmam GN. (2008) Clinical and sub-clinical vitamin A deficiency among rural pre-school children of Maharashtra, India. *Ann. Hum. Biol.* 35, 606–614.
- Arnhold T, Tzimas G, Wittfoht W, Plonait S, Nau H. (1996) Identification of 9-cis-retinoic acid, 9,13-di-cis-retinoic acid, and 14-hydroxy-4,14-retro-retinol in human plasma after liver consumption. *Life Sci* 59: 169–177.
- Asson-Batres MA, Zeng MS, Savchenko V, Aderoju A, McKanna J. (2003) Vitamin A deficiency leads to increased cell proliferation in olfactory epithelium of mature rats. *J Neurobiol* 54:539–554.
- Au-Fliegner M, Helmer E, Casanova J, Raaka BM, Samuels HH. (1993) The conserved ninth C-terminal heptad in thyroid hormone and retinoic acid receptors mediates diverse responses by affecting heterodimer but not homodimer formation. *Mol. Cell. Biol.* 13:5725–5737.
- Balmer JE, Blomhoff R. (2002) Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* 43(11):1773-808.
- Batourina E, Gim S, Bello N, Shy M, Clagett-Dame M, Srinivas S, Costantini F, Mendelsohn C. (2001) Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression. *Nature Genet.* 27, 74–78.
- Beddington RS, Robertson EJ. (1998) Anterior patterning in mouse. *Trends Genet.* 14, 277–284.
- Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A. (2002) Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(17):11464-9
- Berry M, Rogers AW. (1965). The migration of the neuroblasts in the developing cerebral cortex. *J. Anat.* 99, 691-709.
- Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT. (1972) Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res,* 43: 429-435.
- Bignami A, Dahl D. (1976) The astroglial response to stabbing. Immunofluorescence studies with antibodies to astrocyte-specific protein (GFAP) in mammalian and submammalian vertebrates. *Neuropathol Appl Neuro,* 2: 99-110.
- Blaner WS, Olson JA. (1994) Retinol and retinoic acid metabolism, in: MB Sporn, AB Roberts, DS Goodman (Eds.), *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*, 2nd Ed., Raven Press, Ltd., New York, pp. 229–256.
- Blomhoff R, Green MH, Green JB, Berg T, Norum KR. (1991) Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol Rev.* 71(4):951-90.
- Blomhoff R. (1994) *Vitamin A in Health and Disease.* New York: Dekker, p. 1–677.
- Blomhoff R, Blomhoff HK. (2006) Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol.* 66(7):606-30.
- Bok D, Heller J. (1976) Transport of retinol from the blood to the retina: an autoradiographic study of the pigment epithelial cell surface receptor for plasma retinol-binding protein. *Exp Eye Res.* 22(5):395-402.

- Borovski T, De Sousa E, Melo F, Vermeulen L, Medema JP. (2011) Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res.* 71(3):634-9
- Borrelli E, Chambon P. (1999) Control of transcription and neurological diseases. *Mol Psychiatry.* 4(2):112-114.
- Bouillet P, Sapin V, Chazaud C, Messaddeq N, Decimo D, Dolle P, Chambon P. (1997) Developmental expression pattern of Stra6, a retinoic acid-responsive gene encoding a new type of membrane protein. *Mech Dev.* 63(2):173-86.
- Brockes JP. (1989) Retinoids, homeobox genes, and limb morphogenesis. *Neuron* 2: 1285-1294.
- Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, McLay R, Hall J, Ying QL, Smith A. (2008) Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 135 1287–1298.
- Butcher RE, Brunner RL, Roth T, Kimmel CA. (1972) A learning impairment associated with maternal hypervitaminosis-A in rats. *Life Sci* 11:141–145.
- Butcher RE, Hoar RM, Nolan GA, Vorhees CV. (1979) Interlaboratory comparison of behavioral testing. *J Assoc Off Anal Chem.* 62(4):840-3.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience.* 56(2):337-44.
- Cameron HA, Tanapat P, Gould E. (1998) Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience.* 82(2):349-54.
- Cameron RS, Rakic P. (1991) Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia,* 4: 124-137.
- Castelo-Branco G, Sousa KM, Bryja V, Pinto L, Wagner J, Arenas E. (2006) Ventral midbrain glia express regionspecific transcription factors and regulate dopaminergic neurogenesis through Wnt-5a secretion. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 251– 262
- Chadashvili T, Peterson DA. (2006) Cytoarchitecture of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR-2) immunoreactivity in astrocytes of neurogenic and non-neurogenic regions of the young adult and aged rat brain. *J. Comp. Neurol.* 498, 1– 15
- Charest A, Wainer BH, Albert PR. (1993) Cloning and differentiation-induced expression of a murine serotonin1A receptor in a septal cell line. *J Neurosci.* 13(12):5164-5171.
- Chen H, Namkung MJ, Juchau MR. (1995) Biotransformation of all-trans-retinol and all-trans-retinal to all-trans-retinoic acid in rat conceptal homogenates. *Biochem Pharmacol* 50: 1257–1264.
- Chen N, Napoli JL. (2008) All-trans-retinoic acid stimulates translation and induces spine formation in hippocampal neurons through a membrane-associated RARalpha. *FASEB J* 22:236–245.
- Chen N, Onisko B, Napoli JL. (2008) The nuclear transcription factor RARalpha associates with neuronal RNA granules and suppresses translation, *J Biol Chem.* 283(30):20841-7.
- Chen F, Desai TJ, Qian J, Niederreither K, Lü J, Cardoso WV. (2007) Inhibition of Tgf beta signaling by endogenous retinoic acid is essential for primary lung bud induction. *Development* 134, 2969–2979.

- Chen Y, Reese DH. (2011) The retinol signaling pathway in mouse pluripotent P19 cells. *J Cell Biochem* 112:2865-72.
- Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. (1999) In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *PNAS* 96 3120–3125.
- Chiang MY, Misner D, Kempermann G, Schikorski T, Giguère V, Sucov HM, Gage FH, Stevens CF, Evans RM. (1998) An essential role for retinoid receptors RAR $\beta$  and RXR $\gamma$  in long-term potentiation and depression. *Neuron*. 21(6):1353-1361.
- Cho S, Chung J, Han J, Ju Lee B, Han Kim D, Rhee K, Kim K. (2001a) 9-cis-Retinoic acid represses transcription of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene via proximal promoter region that is distinct from all-trans-retinoic acid response element. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 87 (2), 214–222.
- Cho S, Chung JJ, Choe Y, Choi HS, Han Kim D, Rhee K, Kim K. (2001b). A functional retinoic acid response element (RARE) is present within the distal promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 87 (2), 204–213.
- Chytil F. (1992) The lungs and vitamin A. *Am J Physiol.* 262(5 Pt 1):L517-27.
- Clagett-Dame M, McNeill EM, Muley PD. (2006) Role of all-trans retinoic acid in neurite outgrowth and axonal elongation. *J Neurobiol* 66:739-56.
- Clarke SR, Shetty AK, Bradley JL, Turner DA. (1994) Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. *Neuroreport*, 5: 1885-1888.
- Cocco S, Diaz G, Stancampiano R, Diana A, Carta M, Curreli R, Sarais L, Fadda F. (2002) Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience*. 115(2):475-482.
- Cochard P, Paulin D. (1984) Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo. *J Neurosci.* 4(8):2080-94.
- Cohlan SQ. (1953) Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science* 117:535–536.
- Cohlan SQ. (1954) Congenital anomalies in the rat produced by excessive intake of vitamin A during pregnancy. *Pediatrics* 13:556–567.
- Colak D, Mori T, Brill MS, Pfeifer A, Falk S, Deng C, Monteiro R, Mummery C, Sommer L, Götz M. (2008) Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells. *J Neurosci.* 28(2):434-46.
- Collop AH, Broomfield JA, Chandraratna RA, Yong Z, Deimling SJ, Kolker SJ, Weeks DL, Drysdale TA. (2006) Retinoic acid signaling is essential for formation of the heart tube in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 291, 96–109.
- Coluccia A, Belfiore D, Bizzoca A, Borracci P, Trerotoli P, Gennarini G, Carratù MR. (2008a) Gestational all-trans retinoic acid treatment in the rat: neurofunctional changes and cerebellar phenotype. *Neurotoxicol Teratol* 30:395–403.
- Coluccia A, Borracci P, Belfiore D, Renna G, Giustino A, Carratù MR. (2008b) Effects of early gestational all-trans retinoic acid treatment on motor skills: a longitudinal study in the offspring of Sprague-Dawley rats. *Neurotoxicology* 29:1107–1113.
- Coluccia A, Borracci P, Belfiore D, Renna G, Carratù MR. (2009) Late embryonic exposure to all-trans retinoic acid induces a pattern of motor deficits unrelated to the developmental stage. *Neurotoxicology* 30:1120–1126.

