

Analiza izražaja gena tijekom *in vitro* diferencijacije neurona

Analysis of gene expression during *in vitro* differentiation of neurons



Stojanac, A.^{1*}, I. Alić²

Sažetak

Analiza izražaja gena napravljena je tijekom *in vitro* diferencijacije živčanih matičnih stanica 0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije. U ovom je istraživanju napravljena analiza izražaja gena karakterističnih za živčane matične stanice (Nestin), neurone (MAP2), astrocite (GFAP) te za dva sinaptička biljega (Neurologin 1 i Synapsin 1) pomoću RT-PCR-a. Rezultati RT-PCR-a uspoređeni su s rezultatima imunocitokemije. Razina izražaja Nestina najveća je tijekom nultog dana diferencijacije i nakon toga smanjuje se tijekom diferencijacije stanica. No, dio stanica ostaje u nediferenciranom obliku i čini 2,5 % početne razine Nestina. Stanice MAP2 izražavaju već nulti dan diferencijacije na razini 16,6 % od maksimalnog izražaja koji se pojavljuje sedmi dan diferencijacije. Izražaj GFAP-a pojavljuje se treći dan diferencijacije i postupno raste do sedmog dana. Imunocitokemijski, GFAP-pozitivne stanice vidljive su tek peti dan u 1 % prebrojenih stanica. Oba sinaptička biljega pozitivna su već nulti dan diferencijacije i razina njihova izražaja postupno se povećava za 70 % od početne vrijednosti, pri čemu je razina Neurologina 1 jača u odnosu na Synapsin 1.

Abstract

Analysis was undertaken of gene expression during *in vitro* differentiation of neural stem cells on days 0, 1, 3, 5 and 7 of differentiation. In this study, expression of genes typical for neural stem cells (Nestin), neurons (MAP2), astrocytes (GFAP) and two synaptic markers (Neurologin 1 and Synapsin 1) were analysed using RT-PCR. The results of RT-PCR were compared with the results of immunocytochemistry. The Nestin expression was highest on day zero of differentiation and then decreased with cell differentiation. Some cells remained undifferentiated, and accounted for 2.5% of the initial Nestin expression. MAP2 expression on day zero of differentiation was 16.6% of the maximum expression occurring on the seventh day of differentiation. GFAP expression was observed on the third day of differentiation and gradually increased. On the fifth day of differentiation immunocytochemical analysis showed that 1% of the counted cells were GFAP positive. Both synaptic markers were already positive on day zero of differentiation and their expression gradually increased to 70% of the initial value. Neurologin 1 expression was stronger than Synapsin 1 expression.

¹Ante Stojanac, student, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
²dr. sc. Ivan Alić, Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

*e-mail: stojanacante@gmail.com

Ključne riječi: živčane matične stanice, neuroni, RT-PCR, izražaj gena, imunocitokemija

Key words: neural stem cells, neurons, RT-PCR, gene expression, immunocytochemistry

UVOD

Matične stanice (*engl. stem cells*) velika su skupina stanica koje se u kontroliranim uvjetima mogu diferencirati u bilo koju vrstu stanica. Matične se stanice dijele na totipotentne, pluripotentne i multipotentne matične stanice. Totipotentna stanica je zigota, jedina stanica iz koje se mogu razviti sve vrste stanica fetusa, ali isto tako i stanice fetalnih ovojnica koje čine posteljicu. Pluripotentne stanice su embrionalne matične stanice koje imaju manju sposobnost diferencijacije od zigote, ali se iz njih mogu razviti sve stanice embrioblasta, odnosno sam zametak. Multipotentne stanice su stanice koje su usmjerene prema određenom organskom sustavu. Živčane matične stanice primjer su multipotentnih matičnih stanica iz kojih će se razviti stanice središnjega i perifernog živčanog sustava. Živčane matične stanice mogu se izolirati iz fetalnog i odraslog mozga te imaju sposobnost diferencijacije u stanice živčanog sustava (neurone i glija-stanice) (Hyttel i sur., 2010.; McGeady i sur., 2014.). Poznato je da se u odraslom mozgu miša i čovjeka živčane matične stanice nalaze u subventrikularnoj zoni i u zrnatom sloju hipokampusa (Gage, 2000.; Mitrečić i sur., 2009.; Watson i sur., 2012.).

U istraživanjima diferencijacije živčanih matičnih stanica veliku ulogu imaju različiti sojevi miševa. Osim uobičajenih sojeva, tzv. divlji tip, uzgojeni su i brojni transgenični sojevi koji se razlikuju po izražaju različitih gena i bjelančevina u različitim vrstama stanica. Ovo je istraživanje napravljeno na transgeničnom soju (THY1 – YFP) koji u svojim živčanim stanicama pod utjecajem neuron-specifičnog promotora *Thy1*-gena izražava zelenu fluorescentnu bjelančevinu (*engl. green fluorescent protein, GFP*) ili jednu od njezinih spektralnih varijanti (zelena, žuta, crvena i zelenoplava) (Feng i sur., 2000.). Izražaj ove fluorescentne bjelančevine vidljiv je u svim dijelovima živčane stanice, uključujući jezgru, perikarion i nastavke, sve do terminalnih trnova – spina, što omogućuje vizualiziranje čitave stanice (Bannerman i sur., 2005.).

Iako ovaj soj miša THY1 – YFP postoji petnaestak godina, uzorak fluorescencije do danas nije precizno opisan (Wang i sur., 2006.). Morfološka analiza diferencijacije živčanih matičnih stanica u ovog soja opisana je tijekom

diferencijacije *in vitro*, tijekom embrionalnog razvoja i nakon transplantacije u mozak miša (Alić, 2015.). U navedenom istraživanju opisana je pojava izražaja THY1 – YFP te usporedba s brojnim biljezima matičnih stanica, neurona i astrocita. No, u literaturi nedostaju podaci koji bi na razini analize izražaja gena, odnosno pomoću lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (*engl. real time polymerase chain reaction, RT-PCR*) odredili razinu izražaja biljega koji su specifični za živčane matične stanice, neurone i astrocite, ali i biljega koji sudjeluju u sinaptičkom povezivanju stanica. Kako bismo odredili izražaj gena tijekom diferencijacije neurona u ovom istraživanju, odlučili smo se za tri biljega diferencijacije stanica (nestin, MAP2 i GFAP) te dva sinaptička biljega (Neurologin 1 i Synapsin 1).