- Corcoran JP, So PL, Maden M. (2004) Disruption of the retinoid signalling pathway causes a deposition of amyloid  $\beta$  in the adult rat brain. *Eur J Neurosci.* 20(4):896-902.
- Czirók A, Schlett K, Madarász E, Vicsek T. (1998) Exponential Distribution of Locomotion Activity in Cell Cultures. *Physical Review Letters*, 81, 3038 – 3041.
- Dahl D, Strocchi P, Bignami A. (1982) Vimentin in the central nervous system. A study of the mesenchymal-type intermediate filament-protein in Wallerian degeneration and in postnatal rat development by two-dimensional gel electrophoresis. *Differentiation*, 22: 185-190.
- Dahl D, Björklund H, Bignami A. Immunological markers in astrocytes. In: Fedoroff S, Vernadakis A. Astrocytes: cell biology and pathology of astrocytes. *Academic Press, New York*, 1986:1-27.
- Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. (1991) Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry.* 148(11):1474-1486.
- De Luca LM, Darwiche N, Jones CS, Scita G. (1995) Retinoids in differentiation and neoplasia. *Sci Am Sci Med* 2: 28–37.
- De Luca LM, Kosa K, Andreola F. (1997) The role of vitamin A in differentiation and skin carcinogenesis. *J Nutr Biochem* 8: 426– 437.
- Delva L, Bastie JN, Rochette-Egly C, Kraiba R, Balitrand N, Despouy G, Chambon P, Chomienne C. (1999) Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7158– 7167.
- Denisenko-Nehrbass NI, Jarvis E, Scharff C, Nottebohm F, Mello CV. (2000) Site-specific retinoic acid production in the brain of adult songbirds. *Neuron.* 27(2):359-70.
- Desai TJ, Chen F, Lü J, Qian J, Niederreither K, Dollé P, Chambon P, Cardoso WV. (2006) Distinct roles for retinoic acid receptors alpha and beta in early lung morphogenesis. *Dev. Biol.* 291, 12–24 .
- Diez del Corral R, Olivera-Martinez I, Goriely A, Gale E, Maden M, Storey K. (2003) Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron* 40, 65–79.
- Diez del Corral R, Storey KG. (2004) Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *Bioessays* 26, 857–869.
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 17(13):5046-61.
- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1999a) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97: 703–716.
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1999b) Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(20):11619-24.
- Doetsch F. (2003) A niche for adult neural stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13: 543-550.
- Dong D, Ruuska S, Levinthal D, Noy N. (1999) Distinct roles for cellular retinoic acid binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J. Biol. Chem.* 274, 23695–23698.



- Drager UC. (2006) Retinoic acid signaling in the functioning brain, *Sci STKE*. 2006(324):pe10.
- Duester G. (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem*. 267(14):4315-24.
- Dupe V, Matt N, Garnier JM, Chambon P, Mark M, Ghyselinck NB. (2003) A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 14036–14041.
- Durston AJ, Timmermans JP, Hage WJ, Hendriks HF, de Vries NJ, Heideveld M, Nieuwkoop PD. (1989) Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* 340, 140–144.
- Durston AJ, van der Wees J, Pijnappel WWM, Godsave SF. (1998) Retinoids and related signals in early development of the vertebrate central nervous system. In: Pederson RA, Schatten GP, editors. Current topics in developmental biology. San Diego, CA: Academic Press. pp. 111–175.
- Eichele G. (1999) A vital role for vitamin A. *Nat Genet*. 21(4):346-7.
- Emoto Y, Wada H, Okamoto H, Kudo A, Imai Y. (2005) Retinoic acid-metabolizing enzyme Cyp26a1 is essential for determining territories of hindbrain and spinal cord in zebrafish. *Dev. Biol*. 278, 415–427.
- Enciu AM, Nicolescu MI, Manole CG, Mureşanu DF, Popescu LM, Popescu BO. (2011) Neuroregeneration in neurodegenerative disorders. *BMC Neurol*. 11:75.
- Enderlin V, Pallet V, Alfos S, Dargelos E, Jaffard R, Garcin H, Higuieret P. (1997) Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett*. 229(2):125-129.
- Eng LF. (1985) Glial fibrillary protein (GFAP): The major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunology*, 8: 203-214.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Vouimba RM, Pallet V, Jaffard R, Higuieret P. (2001) Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci*. 21(16):6423-6429.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Pallet V, Higuieret P, Jaffard R. (2003) Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav Brain Res*. 145(1-2):37-49.
- Evans HM. (1928) The effects of inadequate vitamin A on the sexual physiology of the female. *J. Biol. Chem*. 77, 651–654.
- Fe´art C, Mingaud F, Enderlin V, Husson M, Alfos S, Higuieret P, Pallet V. (2005) Differential effect of retinoic acid and triiodothyronine on the age-related hypo-expression of neurogranin in rat. *Neurobiol Aging*. 26(5):729-738.
- Flood F, Sundstrom E, Samuelsson EB, Wiehager B, Seiger A, Johnston JA, Cowburn RF. (2004) Presenilin expression during induced differentiation of the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Neurochem Int*. 44(7):487-496.
- Folli C, Calderone V, Otonello S, Bolchi A, Zanotti G, Stoppini M, Berni R. (2001) Identification, retinoid binding, and x-ray analysis of a human retinol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 3710– 3715.
- Folli C, Calderone V, Ramazzina I, Zanotti G, Berni R. (2002) Ligand binding and structural analysis of a human putative cellular retinolbinding protein. *J. Biol. Chem*. 277, 41970–41977.

- Fragoso YD, Shearer KD, Sementilli A, de Carvalho LV, McCaffery PJ. (2012) High expression of retinoic acid receptors and synthetic enzymes in the human hippocampus. *Brain Struct Funct.* 217(2):473-83.
- Frisén J, Johansson CB, Török C, Risling M, Lendahl U. (1995) Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol.* 131: 453-464.
- Fritz H, Kennedy D, Fergusson D, Fernandes R, Doucette S, Cooley K, Seely A, Sagar S, Wong R, Seely D. (2011) Vitamin a and retinoid derivatives for lung cancer: a systematic review and meta analysis. *PLoS One.* 6(6):e21107.
- Fuchs E, Segre JA. (2000) Stem cells: a new lease on life. *Cell.* 100(1):143-55.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G. (2004) Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116, 769–778.
- Fukii H, Sato T, Kaneko S, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y, Osawa K, Kato S, Hamada H. (1997) Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P-450 differentially expressed in developing mouse embryos. *EMBO J* 16: 4163–4173.
- Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T. (2003) Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci.* 23(28):9357-66. Erratum in: *J Neurosci.* 2004 Jan 7;24(1):24.
- Gage FH. (2002) Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci.* 22(3):612-3.
- Gammill LS, Bronner-Fraser M. (2003) Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci.* 4 (10):795-805.
- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV. (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci.* 7(11):1233-41.
- Genchi G, Wang W, Barua A, Bidlack WR, Olson JA. (1996) Formation of beta-glucuronides and of beta-galacturonides of various retinoids catalyzed by induced and noninduced microsomal UDP-glucuronosyltransferases of rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1289: 284–290.
- Ghyselinck NB, Båvik C, Sapin V, Mark M, Bonnier D, Hindelang C, Dierich A, Nilsson CB, Håkansson H, Sauvant P, Azaïs-Braesco V, Frasson M, Picaud S, Chambon P. (1999) Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J.* 18(18):4903-14.
- Giroud PA, Martinet M. (1955) Hypervitaminoses A et anomalies chez le fœtus de rat. *Rev Intern Vitaminol* 26:10–18.
- Goldman SA, Chen Z. Perivascular instruction of cell genesis and fate in the adult brain. (2011) *Nat Neurosci.* 14(11):1382-9.
- Golzio C, Martinovic-Bouriel J, Thomas S, Mougou-Zrelli S, Grattagliano-Bessieres B, Bonniere M, Delahaye S, Munnich A, Encha-Razavi F, Lyonnet S, Vekemans M, Attie-Bitach T, Etchevers HC. (2007) Matthew-Wood Syndrome Is Caused by Truncating Mutations in the Retinol-Binding Protein Receptor Gene STRA6. *Am J Hum Genet.* 80(6):1179-87.
- Goncalves MB, Agudo M, Connor S, McMahon S, Minger SL, Maden M, Corcoran JP. (2009) Sequential RARbeta and alpha signalling in vivo can induce adult forebrain neural progenitor cells to differentiate into neurons through Shh and FGF signalling pathways. *Developmental biology* 326:305-13.
- Goodman AB. (1998) Three independent lines of evidence suggest retinoids as causal to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(13):7240-7244.