Nestin je biljeg živčanih matičnih, odnosno progenitornih stanica tijekom razvoja središnjega živčanog sustava (Lendahl i sur., 1990.). Tijekom diferencijacije živčanih matičnih stanica u neurone ili u glija-stanice dolazi do smanjivanja izražaja Nestina (Dahlstrand i sur., 1995). Nestin-pozitivne stanice opisane su i u progenitornim stanicama prisutnima u odraslom središnjem živčanom sustavu (Morshead i sur., 1994.). Nestin je karakterističan biljeg nediferenciranih stanica središnjega živčanog sustava, ali prisutnost Nestin-pozitivnih stanica opisana je i u tumorskim stanicama živčanog sustava kao i u proliferacijskim endotelnim stanicama (Suzuki i sur., 2010.).

Tipičan biljeg neurona, MAP2 (*engl. microtubule-associated protein 2* – bjelančevina povezana s mikrotubulima 2) sastavni je dio cito-skeleta neurona i ima važnu ulogu tijekom diferencijacije stanica (Przyborski i Cambbray-Deakin, 1995.).

Za razliku od biljega neurona, GFAP (*engl. glial fibrillary acidic protein* – kisela glijalna fibrilarna bjelančevina) tipičan je biljeg astrocita koji se pojavljuje u zrelim staničnim kulturama, odnosno tek krajem fetalnog razdoblja ili čak nakon rođenja jedinke (Gomes i sur., 1999.).

Stvaranje sinapsi između neurona temeljni je proces koji se zbiva tijekom rasta i razvoja, ali i tijekom čitavog života jedinki, a nužno je za normalno obavljanje fizioloških funkcija stanica (Cullen i sur., 2010.). Bjelančevine koje

sudjeluju u stvaranju sinapsi dijele se na presinaptičke i postsinaptičke. Na temelju te podjele u ovom istraživanju korištena su dva sinaptička biljega: Neuroligin 1 (postsinaptički) i Synapsin 1 (presinaptički). Članovi porodice Neuroligin važne su postsinaptičke adhezijske molekule i imaju važnu ulogu u transsinaptičkim interakcijama s neureksinima. Smještaj i sinaptička aktivnost Neuroligina 1 specifična je za ekscitacijske sinapse (Bemben i sur., 2014.). Synapsin 1 ima važnu ulogu u otpuštanju neurotransmitera, aksonogenezi i sinaptogenezi. Osim toga, smatra se da je važan tijekom razvoja živčanog sustava, odnosno sudjeluje u sinaptičkom povezivanju neurona tijekom razvoja (Hedegaard i sur., 2013.).

Na temelju svega navedenoga postavljena je sljedeća hipoteza istraživanja: tijekom diferencijacije neurona doći će do znatnog porasta izražaja gena čiji su proteinski produkti sastavni dio stanice neurona, a također i do porasta izražaja gena koji su važni u stvaranju sinapsi između neurona.

MATERIJALI I METODE

Izolacija živčanih matičnih stanica

Za izolaciju živčanih matičnih stanica korišteni su fetusi 14,5 dana gravidne ženke, soja B6.Cg-Tg (Thy1-YFP) 16Jrs/J (YFP-16). Živčane matične stanice izolirane su iz telencefalona pomoću enzima akutaze (StemPro®Acutase® Cell Dissociation Reagent, Gibco by life Technologies) tako da je usitnjeno tkivo bilo pod djelovanjem akutaze 20 minuta, na temperaturi od 37 °C. Izolirane živčane matične stanice

uzgajane su u 25 mL medija (DMEM/F-12 (1:1) (1X)+GlutaMAX™-I, Gibco by life Technologies) u koji je dodano 500 µL B-27 (B-27®Supplement (50X), Gibco by life Technologies), 250 µL N-2 (N-2 Supplement (100X), Gibco by life Technologies), 250 µL Pen Strep (Penicillin Streptomycin, Gibco by life Technologies), 50 µL FGFb (Recombinant Mouse Fibroblast Growth Factor-basic) i 50 µL EGF (Recombinant Mouse Epidermal Growth Factor). Stanice su uzgajane do pojave neurosfera, nakon čega su disocirane i pripremljene za nasađivanje.

Podloge za diferencijaciju stanica

Stanice su uzgajane na podlogama obloženim Poly-D-lizinom u koncentraciji 500 µg/mL (Poly-D-lysine hydrobromide, SIGMA) koji je stajao 24 sata. Nakon ispiranja Poly-D-lizina sterilnom vodom podloge su obložene lamininom u koncentraciji od 10 µg/mL (Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane) koji je također stajao 24 sata. Tako pripremljene podloge spremne su za nasađivanje stanica.

Stanice su uzgajane na dvjema različitim vrstama podloga. Stanice određene za RT-PCR uzgajane su u triplikatu na plastičnim pločama za diferencijaciju (engl. *6 well plate*) u vremenskim točkama 0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije. Nasuprot tome, stanice koje su određene za imunocitokemiju uzgajane su na obloženim staklima (engl. *cover slips*) promjera 12 mm, koja su smještena u plastične ploče za diferencijaciju (engl. *24 well plate*) u istim vremenskim točkama.

Tablica 1. Istraživani esej, proizvođač i kataloški broj.

Esej	Proizvođač	Kataloški broj
GFAP	Applied Biosystems	Mm01253033_m1
MAP2	Applied Biosystems	Mm00485231_m1
Nestin	Applied Biosystems	Mm00450205_m1
Neuroligin 1	Applied Biosystems	Mm02344305_m1
Synapsin 1	Applied Biosystems	Mm00449772_m1
FG-MOUSE ACTB MGB	Applied Biosystems	4352933E

Diferencijacija stanica

Nakon disocijacije stanica, koja je napravljena pomoću enzima akutaze kako je ranije opisano, stanice su nasadene u koncentraciji od 200 000 do 250 000 stanica po staklu, odnosno 1 000 000 stanica po *wellu* za RT-PCR. Stanice su nasadene u mediju koji ne sadržava čimbenike rasta (FGFb i EGF), a nakon 24 sata promijenjen im je medij koji podržava rast neurona – *neurobasal* (Neurobasal®Medium (1X), Gibco by life Technologies).

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR, engl. real time –polymerase chain reaction)

Iz stanica, RNA je izolirana pomoću komercijalnog kita RNeasy® Mini Kit (Qiagen) prema uputama proizvođača. Nakon izolacije ukupne RNA (50 µL) na nanodropu je izračunata koncentracija RNA koja je nakon toga pomoću komercijalnog kita *high capacity* RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) pretvorena u cDNA. Iz dobivene cDNA napravljen je RT-PCR za pet istraživanih gena (Nestin, MAP2, GFAP, Neurologin 1 i Synapsin 1), dok je kao kontrola, odnosno *housekeeping*-gen korišten β-Actin (ACTB MGB) (TaqMan Gene Expression Assays). Istraživani eseji (geni), proizvođač i kataloški broj prikazani su u tablici 1. Svi su istraživani uzorci rađeni u triplikatu s 1 µg cDNA u ukupnom volumenu od 20 µL pomoću uređaja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Relativna kvantifikacija napravljena je pomoću formule $2^{-\Delta CT}$.

Imunocitokemija

Imunocitokemijsko bojenje provedeno je na fiksiranim stanicama. Stanice su nakon fiksacije 4 %-tnim paraformaldehidom (PFA) isprane tri puta po pet minuta PBS-om (engl. *phosphate buffered saline*) te im je dodano 500 µL otopine za permeabilizaciju i blokiranje nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela (0,2 % triton X-100 (Sigma) u PBS-u + 3 % kozjeg seruma). Blokiranje sekundarnog protutijela trajalo je 60 minuta, nakon čega je stanicama dodano 85 µL otopine primarnog protutijela (0,2 % triton X-100 u PBS-u + 1 % kozjeg seruma plus primarno protutijelo) te je ostavljeno u frižideru na +4 °C preko noći. Primarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju prikazana su u tablici 2.

Drugi dan primarna protutijela isprana su PBS-om tri puta po pet minuta. Nakon ispiranja primarnih protutijela, na stanice je stavljena otopina sekundarnih protutijela (0,2 % triton X-100 u PBS-u plus sekundarno protutijelo) te su tako stanice inkubirane dva sata na sobnoj temperaturi u zamračenoj prostoriji. Sekundarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju, prikazana su u tablici 3. Dva sata nakon inkubacije isprana su sekundarna protutijela, također tri puta po pet minuta, te je na stanice stavljena fluorescentna boja za jezgre, DAPI u koncentraciji 1 : 8000. Nakon deset minuta, DAPI je isprana, također tri puta po pet minuta te su stanice poklopljene medijem za fluorescentno poklopljanje (Dako Fluorescent Mounting Medium).

Tablica 2. Primarna protutijela upotrijebljena za imunocitokemiju.

Protutijelo	Podrijetlo	Razrjeđenje	Proizvođač
GFAP	pile	1 : 250	Abcam (ab4674)
MAP2	pile	1 : 1000	Abcam (ab5392)
Nestin	miš	1 : 200	Millipore (MAB353)

Tablica 3. Sekundarna protutijela upotrijebljena za imunocitokemiju.

Protutijelo	Razrjeđenje	Proizvođač
Alexa Fluor 546 koza anti - miš IgG (H+L)	1 : 1000	Invitrogen (A11003)
Alexa Fluor 546 koza anti - pile IgG (H+L)	1 : 1000	Invitrogen (A11040)

Poklopljeni preparati ostavljeni su u frižideru na +4 °C do mikroskopiranja na konfokalnom mikroskopu (Zeiss, LSM 510 Meta).