- Goodman AB. (2006) Retinoid receptors, transporters, and metabolizers as therapeutic targets in late onset Alzheimer disease. *J Cell Physiol.* 209(3):598-603.
- Goodman GE, Alberts DS, Meyskens FL. (2008) Retinol, vitamins, and cancer prevention: 25 years of learning and relearning. *Clin Oncol.* 26(34):5495-6.
- Goodman T, Crandall JE, Nanesco SE, Quadro L, Shearer K, Ross A, McCaffery P. (2012) Patterning of retinoic acid signaling and cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus.* 22(11):2171-83.
- Gould E, Daniels DC, Cameron HA, McEwen BS. (1992) Expression of adrenal steroid receptors by newly born cells and pyknotic cells in the dentate gyrus of the postnatal rat. *Mol Cell Neurosci.* 3(1):44-8.
- Gould E, Cameron HA, McEwen BS. (1994) Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 340(4):551-65.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. (1999) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science.* 286(5439):548-52.
- Gottesman ME, Quadro L, Blaner WS. (2001) Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays.* 23(5):409-19.
- Götz M, Huttner WB. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:777-88.
- Gressens P, Richelme C, Kadhim HJ, Gadisseux JF, Evrard P. (1992) The germinative zone produces the most cortical astrocytes after neuronal migration in the developing mammalian brain. *Biol. Neonate,* 61: 4-24.
- Guan K, Chang H, Rolletschek A, Wobus AM. (2001) Embryonic stem cell-derived neurogenesis. Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells. *Cell Tissue Res.* 305, 171–176.
- Gudas LJ, Sporn MB, Roberts AB. (1994) Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: *The Retinoids*, edited by M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman. New York: Raven, 1994, chapt. 11, p. 443–520.
- Gudas LJ, Wagner JA. (2011) Retinoids regulate stem cell differentiation. *J Cell Physiol.* 226(2):322-30.
- Guo Y, Wei Q, Huang Y, Xia W, Zhou Y, Wang S. (2013) The effects of astrocytes on differentiation of neural stem cells are influenced by knock-down of the glutamate transporter, GLT-1. *Neurochem Int. pii: S0197-0186(13)00212-X.*
- Hachem S, Aguirre A, Vives V, Marks A, Gallo V, Legraverend C. (2005) Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage. *Glia,* 51:81-97.
- Hádinger N, Varga BV, Berzsenyi S, Környei Z, Madarász E, Herberth B. (2009) 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.
- Hajós F, Kálmán M. (1989) Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. II. Mesencephalon, rhombencephalon and spinal cord. *Exp Brain Res,* 78: 164–173.
- Hale F. (1933) Pigs born without eye balls. *J. Hered.* 24, 105–106.
- Hale F. (1935) The relation of vitamin A to anophthalmos in pigs. *Am. J. Ophthalmol.* 18, 1087–1093.
- Halilagic A, Ribes V, Ghyselinck NB, Zile MH, Dollé P, Studer M. (2007) Retinoids control anterior and dorsal properties in the developing forebrain. *Dev. Biol.* 303, 362–375.

- Harris SS, Navia JM. (1986) In vivo and in vitro study of the effects of vitamin A deficiency on rat third molar development. *J Dent Res.* 65(12):1445-8.
- Harrison PJ. (1999) The neuropathology of schizophrenia: a critical review of the data and their interpretation. *Brain.* 122:593-624.
- Haskell GT, LaMantia AS. (2005) Retinoic acid signaling identifies a distinct precursor population in the developing and adult forebrain. *J. Neurosci.* 25, 7636–7647.
- Hemmati-Brivanlou A, Melton DA. (1994) Inhibition of activin receptor signaling promotes neuralization in *Xenopus*. *Cell.* 77(2):273-81.
- Hernandez RE, Putzke AP, Myers JP, Margaretha L, Moens CB. (2007) Cyp26 enzymes generate the retinoic acid response pattern necessary for hindbrain development. *Development* 134, 177–187.
- Hochgreb T, Linhares VL, Menezes DC, Sampaio AC, Yan CY, Cardoso WV, Rosenthal N, Xavier-Neto J. (2003) A caudorostral wave of RALDH2 conveys anteroposterior information to the cardiac field. *Development* 130, 5363–5374.
- Hockfield S, McKay RD. (1985) Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci,* 5: 3310-3328.
- Hofmann C, Eichele G. (1994) Biology, chemistry, and medicine. In: The Retinoids, edited by M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman. New York: Raven, 1994, p. 387–441.
- Holland EC, Varmus HE. (1998) Basic fibroblast growth factor induces cell migration and proliferation after glia-specific gene transfer in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(3):1218-23.
- Holmin S, Almquist P, Lendahl U, Mathiesen T. (1997) Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury. *Eur J Neurosci,* 9: 65–75.
- Holson RR, Adams J, Ferguson SA, Scalzo FM. (2000) Retinoic acid exposure on gestational days 11 to 13 impairs swallowing in rat offspring. *Neurotoxicol Teratol* 22:541–545.
- Holson RR, Cogan JE, Adams J. (2001) Gestational retinoic acid exposure in the rat: effects of sex, strain and exposure period. *Neurotoxicol Teratol* 23:147–156.
- Huang XY, Shi GM, Devbhandari RP, Ke AW, Wang Y, Wang XY, Wang Z, Shi YH, Xiao YS, Ding ZB, Dai Z, Xu Y, Jia WP, Tang ZY, Fan J, Zhou J. (2012) Low level of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 predicts an unfavorable prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *PLoS One* 7:e32775.
- Husson M, Enderlin V, Alfos S, Boucheron C, Pallet V, Higuieret P. (2004) Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 123(1-2):7-17.
- Husson M, Enderlin V, Delacourte A, Ghenimi N, Alfos S, Pallet V, Higuieret P. (2006) Retinoic acid normalizes nuclear receptor mediated hypo-expression of proteins involved in  $\beta$ -amyloid deposits in the cerebral cortex of vitamin A deprived rats. *Neurobiol Dis.* 23(1):1-10.
- Husztai Z, Kálmán M. Glia. Akadémiai Kiadó, 2008 (ISBN: 978 963 05 8530 9)
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R. (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci.* 11(10):1153-61.

- Imdad A, Yakoob MY, Sudfeld C, Haider BA, Black RE, Bhutta ZA. (2011) Impact of vitamin A supplementation on infant and childhood mortality. *BMC Public Health*. 11 Suppl 3:S20.
- Iniguez MA, Morte B, Rodriguez-Pena A, Munoz A, Gerendasy D, Sutcliffe JG, Bernal J. (1994) Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (neurogranin). *Brain Res. Mol. Brain Res.* 27 (2), 205–214.
- Isken A, Golczak M, Oberhauser V, Hunzelmann S, Driever W, Imanishi Y, Palczewski K, von Lintig J. (2008) RBP4 Disrupts Vitamin A Uptake Homeostasis in a STRA6-Deficient Animal Model for Matthew-Wood Syndrome. *Cell Metab.* 7(3):258-68.
- Ito K, Morita T. (1995) Role of retinoic acid in mouse neural crest cell development in vitro. *Dev Dyn.* 204(2):211-218.
- Jacobs S, Lie DC, Decicco KL, Shi Y, Deluca LM, Gage FH, Evans RM. (2006) Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3902–3907.
- Janeczko K. (1993) Coexpression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and double immunocytochemical study. *Int J Dev Neurosci*, 11: 139-147.
- Jelítai M, Anderova M, Chvatal A, Madarász E. (2007). Electrophysiological characterization of neural stem/progenitor cells during in vitro differentiation: study with an immortalized neuroectodermal cell line. *J Neurosci Res* 85:1606-17.
- Jiang J, Toschke AM, von Kries R, Lin L. (2006) Vitamin A status among children in China. *Public Health Nutr.* 9, 955–960.
- Johnson AT, Klein ES, Gillett SJ, Wang L, Song TK, Pino ME, Chandraratna RA. (1995) Synthesis and characterization of a highly potent and effective antagonist of retinoic acid receptors. *J Med Chem* 38(24):4764-7.
- Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D. (2002) Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum.* 46(12):3349-60.
- Kageyama R, Nakanishi S. (1997) Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Genet Dev.* 7(5):659-65.
- Kálmán M, Hajós F. (1989) Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain I Forebrain. *Exp Brain Res*, 78: 147-163.
- Kalter H, Warkany J. (1961) Experimental production of congenital malformations in strains of inbred mice by maternal treatment with hypervitaminosis A. *Am J Pathol* 38:1–21.
- Kaplan MS, Hinds JW. (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science.* 197(4308):1092-4.
- Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H. (2007) A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science.* 315(5813):820-5.
- Kawaguchi R, Yu J, Wiita P, Ter-Stepanian M, Sun H. (2008) Mapping the membrane topology and extracellular ligand binding domains of the retinol binding protein receptor. *Biochemistry.* 47(19):5387-95.

- Kawakami Y, Raya A, Raya RM, Rodríguez-Esteban C, Belmonte JC. (2005) Retinoic acid signalling links left–right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo. *Nature* 435, 165–171.
- Kawamura K, Hara K, Fujiwara S. (1993) Developmental role of endogenous retinoids in the determination of morphallactic field in budding tunicates. *Development* 117, 835-845.
- Keegan BR, Feldman JL, Begemann G, Ingham PW, Yelon D. (2005) Retinoic acid signaling restricts the cardiac progenitor pool. *Science* 307, 247–249.
- Kettenmann H, Verkhratsky A. (2011) Neuroglia - living nerve glue. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 79(10):588-97.
- Kim M, Habiba A, Doherty JM, Mills JC, Mercer RW, Huettner JE. (2009) Regulation of mouse embryonic stem cell neural differentiation by retinoic acid. *Developmental biology* 328:456-71.
- Kojima R, Fujimori T, Kiyota N, Toriya Y, Fukuda T, Ohashi T, Sato T, Yoshizawa Y, Takeyama K, Mano H. (1994) In vivo isomerization of retinoic acids. Rapid isomer exchange and gene expression. *J Biol Chem* 269: 32700–32707.
- Komatsu Y, Watakabe A, Hashikawa T, Tochitani S, Yamamori T. (2005) Retinolbinding protein gene is highly expressed in higher-order association areas of the primate neocortex. *Cereb Cortex* 15:96-108.
- König G, Masters CL, Beyreuther K. (1990) Retinoic acid induced differentiated neuroblastoma cells show increased expression of the  $\beta$ A4 amyloid gene of Alzheimer's disease and an altered splicing pattern. *FEBS Lett.* 269(2):305-310.
- Kornack DR, Rakic P. (1999) Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(10):5768-73.
- Kornack DR, Rakic P. (2001) The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(8):4752-7.
- Környei Z, Szilávik V, Szabó B, Gócza E, Czirók A, Madarász E. (2005) Humoral and contact interactions in astroglia/stem cell co-cultures in the course of glia-induced neurogenesis. *Glia.* 49(3):430-44.
- Környei Z, Gócza E, Rühl R, Orsolits B, Vörös E, Szabó B, Vágovits B, Madarász E. (2007) Astroglia-derived retinoic acid is a key factor in glia-induced neurogenesis. *FASEB J.* (10):2496-509.
- Kraft JC, Schuh T, Juchau M, Kimelman D. (1994) The retinoid X receptor ligand, 9-cis-retinoic acid, is a potential regulator of early *Xenopus* development. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3067– 3071.
- Krezel W, Ghyselinck N, Samad TA, Dupé V, Kastner P, Borrelli E, Chambon P. (1998) Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science.* 279 (5352):863-867.
- Krezel W, Kastner P, Chambon P. (1999) Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience.* 89(4):1291-1300.
- Kriegstein AR, Götz M. (2003) Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia.* 43(1):37-43.
- Kumar S, Sandell LL, Trainor PA, Koentgen F, Duester G. (2012) Alcohol and aldehyde dehydrogenases: retinoid metabolic effects in mouse knockout models. *Biochim Biophys Acta.* 1821(1):198-205.
- Kurokawa R, DiRenzo J, Boehm M, Sugarman J, Gloss B, Rosenfeld M, Heyman RA, Glass CK. (1994) Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature* 371, 528–531.

- Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW Jr, Lott IT, Richard JM, Sun SC. (1985) Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* 313:837–841.
- Lammer EJ, Schunior A, Hayes AM, Holmes LB. (1988) Isotretinoin dose and teratogenicity. *Lancet* 2:503–504.
- Lane MA, Bailey SJ. (2005) Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog Neurobiol.* 75(4):275-93.
- Langton S, Gudas LJ. (2008) CYP26A1 knockout embryonic stem cells exhibit reduced differentiation and growth arrest in response to retinoic acid. *Developmental biology* 315:331-54.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60: 585-595.
- Levison SW, Goldman JE. (1993) Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron*, 10: 201-212.
- Levison SW, Goldman JE. (1997) Multipotential and lineage restricted precursors coexist in the mammalian perinatal subventricular zone. *J Neurosci Res.* 48(2):83-94.
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Désiré L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, GageFH. (2005) Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature.* 437(7063):1370-5.
- Lin M, Zhang M, Abraham M, Smith SM, Napoli JL. (2003) Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *J Biol Chem.* 278(11):9856-61.
- Linser PJ. (1985) Multiple marker analysis in the avian optic tectum reveals three classes of neuroglia and carbonic anhydrase-containing neurons. *J Neurosci*, 5:2388-2396.
- Ludwin SK, Kosek JC, Eng LF. (1976) The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain. An immunocytochemical study using horseradish peroxidase labeled antibodies. *J Comp Neurol*, 165:197-208.
- Luo T, Wagner E, Grun F, Drager UC. (2004) 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, 297–316
- Ma DK, Ming GL, Song H. (2005) Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 15(5):514-20
- Macapinlac MP, Olson JA. (1981) A lethal hypervitaminosis A syndrome in young monkeys (*Macacus fascicularis*) following a single intramuscular dose of a water-miscible preparation containing vitamins A, D2 and E. *Int J Vitam Nutr Res.* 51(4):331-41.
- Maden M, Gale E, Zile M. (1999) Hindbrain respecification in the retinoid-deficient quail. *Mech Dev* 89:43–54.
- Maden M. (2002) Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nature Rev. Neurosci.* 3, 843–853.
- Maden M. (2006) Retinoids and spinal cord development. *J. Neurobiol.* 66, 726–738.
- Maden M. (2007) Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nature Rev. Neurosci.* 8, 755–765.