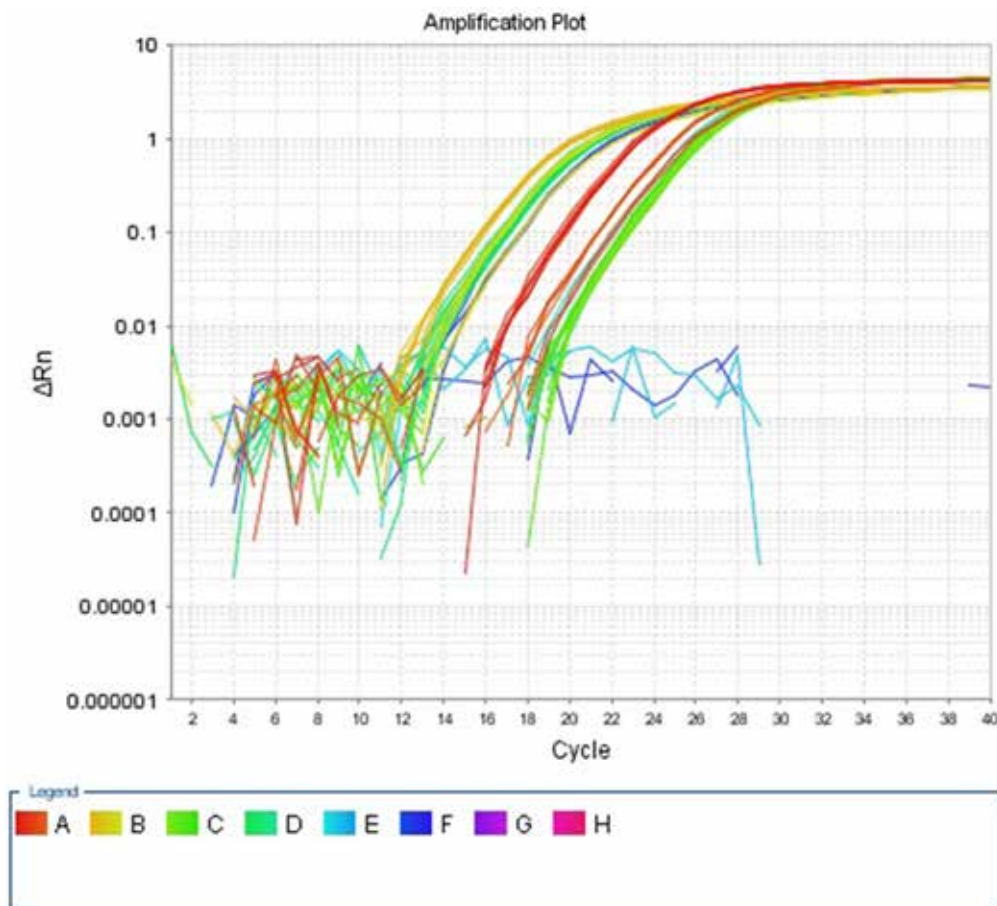
REZULTATI

Kako bi se napravila analiza izražaja gena tijekom diferencijacije neurona iz živčanih matičnih stanica, izolirana je RNA iz koje je pomoću RT-PCR-a određena analiza izražaja gena specifičnih za matične stanice (Nestin), neurone (MAP2), astrocite (GFAP) te za sinaptičku aktivnost stanica (Neurologin 1 i Synapsin 1). Razina izražaja pojedinoga gena određena je pomoću standardnog programa u 40 ciklusa. Istraživani geni prelaze prag detekcije u 14. – 18. ciklusu umnažanja (grafikon 1). Osim analize izražaja gena napravljene na razini nukleinskih kiselina, u istim je vremenskim točkama napravljena i imunocitokemija kako bi se rezultati RT-PCR-a usporedili s rezultatima imunocitokemije.

RT-PCR

Tijekom diferencijacije THY1 – YFP stanica, razina izražaja Nestina najviša je nulti dan diferencijacije. Tijekom prvoga dana diferencijacije razina izražaja Nestina još je uvijek visoka, ali je ipak 40 % manja u odnosu na živčane matične stanice. Treći dan diferencijacije, razina Nestina očekivano se smanjuje i za 20 % je manja nego prvoga dana diferencijacije. Tijekom petoga dana diferencijacije razina Nestina gotovo je na istoj razini kao i trećeg dana. Sedmi dan diferencijacije razina Nestina izrazito se smanjuje i čini svega 2,5 % početne vrijednosti izražane u živčanim matičnim stanicama. Budući da je Nestin karakterističan za matične stanice, razina njegova izražaja naglo se smanjuje tijekom diferencijacije stanica, no ipak mali dio stanica ostaje Nestin-pozitivan, odnosno zadržava se u tzv. matičnom obliku (grafikon 2).

Razina izražaja MAP2, tipičnog biljega neurona, izrazito se povećava tijekom diferencijaci-

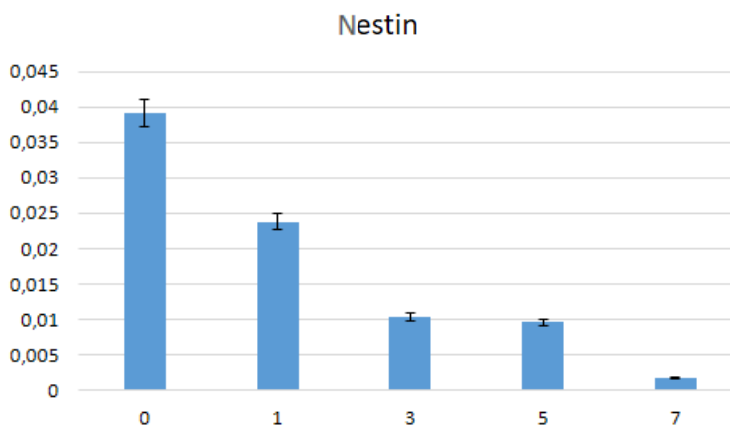


Grafikon 1. Prikaz amplifikacije Nestina i β -Actina tijekom izvođenja RT-PCR-a. Isprekidane plave crte predstavljaju negativnu kontrolu u kojoj nema uzorka pa do amplifikacije nije moglo ni doći.

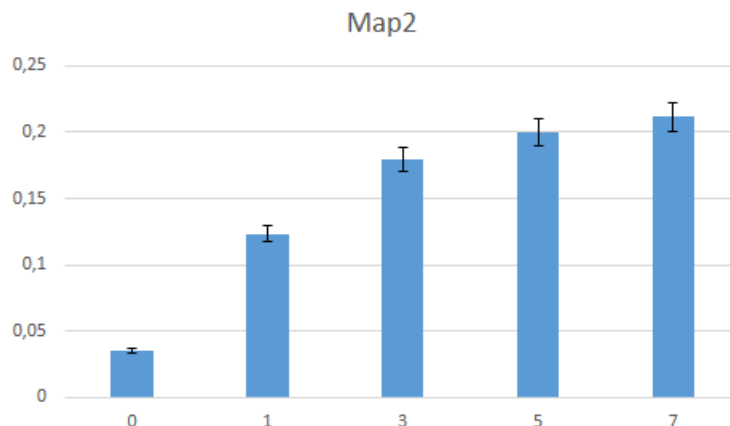
je stanica. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da nulti dan diferencijacije dio stanica izražava MAP2. Iako se radi o živčanim matičnim stanicama koje još nisu krenule u diferencijaciju, razina izražaja MAP2 iznosi 16,6 % izražaja, koji stanice postižu sedmi dan diferencijacije. Budući da su živčane matične stanice predodređene da postanu neuroni, izražavaju MAP2 vrlo rano.

Diferencijacijom stanica naglo se povećava razina izražaja MAP2 tako da 7. dan iznosi 90 % od ukupnog broja stanica u staničnoj kulturi (grafikon 3). Za razliku od tipičnog biljega neurona, izražaj biljega astrocita (GFAP) pojavljuje se tek 3. dana diferencijacije stanica i iznosi 20 % od maksimalnog izražaja koji se pojavljuje sedmi dan diferencijacije stanica (grafikon 4).

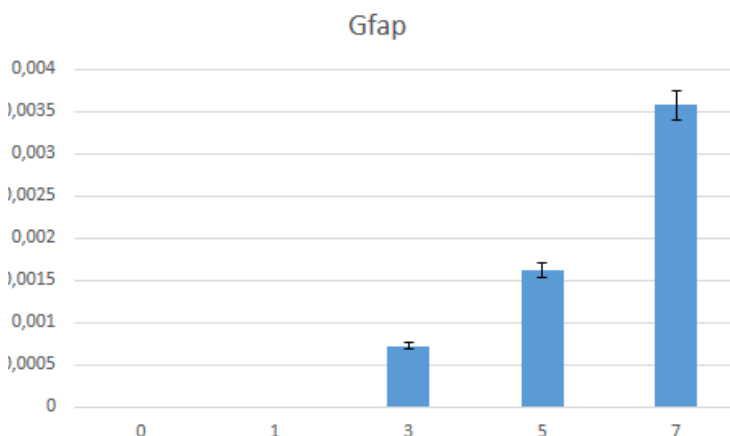
Grafikon 2. Izražaj Nestina tijekom diferencijacije stanica. Izražaj je najjači tijekom nultog dana diferencijacije, odnosno u živčanim matičnim stanicama. Sazrijevanjem stanica dolazi do smanjivanja izražaja Nestina. Legenda: na X osi prikazana je razina izražaja Nestina, a na osi Y prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica (0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije).

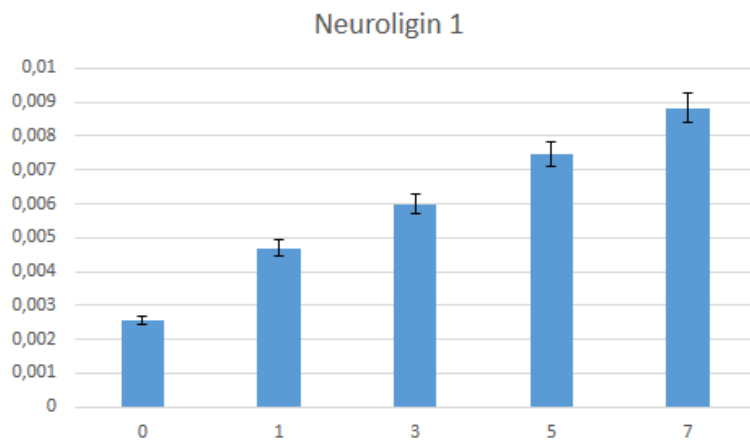


Grafikon 3. Izražaj MAP2 tijekom diferencijacije stanica. Tijekom nultog dana diferencijacije mali postotak stanica izražava MAP2, a razina izražaja raste tijekom diferencijacije. Legenda: na osi X prikazana je razina izražaja MAP2, a na osi Y prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica (0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije).

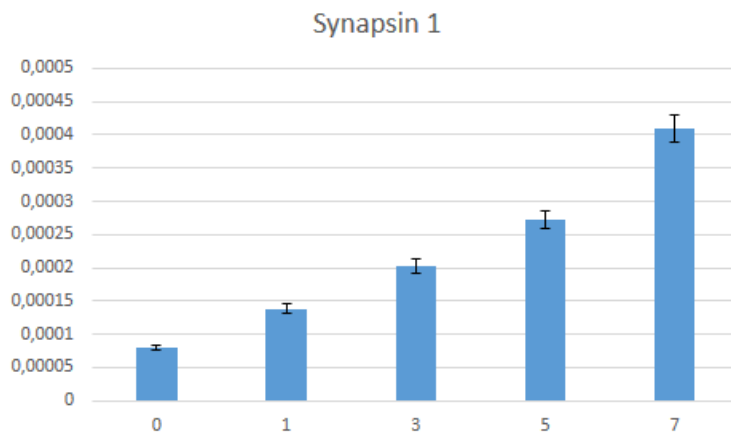


Grafikon 4. Izražaj GFAP-a tijekom diferencijacije stanica. Tijekom nultog i prvog dana diferencijacije nema izražaja GFAP-a. U izrazito malom postotku stanice izražavaju GFAP tijekom trećeg dana, da bi do kraja diferencijacije razina izražaja porasla do svega 3 %. Legenda: na osi X prikazana je razina izražaja GFAP-a, a na osi Y prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica (0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije).





Grafikon 5. Izražaj Neurologina 1 tijekom diferencijacije stanica. Razina izražaja tijekom diferencijacije stanice povećava se za 70 % od nultog dana diferencijacije. Legenda: na osi X prikazana je razina izražaja Neurologina 1, a na osi Y prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica (0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije).



Grafikon 6. Izražaj Synapsina 1 tijekom diferencijacije stanica. Razina izražaja tijekom diferencijacije stanice povećava se za 70 % od nultog dana diferencijacije. Legenda: na osi X prikazana je razina izražaja Synapsina 1, a na osi Y prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica (0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije).

Osim biljega matičnih stanica, neurona i astrocita određena je i razina izražaja dvaju sinaptičkih biljega. Izražaj Neurologina 1 pojavljuje se tijekom nultog dana i znatno se pojačava tijekom sedam dana diferencijacije. Razina Neurologina 1 od nultog dana do sedmog dana diferencijacije povećava se za 70 %, što upućuje na izrazitu sinaptičku aktivnost stanica tijekom diferencijacije (grafikon 5). Izražaj Synapsina 1 također se pojavljuje nulti dan diferencijacije i povećava se za 70 % tijekom procesa diferencijacije (grafikon 6). Na grafikonima 5 i 6 jasno je vidljiv znatan porast izražaja obaju sinaptičkih biljega, ali je razina izražaja Neurologina 1 kao postsinaptičkog biljega izrazito veća u odnosu na Synapsin 1 koji je presinaptički biljeg.