- Mangelsdorf DJ, Umesono K, Kliewer SA, Borgmeyer U, Ong ES, Evans RM. (1991) A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* 66, 555–561.
- Maret S, Franken P, Dauvilliers Y, Ghyselinck NB, Chambon P, Tafti M. (2005) Retinoic acid signaling affects cortical synchrony during sleep. *Science* 310, 111–113.
- Marín-Padilla M. (1995) Prenatal development of fibrous (white matter), protoplasmic (gray matter), and layer I astrocytes in the human cerebral cortex: a Golgi study. *J Comp Neurol.* 357(4):554-72.
- Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. (2006) Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 46:451-480.
- Markó K, Ligeti M, Mezo G, Mihala N, Kutnyánszky E, Kiss E, Hudecz F, Madarász E. (2008) A novel synthetic peptide polymer with cyclic RGD motifs supports serum-free attachment of anchorage-dependent cells. *Bioconjug Chem.* 19(9):1757-66.
- Markó K, Kohidi T, Hádinger N, Jelitai M, Mezo G, Madarász E. (2011) Isolation of radial glia-like neural stem cells from fetal and adult mouse forebrain via selective adhesion to a novel adhesive peptide-conjugate. *PLoS One.* 6(12):e28538.
- Marqueling AL, Zane LT. (2007) Depression and suicidal behavior in acne patients treated with isotretinoin: a systematic review. *Semin Cutan Med Surg.* 26(4):210-20.
- Marshall H, Morrison A, Studer M, Pöpperl H, Krumlauf R. (1996) Retinoids and Hox genes. *FASEB J* 10:969–978.
- Martin M, Gallego-Llamas J, Ribes V, Keding M, Niederreither K, Chambon P, Dollé P, Gradwohl G. (2005) Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient *Raldh2* mutant mice. *Dev. Biol.* 284, 399–411.
- Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. (1977) Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*, 195:1356-1358.
- Matsuura T, Ross AC. (1993) Regulation of hepatic lecithin: retinol acyltransferase activity by retinoic acid. *Arch Biochem Biophys.* 301(2):221-7.
- Matsuura T, Gad MZ, Harrison EH, Ross AC. (1997) Lecithin:retinol acyltransferase and retinyl ester hydrolase activities are differentially regulated by retinoids and have distinct distributions between hepatocyte and nonparenchymal cell fractions of rat liver. *J Nutr.* 127(2):218-24.
- Matt N, Dupé V, Garnier JM, Dennefeld C, Chambon P, Mark M, Ghyselinck NB. (2005) Retinoic acid-dependent eye morphogenesis is orchestrated by neural crest cells. *Development* 132, 4789–4800.
- Maynard TM, Sikich L, Lieberman JA, LaMantia AS. (2001) Neural development, cell-cell signaling, and the "two-hit" hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 27(3):457-76.
- McCaffery P, Drager UC. (2000) Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:233-49.
- McCaffery P, Koul O, Smith D, Napoli JL, Chen N, Ullman MD. (2004) Ethanol increases retinoic acid production in astrocytes and in cerebellum. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 153, 233–241.
- McCaffery P, Zhang J, Crandall JE. (2006) Retinoic acid signaling and function in the adult hippocampus. *J. Neurobiol.* 66, 780–791.



- McCarthy RA, Argraves WS. (2003) Megalin and the neurodevelopmental biology of sonic hedgehog and retinol. *Journal of cell science* 116:955-60.
- Mey J, McCaffery P. (2004) Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates. *Neuroscientist*. (5):409-21.
- Mic FA, Molotkov A, Molotkova N, Duester G. (2004) Raldh2 expression in optic vesicle generates a retinoic acid signal needed for invagination of retina during optic cup formation. *Dev. Dyn.* 231, 270–277.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC. (1997) Liver regeneration. *Science*. 276(5309):60-6.
- Ming GL, Song H. (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 28:223-50.
- Minucci S, Leid M, Toyama R, Saint-Jeannet JP, Peterson VJ, Horn V, Ishmael JE, Bhattacharyya N, Dey A, Dawid IB, Ozato K. (1997) Retinoid X receptor (RXR) within the RXR-retinoic acid receptor heterodimer binds to its ligand and enhances retinoid-dependent gene activation. *Mol. Cell. Biol.* 17, 644–655.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (2008) Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*. 3(3):265-78.
- Misner DL, Jacobs S, Shimizu Y, de Urquiza AM, Solomin L, Perlmann T, De Luca LM, Stevens CF, Evans RM. (2001) Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal longterm synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(20):11714-11719.
- Molotkov A, Molotkova N, Duester G. (2006) Retinoic acid guides eye morphogenetic movements via paracrine signaling but is unnecessary for retinal dorsoventral patterning. *Development* 133, 1901–1910.
- Monje ML, Toda H, Palmer TD. (2003) Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*. 302(5651):1760-5.
- Mora JR. (2008) Homing imprinting and immunomodulation in the gut: role of dendritic cells and retinoids. *Inflamm Bowel Dis*. 14(2):275-89.
- Morrens J, Van Den Broeck W, Kempermann G. (2012) Glial cells in adult neurogenesis. *Glia*. 60(2):159-74.
- Mossman T. (1983) Principle of the MTT assay. *J. Immunol Methods*. 65: 55-63.
- Mucida D, Park Y, Cheroutre H. (2009) From the diet to the nucleus: vitamin A and TGF-beta join efforts at the mucosal interface of the intestine. *Semin Immunol*. 21(1):14-21.
- Nagy A, Gerstensten M, Vintersten K, Behringer R. (2003) Manipulating the mouse embryo. Cold Spring Harbor Press, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nagy NE, Holven KB, Roos N, Senoo H, Kojima N, Norum KR, Blomhoff R. (1997) Storage of vitamin A in extrahepatic stellate cells in normal rats. *J Lipid Res*. 38(4):645-58.
- Nakayama T, Momoki-Soga T, Inoue N. (2003) Astrocyte-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons. *Neurosci Res*. 46(2):241-9.
- Napoli JL. (1996a). Biochemical Pathways of Retinoid Transport, Metabolism, and Signal Transduction. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 80, S52–S62
- Napoli JL. (1996b). Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J*. 10(9):993-1001.
- Nau H. (2001) Teratogenicity of isotretinoin revisited: species variation and the role of all-trans-retinoic acid. *J Am Acad Dermatol* 45:S183–S187.

- Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N, Schuhbauer B, Chambon P, Dollé P. (2001) Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development* 128, 1019–1031.
- Niederreither K, Vermot J, Le Roux I, Schuhbauer B, Chambon P, Dollé P. (2003) The regional pattern of retinoic acid synthesis by RALDH2 is essential for the development of posterior pharyngeal arches and the enteric nervous system. *Development* 130, 2525–2534.
- Niederreither K, Dollé P. (2008) Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet.* 9(7):541-53.
- Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. (1998) Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes and Development* 12 2048–2060.
- Nolen GA. (1969) Variations in teratogenic response to hypervitaminosis A in three strains of the albino rat. *Food Cosmet Toxicol* 7:209–214.
- Norenberg MD. (1979) The distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J Histochem Cytochem*, 27:756-762.
- Norenberg MD. (1983) Immunohistochemistry of glutamine synthetase. In: Glutamine, Glutamate and GABA. Eds: Hertz L, Kvamme E, McGeer EG, Schousboe A, Alan L. Riss, New York, pp: 95-111.
- Nottebohm F. (2004) The road we travelled: discovery, choreography, and significance of brain replaceable neurons. *Ann N Y Acad Sci.* 1016:628-58.
- O'Reilly KC, Shumake J, Gonzalez-Lima F, Lane MA, Bailey SJ. (2006) Chronic administration of 13-cis-retinoic acid increases depression-related behavior in mice. *Neuropsychopharmacology.* 31(9):1919-1927.
- Olivera-Martinez I, Storey KG. (2007) Wnt signals provide a timing mechanism for the FGF-retinoid differentiation switch during vertebrate body axis extension. *Development* 134, 2125–2135.
- Olson CR, Mello CV. (2010) Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning. *Mol Nutr Food Res.* 54(4):489-95.
- Olson JA. Vitamin A, retinoids and carotenoids. In: Shils ME, Olson JA, Shike M. editors. Modern nutrition in the health and disease. Volume 1. Philadelphia: Lea & Febiger; 1994, p. 287–307.
- Ong DE, Kakkad B, MacDonald PN. (1987) Acyl-CoA-independent esterification of retinol bound to cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine. *J Biol Chem.* 262(6):2729-36.
- Ong DE, Newcomer ME, Chytil F. (1994) Cellular retinoid-binding proteins. In: Sporn, A.B.R.M.B., Goodman, D.S. (Eds.), The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine. Raven Press, New York, pp. 283– 318.
- Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. (2004) Vitamin A exhibits potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects in vitro. *Exp Neurol.* 189(2):380-392.
- Oudega M, Marani E. (1991) Expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in the developing rat spinal cord: an immunocytochemical study of the spinal cord glial system. *J Anat.* 179:97-114.
- Pasutto F, Sticht H, Hammersen G, Gillissen-Kaesbach G, Fitzpatrick DR, Nurnberg G, Brasch F, Schirmer-Zimmermann H, Tolmie JL, Chitayat D, Houge G, Fernandez-Martinez L, Keating S, Mortier G, Hennekam RC, von der Wense A, Slavotinek A, Meinecke P, Bitoun P, Becker C, Nurnberg P, Reis A, Rauch A. (2007) Mutations