Imunocitokemija

Imunocitokemija je napravljena na THY1 – YFP stanicama u istim vremenskim točkama kao i RT-PCR kako bi se rezultati mogli međusobno usporediti. Stanice su nakon fiksacije obojene specifičnim protutijelima za matične stanice (Nestin), za neurone (MAP2) i za astroците (GFAP). Budući da je imunocitokemija napravljena na THY1 – YFP stanicama, koje u određenim neuronima izražavaju zelenu fluorescentnu bjelančevinu, upotrijebljeno je crveno sekundarno protutijelo.

Tijekom nultog dana diferencijacije stanica, od ukupnog broja prebrojenih stanica 99 % stanica je Nestin-pozitivno (slika 1A-C). Svega 1 %

stanica je MAP2 pozitivno i pokazuje kolokalizaciju s Nestin-pozitivnim stanicama.

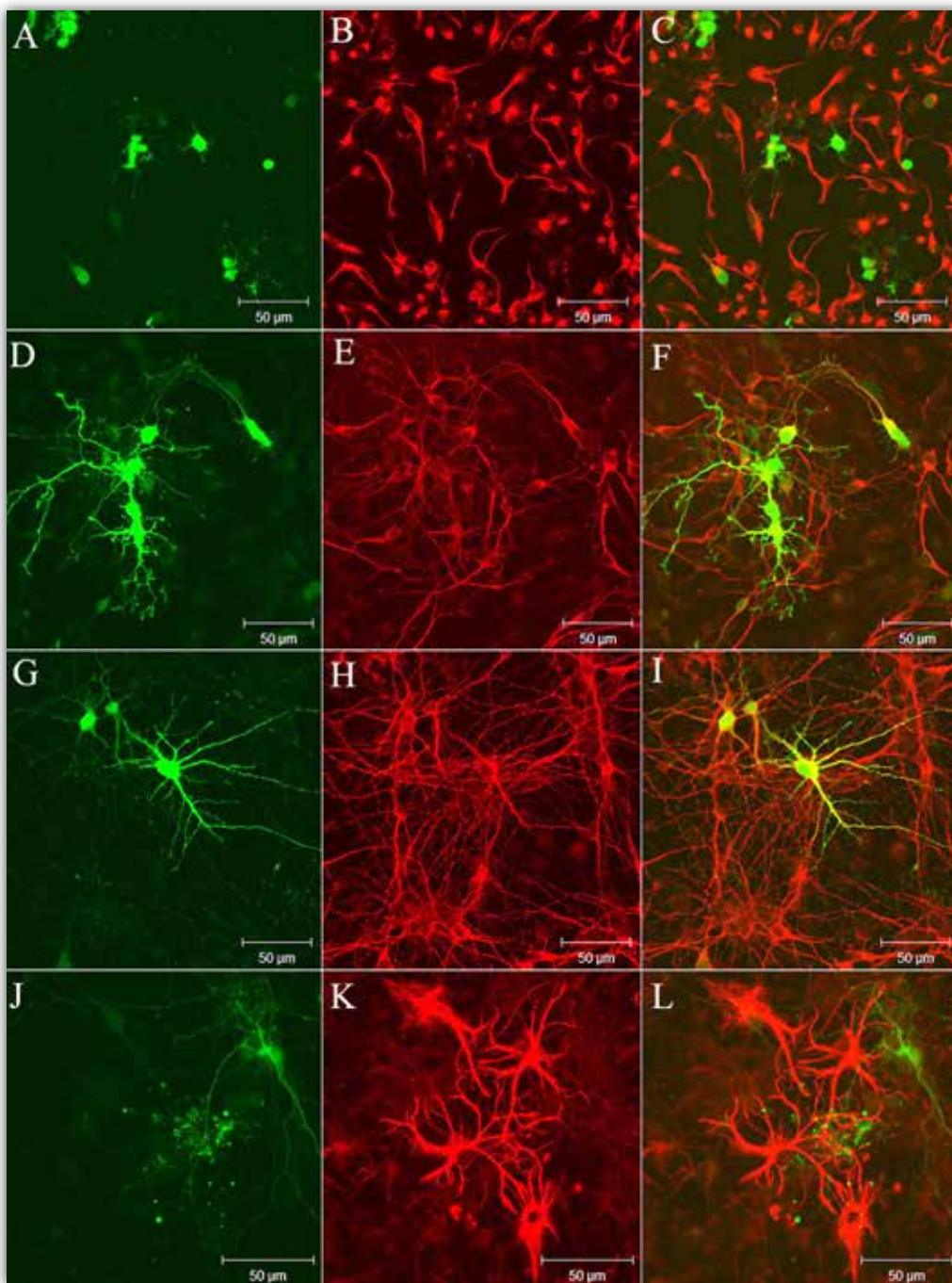
Tijekom prvoga dana diferencijacije stanica 80 % stanica je Nestin-pozitivno, a udio MAP2-pozitivnih stanica povećava se na 20 %. Kako je bilo i očekivano, niti jedna stanica nije GFAP-pozitivna.

Trećeg dana diferencijacije stanica udio Nestin-pozitivnih stanica smanjuje se na 30 %, dok se udio MAP2 pozitivnih stanica povećava na 70 %. Imunocitokemijski nije zabilježena niti jedna GFAP-pozitivna stanica.

Petog dana diferencijacije stanica 15 % stanica je Nestin-pozitivno, dok je udio MAP2 (sli-

Slika 1. Imunocitokemija THY1 – YFP stanica (zeleno) tijekom diferencijacije.

Na slici A-C prikazano je bojenje Nestinom (crveno) nulti dan diferencijacije; D-E prikazano je bojenje s MAP2 (crveno) treći dan diferencijacije; G-I prikazano je bojenje s MAP2 (crveno) sedmi dan diferencijacije te na slici J-L bojenje s GFAP-om (crveno) sedmi dan diferencijacije.



ka 1D-F) pozitivnih stanica porastao na 84 %, a svega 1 % stanica je GFAP-pozitivno. Budući da su stanice petog dana gotovo u potpunosti diferencirane, jasno se vidi da su većina stanica neuroni, a samo mali postotak stanica ostaje u obliku matičnih stanica.