- in STRA6 Cause a Broad Spectrum of Malformations Including Anophthalmia, Congenital Heart Defects, Diaphragmatic Hernia, Alveolar Capillary Dysplasia, Lung Hypoplasia, and Mental Retardation. *Am J Hum Genet.* 80(3):550-60.
- Palha JA, Goodman AB. (2006) Thyroid hormones and retinoids: a possible link between genes and environment in schizophrenia. *Brain Res Rev.* 51(1):61-71.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol.* 425(4):479-94.
- Patel AJ, Weir MD, Hunt A, Tahourdin CSM, Thomas DGT. (1985) Distribution of glutamine synthetase and glial fibrillary acidic protein and correlation with glutamate decarboxylase in different regions of the rat central nervous system. *Brain Res,* 331:1-10.
- Pepe IM, Cugnoli C, Peluso M, Vergani L, Boero A. (1987) Structure of a protein catalyzing the formation of 11-cis retinal in the visual cycle of invertebrate eyes. *Cell Biophysics* 10, 15-22.
- Pera MF, Tam PP. (2010) Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature* 465 713–720.
- Pesce M, Anastassiadis K, Schöler HR. (1999) Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs.* 165(3-4):144-52.
- Piedrafita FJ, Pfahl M. (1999) Nuclear retinoid receptors and mechanisms of action. In: Blaner, WS. (Ed.), *Retinoids: The Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action.* Springer, Berlin, pp. 153–184.
- Platel JC, Dave KA, Bordey A. (2008) Control of neuroblast production and migration by converging GABA and glutamate signals in the postnatal forebrain. *J Physiol.* 586(16):3739-43.
- Prelle K, Vassiliev IM, Vassilieva SG, Wolf E, Wobus AM. (1999) Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species--present status and future prospects. *Cells Tissues Organs.* 165(3-4):220-36.
- Qi JS, Desai-Yajnik V, Greene ME, Raaka BM, Samuels HH. (1995) The ligand-binding domains of the thyroid hormone/retinoid receptor gene subfamily function in vivo to mediate heterodimerization, gene silencing, and transactivation. *Mol Cell Biol.* 15(3):1817-25.
- Quadro L, Hamberger L, Gottesman ME, Wang F, Colantuoni V, Blaner WS, Mendelsohn CL. (2005) Pathways of vitamin A delivery to the embryo: insights from a new tunable model of embryonic vitamin A deficiency. *Endocrinology.* 146(10):4479-90.
- Raff MC, Miller RH, Noble M. (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature,* 303: 390-396.
- Raff MC, Miller RH. (1984) Glial cell development in the rat optic nerve. *Trends Neurosci,* 13: 469-472.
- Rakic P. (1971) Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res.* 33(2):471-6.
- Rakic P. (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol.* 145(1):61-83.
- Randolph RK, Ross AC. (1991a) Vitamin A status regulates hepatic lecithin: retinol acyltransferase activity in rats. *J Biol Chem.* 266(25):16453-7.

- Randolph RK, Winkler KE, Ross AC. (1991b) Fatty acyl CoA-dependent and -independent retinol esterification by rat liver and lactating mammary gland microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 288(2):500-8.
- Rao MS, Mayer-Proschel M. (1997) Glial-restricted precursors are derived from multipotent neuroepithelial stem cells. *Dev Biol.* 188(1):48-63.
- Rao MS. (1999) Multipotent and restricted precursors in the central nervous system. *Anat Rec* 257: 137-148.
- Ray WJ, Bain G, Yao M, Gottlieb DI. (1997) CYP26, a novel mammalian cytochrome P-450, is induced by retinoic acid and defines a new family. *J Biol Chem* 272: 18702–18708.
- Reynolds BA, Weiss S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 255(5052):1707-10.
- Ribes V, Wang Z, Dollé P, Niederreither K. (2006) Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-mediated retinoic acid synthesis regulates early mouse embryonic forebrain development by controlling FGF and sonic hedgehog signaling. *Development* 133, 351–361.
- Richard S, Zingg HH. (1991) Identification of a retinoic acid response element in the human oxytocin promoter. *J. Biol. Chem.* 266 (32), 21428–21433.
- Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A, Catani M, Cecchetti R, Senin U, Mecocci P. (2003) Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 24(7):915-919.
- Rodahl K, Moore T. (1943) The vitamin A content and toxicity of bear and seal liver. *Biochem J.* 37(2):166-8.
- Rohlmann A, Laskawi R, Hofer A, Dobo E, Dermietzel R, Wolff JR. (1993) Facial nerve lesions lead to increased immunostaining of the astrocytic gap junction protein (connexin 43) in the corresponding facial nucleus of rats. *Neurosci Lett,* 154: 206-208.
- Romand R, Dollé P, Hashino E. (2006) Retinoid signaling in inner ear development. *J. Neurobiol.* 66, 687–704.
- Ross AC. (1982) Retinol esterification by rat liver microsomes. Evidence for a fatty acyl coenzyme A: retinol acyltransferase. *J Biol Chem.* 257(5):2453-9.
- Ross AC. (2003) Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic Acid oxidation. *J Nutr.* 133(1):291S-296S.
- Ross AC, Zolfaghari R. (2004) Regulation of hepatic retinol metabolism: perspectives from studies on vitamin A status. *J Nutr.* 134(1):269S-275S.
- Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM. (2000) Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev.* 80(3):1021-54.
- Ross SE, Greenberg ME, Stiles CD. (2003) Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron.* 39(1):13-25.
- Rossant J, Zirngibl R, Cado D, Shago M, Giguere V. (1991) Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev* 5:1333–1344.
- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW. (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron,* 13: 713-725.

- Ruberte E, Friederich V, Chambon P, Morriss-Kay G. (1993) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins, III: their differential transcript distribution during mouse nervous system development. *Development*. 118(1):267-282.
- Ruiz A, Winston A, Lim YH, Gilbert BA, Rando RR, Bok D. (1999) Molecular and biochemical characterization of lecithin retinol acyltransferase. *J Biol Chem*. 274(6):3834-41.
- Rühl R. (2006) Method to determine 4-oxo-retinoic acids, retinoic acids and retinol in serum and cell extracts by liquid chromatography/diode-array detection atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 20(16):2497-504.
- Ryckebusch L, Wang Z, Bertrand N, Lin SC, Chi X, Schwartz R, Zaffran S, Niederreither K. (2008) Retinoic acid deficiency alters second heart field formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 2913–2918.
- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. (2007) Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 131(2):324-36.
- Sakai Y, Meno C, Fujii H, Nishino J, Shiratori H, Saijoh Y, Rossant J, Hamada H. (2001) The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev*. 15, 213–225.
- Samad TA, Krezel W, Chambon P, Borrelli E. (1997) Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoic acid receptor-retinoid X receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(26):14349-14354.
- Sant'Anna LB, Tosello DO. (2006) Fetal alcohol syndrome and developing craniofacial and dental structures-a review. *Orthod Craniofac Res*. 9(4):172-85.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 301(5634):805-9.
- Sauer ME, Walker BE. (1959) Radioautographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube. *Proc Soc Exp Biol Med*. 101(3):557-60.
- Schlett K, Madarász E. (1997) Retinoic acid induced neural differentiation in a neuroectodermal cell line immortalized by p53 deficiency. *J Neurosci Res*. 47(4):405-15.
- Schlett K, Herberth B, Madarász E. (1997) In vitro pattern formation during neurogenesis in neuroectodermal progenitor cells immortalized by p53-deficiency. *Int J Dev Neurosci*. 15(6):795-804.
- Schlett K, Czirók A, Tárnok K, Vicsek T, Madarász E. (2000) Dynamics of cell aggregation during in vitro neurogenesis by immortalized neuroectodermal progenitors. *J Neurosci Res*. 60(2):184-94.
- Schneider RA, Hu D, Rubenstein JL, Maden M, Helms JA. (2001) Local retinoid signaling coordinates forebrain and facial morphogenesis by maintaining FGF8 and SHH. *Development* 128, 2755–2767.
- Schnitzer J, Franke WW, Schachner M. (1981) Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol*. 90(2):435-47.

- Schwarz SC, Schwarz J. (2011) Translation of stem cell therapy for neurological diseases. *Transl Res.* 156(3):155-60.
- Seale P, Asakura A, Rudnicki MA. (2001) The potential of muscle stem cells. *Dev Cell.* 1(3):333-42.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*, 21: 7153-7160.
- Seri B, García-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 478(4):359-78. Erratum in: *J Comp Neurol.* 2004 Dec 20;480(4):427.
- Sharif O, Hu H, Klock H, Hampton EN, Nigoghossian E, Knuth MW, Matzen J, Anderson P, Trager R, Uno T, Glynne RJ, Azarian SM, Caldwell JS, Brinker A. (2009) Time-resolved fluorescence resonance energy transfer and surface plasmon resonance-based assays for retinoid and transthyretin binding to retinol-binding protein 4. *Anal Biochem.* 392(2):162-8.
- Shearer KD, Fragoso YD, Clagett-Dame M, McCaffery PJ. (2012) Astrocytes as a regulated source of retinoic acid for the brain. *Glia.* 60(12):1964-76.
- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S. (2008) Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell.* 3(3):289-300.
- Shenai JP, Chytil F. (1990) Vitamin A storage in lungs during perinatal development in the rat. *Biol Neonate.* 57(2):126-32.
- Shimada T, Ross AC, Muccio DD, Brouilleyte WJ, Shealy YF. (1997) Regulation of hepatic lecithin:retinol acyltransferase activity by retinoic acid receptor-selective retinoids. *Arch Biochem Biophys.* 344(1):220-7.
- Shimeld SM. (1996) Retinoic acid, HOX genes and the anteriorposterior axis in chordates. *Bioessays* 18, 613-616.
- Shirley MA, Bennani YL, Boehm MF, Breau AP, Pathirana C, Ulm EH. (1996) Oxidative and reductive metabolism of 9-cis-retinoic acid in the rat. Identification of 13,14-dihydro-9- cis-retinoic acid and its taurine conjugate. *Drug Metab Dispos* 24: 293-302.
- 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. (2009) Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation. *Cell.* 139(3):597-609.
- Simeone A, Avantaggiato V, Moroni MC, Mavilio F, Arra C, Cotelli F, Nigro V, Acampora D. (1995) Retinoic acid induces stage-specific antero-posterior transformation of rostral central nervous system. *Mech. Dev.* 51, 83-98.
- Sirbu IO, Gresh L, Barra J, Duester G. (2005) Shifting boundaries of retinoic acid activity control hindbrain segmental gene expression. *Development* 132, 2611-2622.
- Sirbu IO, Duester G. (2006) Retinoic-acid signalling in node ectoderm and posterior neural plate directs left-right patterning of somitic mesoderm. *Nature Cell Biol.* 8, 271-277.
- Snippert HJ, van der Flier LG, Sato T, van Es JH, van den Born M, Kroon-Veenboer C, Barker N, Klein AM, van Rheenen J, Simons BD, Clevers H. (2010) Intestinal

- crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* 143 134–144.
- Sockanathan S, Jessell TM. (1998) Motor neuron-derived retinoid signaling specifies the subtype identity of spinal motor neurons. *Cell* 94:503-14.
- Song H, Stevens CF, Gage FH. (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*. 417(6884):39-44.
- Sonneveld E, van den Brink CE, van der Leede BJ, Maden M, van der Saag PT. (1999) Embryonal carcinoma cell lines stably transfected with mRARbeta2-lacZ: sensitive system for measuring levels of active retinoids. *Exp Cell Res*. 250(2):284-97.
- Sporn MB, Newton DL. (1979) Chemoprevention of cancer with retinoids. *Fed Proc* 38:2528-2534.
- Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. (2001) Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98–104.
- Stagaard M, Møllgård K. (1989) The developing neuroepithelium in human embryonic and fetal brain studied with vimentin-immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)*. 180(1):17-28.
- Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. (2004) Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia*. 46(1):41-52.
- Steiner B, Klempin F, Wang L, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G. (2006) Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia*. 54(8):805-14.
- Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH. (2007) In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*. 1(5):515-28.
- Tafti M, Ghyselinck NB. (2007) Functional implication of the vitamin A signaling pathway in the brain. *Arch Neurol* 64:1706–1711.
- Takahashi K, Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126(4):663-76.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861-72.
- Tang X, Zhou L, Wagner AM, Marchetto MC, Muotri AR, Gage FH, Chen G. (2013) Astroglial cells regulate the developmental timeline of human neurons differentiated from induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*. 11(2):743-57.
- Tárnok K, Pataki A, Kovács J, Schlett K, Madarász E. (2002) Stage-dependent effects of cell-to-cell connections on in vitro induced neurogenesis. *Eur J Cell Biol*. 81(7):403-12.
- Taupin P. (2006) Adult neurogenesis in mammals. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 8, 345–351.
- Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F. (2008) A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*. 3(3):279-88.
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. (2000) Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*. 102(4):451-61.
- Tsutsumi C, Okuno M, Tannous L, Piantedosi R, Allan M, Goodman DS, Blaner WS. (1992) Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 267, 1805–1810



- Uehara M, Yashiro K, Mamiya S, Nishino J, Chambon P, Dolle P, Sakai Y. (2007) CYP26A1 and CYP26C1 cooperatively regulate anterior–posterior patterning of the developing brain and the production of migratory cranial neural crest cells in the mouse. *Dev. Biol.* 302, 399–411.
- Underwood BA, Arthur P. (1996) The contribution of vitamin A to public health. *FASEB J.* 10, 1040–1048.
- Valdenaire O, Maus-Moatti M, Vincent JD, Mallet J, Vernier P. (1998) Retinoic acid regulates the developmental expression of dopamine D2 receptor in rat striatal primary cultures. *J. Neurochem.* 71 (3), 929–936.
- van der Loo B, Labugger R, Aebischer CP, Bachschmid M, Spitzer V, Kilo J, Altwegg L, Ullrich V, Lüscher TF. (2004) Age-related changes of vitamin A status. *J Cardiovasc Pharmacol.* 43(1):26-30.
- van Neerven S, Kampmann E, Mey J. (2008) RAR/RXR and PPAR/RXR signaling in neurological and psychiatric diseases. *Prog Neurobiol.* 85(4):433-51.
- Vermot J, Gallego Llamas J, Fraulob V, Niederreither K, Chambon P, Dollé P. (2005a) Retinoic acid controls the bilateral symmetry of somite formation in the mouse embryo. *Science* 308, 563–566.
- Vermot J, Pourqu   O. (2005b) Retinoic acid coordinates somitogenesis and left–right patterning in vertebrate embryos. *Nature* 435, 215–220.
- Viebahn C, Lane EB, Ramaekers FC. (1995) Cytoskeleton gradients in three dimensions during neurulation in the rabbit. *J Comp Neurol.* 363(2):235-48.
- Vogel S, Gamble MV, Blaner WS. (1999a) Retinoid uptake, metabolism and transport, in: H. Nau, W.S. Blaner (Eds.), *The Handbook of Experimental Pharmacology, The Retinoids*, Springer Verlag, Heidelberg, 1999, pp. 31–96.
- Vogel S, Gamble MV, Blaner WS. (1999b) Biosynthesis, absorption, metabolism and transport of retinoids. In: Blaner WS. (Ed.), *Retinoid: The Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action*. Springer, Berlin, pp. 31–96.
- Vogel S, Mendelsohn CL, Mertz JR, Piantedosi R, Waldburger C, Gottesman ME, Blaner WS. (2001) Characterization of a new member of the fatty acid binding protein family that binds all-trans-retinol. *J. Biol. Chem.* 276, 1353–1360.
- Vorhees CV. (1974) Some behavioral effects of maternal hypervitaminosis A in rats. *Teratology* 10:269–274.
- Vorhees CV, Brunner RL, McDaniel CR, Butcher RE. (1978) The relationship of gestational age to vitamin A induced postnatal dysfunction. *Teratology* 17:271–276.
- Vorhees CV, Brunner RL, Butcher RE. (1979) Psychotropic drugs as behavioral teratogens. *Science* 205:1220–1225.
- Wagner E, McCaffery P, Dr  ger UC. (2000) Retinoic acid in the formation of the dorsoventral retina and its central projections. *Dev. Biol.* 222, 460–470.
- Wagner E, Luo T, Dr  ger UC. (2002) Retinoic acid synthesis in the postnatal mouse brain marks distinct developmental stages and functional systems. *Cereb Cortex.* (12):1244-53.
- Wagner E, Luo T, Sakai Y, Parada LF, Dr  ger UC. (2006) Retinoic acid delineates the topography of neuronal plasticity in postnatal cerebral cortex. *Eur J Neurosci.* (2):329-40.
- Wang HF, Liu FC. (2005) Regulation of multiple dopamine signal transduction molecules by retinoids in the developing striatum. *Neuroscience.* 134(1):97-105.