Sedmog dana diferencijacije udio Nestin-pozitivnih stanica pao je na 7 %, a MAP2 (slika 1G-I) pozitivnih stanica porastao na 90 %. Kako se u ovoj vremenskoj točki govori o zreloj i potpuno diferenciranoj kulturi stanica, počeli su se diferencirati i astrociti, pa je udio GFAP (slika 1J-L) pozitivnih stanica narastao na 3 %.

Budući da je imunocitokemija napravljena na transgeničnim stanicama koje u pojedinim neuronima izražavaju YFP, prebrojavanjem je utvrđeno da se tijekom diferencijacije stanica jasno vidi da je udio YFP pozitivnih stanica 20% i ne mijenja se tijekom diferencijacije stanica.

RASPRAVA

Na živčanim matičnim stanicama provedena je analiza izražaja gena tijekom diferencijacije stanica u pet vremenskih točaka (0., 1, 3., 5. i 7. dan diferencijacije). Svi su uzorci rađeni su u triplikatu kako bi se izbjegla pogreška i smanjila varijabilnost između pojedinih uzoraka. Na uzorcima je određena razina izražaja biljega za matične stanice (Nestin), neurone (MAP2), astrocite (GFAP) te dva sinaptička biljega (Neurologin 1 i Synapsin 1). Rezultati izražaja gena uspoređeni su s rezultatima imunocitokemije te s podacima iz literature.

Izražaj Nestina izrazito je visok nulti dan diferencijacije, odnosno u živčanim matičnim stanicama koje još nisu krenule u diferencijaciju. Visok je izražaj i očekivan budući da se radi o visokospecifičnom biljegu koji je karakterističan za matične stanice. Ovaj nalaz odgovara i nalazu imunocitokemije gdje je prebrojavanjem stanica utvrđeno da je 99 % stanica Nestin-pozitivno. Osim s rezultatima imunocitokemije, ovaj se nalaz u potpunosti slaže i s istraživanjem koje su proveli Lendahl i suradnici (1990.), prema kojemu je Nestin tipičan biljeg progenitornih stanica živčanog sustava, bilo da se radi o neuronima bilo glija-stanicama. Tijekom diferencijacije razina Nestina znatno se smanjuje sa sazrijevanjem kulture, budući da zrele stanice

nisu Nestin-pozitivne. Rezultati RT-PCR-a u potpunosti se podudaraju s rezultatima imunocitokemije. No, vidljiva je razlika trećega i petog dana diferencijacije gdje se na RT-PCR-u očituje ista razina izražaja, dok imunocitokemijski dolazi do znatnog pada s 30 na 15 %. Ovakav se nalaz objašnjava prerastanjem nastavaka diferenciranih stanica zbog čega nije moguće prebrojiti sve nediferencirane stanice (Alić, 2015.).

Izražaj MAP2 vidljiv je već u živčanim matičnim stanicama i iznosi 16,6 % od vrijednosti koju stanice izražavaju sedmi dan diferencijacije kao zreli neuroni. Ovakav nalaz odgovara i nalazu imunocitokemije, što je prikazano na slici 1A-C gdje se jasno vide THY1 – YFP pozitivne (zeleno) stanice koje su i MAP2-pozitivne. Budući da se radi o živčanim matičnim stanicama koje su predodređene da se diferenciraju uglavnom u neurone, za očekivati je da su pozitivne na biljega neurona. Stanice koje su THY1 – YFP pozitivne jesu zreliji oblici matičnih stanica i više nisu Nestin pozitivne. Prema istraživanju Cortija i suradnika (2006.) u staničnoj kulturi izražaj YFP pod utjecajem *Thy1*-gena zabilježen je isključivo u zrelim neuronima, ali ne i u nediferenciranim neurosferama. Za razliku od navedenog istraživanja, u ovom su istraživanju jasno su vidljive THY1 – YFP pozitivne stanice, a rezultati RT-PCR potvrđuju izražaj MAP2 u matičnim stanicama.

Izražaj GFAP-a pomoću RT-PCR-a vidljiv je trećeg dana diferencijacije u izrazito malom postotku i postupno raste do kraja diferencijacije stanica. Imunocitokemijski GFAP-pozitivne stanice vidljive su tek petoga dana diferencijacije, i to u svega 1 % prebrojenih stanica, a udio im se sedmoga dana povećava do 3 %. Mali postotak astrocita može se objasniti načinom uzgoja koji je ponajprije usmjeren k uzgoju neurona. Izražaj GFAP-a trećeg dana diferencijacije, opisan pomoću RT-PCR-a, govori nam da je dio stanica predodređen da postanu astrociti te se „pripremaju“ u diferencijaciju. No, imunocitokemijski u ovoj vremenskoj točki stanice predodređene da postanu astrociti još uvijek ne izražavaju GFAP. Ovakav nalaz odgovara i nalazu Yuasa (2001.), da razvoju astrocita, koji se u miša pojavljuje tek postnatalno, prethode različiti oblici astro-glije koji se mogu detektirati visokospecifičnim protutijelima poput tenascina-C koji je pozitivan prije GFAP-a. Osim toga, na slici 1 jasno je vid-

ljivo da nema kolokalizacije između GFAP-pozitivnih stanica i THY1 – YFP koji je specifičan za neurone, što se slaže s drugim istraživanjima Fenga i suradnika (2000.) te Cortija i suradnika (2006.).