- Wang TW, Zhang H, Parent JM. (2005) Retinoic acid regulates postnatal neurogenesis in the murine subventricular zone-olfactory bulb pathway. *Development* 132:2721-32.
- Wang Z, Dollé P, Cardoso WV, Niederreither K. (2006) Retinoic acid regulates morphogenesis and patterning of posterior foregut derivatives. *Dev. Biol.* 297, 433–445.
- Warkany J, Schraffenberger E. (1946) Congenital malformations induced in rats by maternal vitamin A deficiency. I. Defects of the eye. *Arch. Ophthalmol.* 35, 150–169.
- Wei LN. (2003) Retinoid receptors and their coregulators. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 47–72.
- Weinstein DC, Hemmati-Brivanlou A. (1999) Neural induction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 411–433.
- White JA, Guo YD, Baetz K, Beckett-Jones B, Bonasoro J, Hsu KE, Dilworth FJ, Jones G, Petkovich M. (1996) Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase. *J Biol Chem* 271: 29922–29927.
- White RJ, Nie Q, Lander AD, Schilling TF. (2007) Complex regulation of cyp26a1 creates a robust retinoic acid gradient in the zebrafish embryo. *PLoS Biol.* 5, e304.
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336 684–687.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385 810–813.
- Wilson JG, Roth CB, Warkany J. (1953) An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am. J. Anat.* 92, 189–217.
- Wobus A, Boheler K. (2005) Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiol Rev* 85: 635-678.
- Wolbach SB, Howe PR. (1925) Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. *J. Exp. Med.* 42, 753–777.
- Wysowski DK, Beitz J. (2001) Methodological limitations of the study “Isotretinoin Use and Risk of Depression, Psychotic Symptoms, Suicide, and Attempted Suicide.” *Arch Dermatol.* 137 (8):1102-1103.
- Yamamoto M, Drager UC, Ong DE, McCaffery PJ. (1998) Retinoid binding proteins in the cerebellum and choroid plexus and their relationship to regionalized retinoic acid synthesis. *Eur. J. Biochem.* 257, 344–350.
- Yang HY, Lieska N, Shao D, Kriho V, Pappas GD. (1993) Immunotyping of radial glia and their glial derivatives during development of the rat spinal cord. *J Neurocytol.* 22(7):558-71.
- Yost RW, Harrison EH, Ross AC. (1988) Esterification by rat liver microsomes of retinol bound to cellular retinol-binding protein. *J Biol Chem.* 263(35):18693-701
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 318(5858):1917-20.
- Zelenika D, Grima B, Brenner M, Pessac B. (1995) A novel glial fibrillary acidic protein mRNA lacking exon 1. *Mol Brain Res,* 30: 251-258.

- Zerlin M, Levison SW, Goldman JE. (1995) Early patterns of migration, morphogenesis, and intermediate filament expression of subventricular zone cells in the postnatal rat forebrain. *J Neurosci*, 15: 7238–7249.
- Zetterstrom RH, Lindqvist E, Mata de Urquiza A, Tomac A, Eriksson U, Perlmann T, Olson L. (1999) Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur. J. Neurosci*. 11 (2), 407–416.
- Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM. (2003) Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(13):7925-30.
- Zheng WL, Bucco RA, Schmitt MC, Wardlaw SA, Ong DE. (1996) Localization of cellular retinoic acid-binding protein (CRABP) II and CRABP in developing rat testis. *Endocrinology* 137, 5028–5035.
- Zilles K, Hajós F, Kálmán M, Schleicher A. (1991) Mapping of glial fibrillary acidic protein-immunoreactivity in the rat forebrain and mesencephalon by computerized image analysis. *J Comp Neurol*, 308: 340–355
- Zolfaghari R, Ross AC. (2000) Lecithin:retinol acyltransferase from mouse and rat liver. CDNA cloning and liver-specific regulation by dietary vitamin a and retinoic acid. *J Lipid Res*. 41(12):2024-34.
- Zolfaghari R, Ross AC. (2002) Lecithin:retinol acyltransferase expression is regulated by dietary vitamin A and exogenous retinoic acid in the lung of adult rats. *J Nutr*. 132(6):1160-4.

## **10. Saját publikációk jegyzéke**

### Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Környei Z, Gócza E, Rühl R, **Orsolits B**, Vörös E, Szabó B, Vágovits B, Madarász E. (2007) Astroglia-derived retinoic acid is a key factor in glia-induced neurogenesis. *FASEB J.* 21(10):2496-509.

Impakt factor: 6,791

**Orsolits B**, Borsy A, Madarász E, Mészáros Z, Kőhidi T, Markó K, Jelítai M, Welker E, Környei Z. (2013) Retinoid machinery in distinct neural stem cell populations with different retinoid responsiveness.

*Stem Cells Dev.* 2013 Oct 15;22(20):2777-93.

Impakt factor: 4,67

### Disszertációtól független közlemény

Veszélka S, Tóth AE, Walter FR, Datki Z, Mózes E, Fülöp L, Bozsó Z, Hellinger E, Vastag M, **Orsolits B**, Környei Z, Penke B, Deli MA. (2013) Docosahexaenoic Acid Reduces Amyloid- $\beta$  Induced Toxicity in Cells of the Neurovascular Unit.

*J Alzheimers Dis.* 36(3):487-501.

Impakt factor: 4,174

## **11. Köszönetnyilvánítás**

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőm, Dr. Környei Zsuzsanna szakmai támogatását, útmutatását, türelmét és kitartását, amelyek lehetővé tették, hogy munkám jó ütemben és jó irányba haladjon tanulmányaim során.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskolájának és az MTA-KOKI munkatársainak a segítségnyújtásért doktori tanulmányaim, munkám és dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönet illeti Dr. Madarász Emíliát, aki laborvezetőként biztosította munkámhoz a szükséges szakmai és anyagi hátteret.

Külön köszönettel tartozom Barabás Liának, aki végtelen türelemmel és hozzáértéssel segített hozzá számos módszer elsajátításához és bevezetett a sejttenyésztés rejtjelmeibe.

Hálás vagyok az Idegi Sejt- és Fejlődésbiológiai Laboratórium minden régi és jelenlegi tagjának a szakmai támogatásért és a nagyszerű légkör megteremtéséért, amely színesebbé és könnyebbé tette a szorgos munkanapokat.

Ágoston Viktor	Kőhidi Tímea	Székács Inna
Barabás Kornélia	Környei Zsuzsanna	Szelényi Judit
Demeter Kornél	Madarász Emília	Tárnok Krisztián
Fekete Rebeka	Markó Károly	Vágovits Balázs
Gaál Katalin	Mészáros Zsófia	Van-Weert Szuzan
Hádingér Nóra	Murali Kumarasami	Varga Balázs
Herberth Balázs	Neubrandt Máté	Vőfély Gergő
Jády Attila	Nyámándi Piroska	Vörös Erzsébet
Jelitai Márta	Papp Noémi	Zádori Anita
Kenesei Kata	Schlett Katalin	

Köszönöm az együttműködést kollaborációs partnereinknek:

- Dr. Borsy Adrienn és Dr. Welker Ervin (MTA-Kémiai Kutató Központ)
- Dr. Deli Mária és Dr. Veszélka Szilvia (MTA-Szegedi Biológiai Központ)
- Dr. Gócza Elen (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont)
- Dr. Ralph Rühl (Debreceni Egyetem)
- Dr. Szabó Bálint (Eötvös Loránd Tudományegyetem)

Köszönettel tartozom a KOKI Nikon Mikroszkóp Központjának, a Nikon Austriának, az Auro-Science Kft.-nek és Katona Istvánnak, hogy lehetővé tették a konfokális mikroszkóp használatát. Hálás vagyok Barna Lászlónak, amiért nagy türelemmel és hozzáértéssel segített elsajátítani a műszer használatát és lehetővé tette, hogy munkám során csodálatos képek szülessenek.

**Valamint köszönöm családomnak és barátaimnak a rengeteg biztatást és támogatást, amivel tanulmányaimat segítették, hogy mindig számíthattam rájuk és mindazért az időért, amit tőlük vettem el a doktori munkám végzésével.**