Izražaj sinaptičkih biljega vidljiv je također tijekom nultog dana diferencijacije stanica, odnosno u živčanim matičnim stanicama. To upućuje na pripremu stanica za diferencijaciju, odnosno za sinaptičko povezivanje stanica koje je nužno za normalnu diferencijaciju. U ovom su radu korištena dva sinaptička biljega, Neuroigin 1, koji je postsinaptički, i Synapsin 1, koji je presinaptički biljeg. Rezultati ovoga istraživanja pokazuju da se oba biljega tijekom diferencijacije povećavaju za 70 % od početne vrijednosti. No, razina izražaja Neuroigina 1 izrazito je veća od razine Synapsina 1, što upućuje na veću važnost ovog biljega tijekom same diferencijacije stanica. Ovaj nalaz odgovara nalazu Bembena i suradnika (2014.) i potvrđuje veliku važnost Neuroigina 1 kao adhezijske molekule tijekom neurogeneze. S druge strane, Synapsin 1 važan je za razvoj aksona i samu diferencijaciju stanice, pa je porast također očit tijekom diferencijacije (Hedegaard i sur., 2013.).

Naši rezultati pokazuju da se razina izražaja gena u potpunosti podudara s imunocitokemijom, osim u slučaju GFAP-a čiji se izražaj na razini gena pojavljuje dva dana ranije u odnosu na imunocitokemiju, što upućuje na njegovu prisutnost i u stanicama koje su predodređene da postanu astrociti.

ZAHVALA

Zahvaljujemo doc. dr. sc. Dinku Mitrečiću, voditelju Laboratorija za matične stanice na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. Ovo je istraživanje nagrađeno Rektorovom nagradom 2016., a izrađeno je u sklopu projekta „Young-Brain (EU-ESF)” čiji je voditelj doc. dr. sc. Dinko Mitrečić.

LITERATURA

- ALIĆ, I. (2015): Morfološka analiza nastanka i diferencijacije neurona u staničnoj kulturi, tijekom razvoja zametka i nakon transplantacije u mozak miša uporabom matičnih stanica dobivenih iz mišjeg soja THY1 YFP-16.

Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

- BANNERMAN, P. G., A. HAHN, S. RAMIREZ, M. MORLEY, C. BÖNNEMANN, S. YU, G.-X. ZHANG, A. ROSTAMI, D. PLEASURE (2005): Motor neuron pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis: studies in THY1-YFP transgenic mice. *Brain* 128, 1877–1886.
- BEMBEN, M. A., S. L. SHIPMAN, T. HIRAI, B. E. HERRING, Y. LI, J. D. BADGER II, R. A. NICOLL, J. S. DIAMOND, K. W. ROCHE (2014): CaMKII phosphorylation of neuroigin-1 regulates excitatory synapses. *Nature Neuroscience* 17, 56–64.
- CORTI, S., F. LOCATELLI, D. PAPADIMITRIOU, C. DONADONI, S. SALANI, R. DEL BO, S. STRAZZER, N. BRESOLIN, G. P. COMI (2006): Identification of a Primitive Brain-Derived Neuronal Stem Cell Population Based on Aldehyde Dehydrogenase Activity. *Stem Cells* 24, 975–985.
- CULLEN, D. K., M. GILROY, H. R. IRONS, M. C. LAPLACA (2010): Synapse-to-neuron ratio is inversely related to neuronal density in mature neuronal cultures. *Brain Res.* 1359, 44–55.
- DAHLSTRAND, J., M. LARDELLI, U. LENDAHL (1995): Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 84, 109–129.
- FENG, G., R. H. MELLOR, M. BERNSTEIN, C. KELLER-PECK, Q. T. NGUYEN, M. WALLACE, J. M. NERBONNE, J. W. LICHTMAN, J. R. SANES (2000): Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP. *Neuron* 28, 41–51.
- GAGE, F. H. (2000): Mammalian Neural Stem Cells. *Science* 287, 1433–1438.
- GOMES, F.C.A., D. PAULIN, V. MOURA NETO (1999): Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 619–631.
- HEDEGAARD, C., K. KJAER-SORENSEN, L. B. MADSEN, C. HENRIKSEN, J. MOMENI, C. BENDIXEN, C. OXVIG, K. LARSEN (2013): Porcine synapsin 1: *SYN1* gene analysis and functional characterization of the promoter. *FEBS Open Bio.* 3, 411–420.

- HYTTEL, P., F. SINOWATZ, M. VEJLSTED (2010): Essentials of Domestic Animal Embryology. Saunders Elsevier. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto.
- LENDAHL, U., L. B. ZIMMERMAN, R. D. MCKAY (1990): CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585–595.
- MCGEADY, T. A., P. J. QUINN, E. S. PITZPATRICK, M. T. RYAN (2014): Veterinarska embriologija. Naklada Slap. Zagreb.
- MITREČIĆ, D., S. GAJOVIĆ, R. POCHET (2009): Toward the Treatments with Neural Stem Cells: Experiences from Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Anat. Rec.* 292, 1962–1967.
- MORSHEAD, C. M., B. A. REYNOLDS, C. G. CRAIG, M. W. MCBURNEY, W.A. STAINES, D. MORASSUTTI, S. WEISS, D. VAN DER KOOP (1994): Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13, 1071–1082.
- PRZYBORSKI, S. A., M. A. CAMBRAY-DEAKIN (1995): Developmental regulation of MAP2 variants during neuronal differentiation in vitro. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 89, 187–201.
- SUZUKI, S., J. NAMIKI, S. SHIBATA, Y. MASTUZAKI, H. OKANO (2010): The Neural Stem/Progenitor Cell Marker Nestin Is Expressed in Proliferative Endothelial Cells, but Not in Mature Vasculature. *J. Histochem. Cytochem.* 58, 721–730.
- YUASA, S. (2001): Development of Astrocytes in the Mouse Embryonic Cerebrum Tracked by Tenascin-C Gene Expression. *Arch. Histol. Cytol.* 64, 119–126.
- WANG, Y., J. ZHANG, S. MORI, J. NATHANS (2006): Axonal Growth and Guidance Defects in *Frizzled3* Knock-Out Mice: A Comparison of Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging, Neurofilament Staining, and Genetically Directed Cell Labeling. *J. Neurosci.* 26, 355–364.
- WATSON, C., G. PAXINOS, L. PUELLES (2012): The Mouse Nervous System. Elsevir. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo.



Welcome
to Tallinn
in June 2018

