

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Ante Stojanac

**ANALIZA IZRAŽAJA GENA TIJEKOM *IN VITRO*
DIFERENCIJACIJE NEURONA**

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta te u Laboratoriju za matične stanice Hrvatskog instituta za istraživanje mozga pod vodstvom dr. sc. Ivana Alića, i predan je na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2015./2016.

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	1
2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA	3
3. MATERIJAL I METODE	4
4. REZULTATI	7
5. RASPRAVA	14
6. ZAKLJUČCI	16
7. ZAHVALA	17
8. POPIS LITERATURE	18
9. SAŽETAK	21
10. SUMMARY	22
11. ŽIVOTOPIS	23

1. UVOD

Matične stanice (*engl.* stem cells) velika su skupina stanica koje se u kontroliranim uvjetima mogu diferencirati u bilo koju vrstu stanica. Matične stanice dijele se na totipotentne, pluripotentne i multipotentne matične stanice. Totipotentna stanica je zigota, jedina stanica iz koje se mogu razviti sve stanice, organi, organski sustavi, ali isto tako i fetalne ovojnice koje čine posteljicu. Pluripotentne stanice su embrionalne matične stanice koje imaju manju sposobnost potencije od zigote, ali iz njih će se razviti sve stanice embrioblasta, odnosno sami 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 središnjeg 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 istraživanje napravljeno je na transgeničnom soju (THY1 – YFP) koji u svojim živčanim stanicama izražava zelenu fluorescentnu bjelančevinu (*engl.* green fluorescent protein, GFP) ili jednu od njezinih spektralnih varijanti (zelena, žuta, crvena i zeleno-plava), pod utjecajem neuron-specifičnog promotora *Thy1* gena (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.). Osim u istraživanjima vezanim uz živčani sustav, ovaj soj se koristi u brojnim imunološkim istraživanjima budući da je izražaj specifičan za T-stanice, timocite, endotelne stanice i fibroblaste.

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. Međutim, u literaturi nedostaju podaci koji bi na razini analize izražaja gena odnosno

pomoću lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (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.

Nestin je biljeg živčanih matičnih stanica, odnosno progenitornih stanica tijekom razvoja središnjeg živčanog sustava (LEND AHL 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 prisutnim u odraslom središnjem živčanom sustavu (MORSHEAD i sur., 1994.). Nestin je karakterističan biljeg nediferenciranih stanica središnjeg živčanog sustava, ali Nestin pozitivne stanice opisane su i 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 citoskeleta 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) je tipičan biljeg astrocita koji se javlja 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 događa tijekom rasta i razvoja. Stvaranje sinapsi zbiva se tijekom čitavog života jedinki, a neophodno je za normalno obavljanje fizioloških funkcija stanica (CULLEN i sur., 2010.). Bjelančevine koje sudjeluju u stvaranju sinapsi dijele se na pre-sinaptičke i post-sinaptičke. Na temelju te podjele u ovom istraživanju korištena su dva sinaptička biljega: Neuroligin1 (post-sinaptički) i Synapsin1 (pre-sinaptički). Članovi porodice Neuroligin važne su post-sinaptičke adhezijske molekule i imaju važnu ulogu u trans-sinaptičkim interakcijama s neureksinima. Smještaj i sinaptička aktivnost Neuroligin1 specifična je za ekscitacijske sinapse (BEMBEN i sur., 2014.). Synapsin1 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.).

2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA

Hipoteza planiranog istraživanja jest da će tijekom diferencijacije neurona doći do značajnog porasta izražaja gena čiji su proteinski produkti sastavni dio stanice neurona. Osim toga očekuje se i porast izražaja gena koji su važni u stvaranju sinapsi između neurona.

Kako bi se testirala hipoteza postavljeni su slijedeći ciljevi:

1. Odrediti izražaj pojedinih gena tijekom nultog dana diferencijacije živčanih matičnih stanica koji će biti bazalna vrijednost za naredne vremenske točke
2. Tijekom diferencijacije neurona odrediti razinu izražaja gena neophodnih za rast i diferencijaciju neurona
3. Odrediti razinu izražaja gena važnih u sinaptogenezi neurona
4. Usporediti rezultate izražaja pojedinih gena dobivenih RT-PCR metodom s rezultatima imunocitokemije

3. MATERIJAL I METODE

Izolacija živčanih matičnih stanica

Za izolaciju živčanih matičnih stanica korištene su ženke gravidne 14,5 dana, 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). Usitnjeno tkivo bilo je 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.

Priprema podloga za diferencijaciju stanica

Stanice su uzgajane na podlogama koje su obložene 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 10 µg/mL (Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane) koji je također stajao 24 sata. Na taj način pripremljene podloge spremne su za diferencijaciju stanica.

Stanice su uzgajane na dvije različite vrste 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. dana diferencijacije. Nasuprot tome, stanice koje su određene za imunocitokemiju uzgajane 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.

Diferencijacija stanica

Nakon disocijacije, stanice su nasađene u koncentraciji 200 000–250 000 stanica po staklu, odnosno 1 000 000 stanica po wellu za RT-PCR. Stanice su nasađene u mediju koji ne

sadrži čimbenike rasta (FGFb i EGF). Nakon 24 sata stanicama je promijenjen 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 (50µL) 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, Neuroligin1 i Synapsin1), dok je kao kontrola odnosno „housekeeping“ gen korišten β-Actin (ACTB MGB) (TaqMan Gene Expression Assays). Istraživani eseji, proizvođač i kataloški broj prikazani su u Tablici 1. Svi istraživani uzorci rađeni su u triplikatu s 1 µg cDNA u ukupnom volumenu 20 µL pomoću uređaja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Relativna kvantifikacija napravljena je pomoću formule $2^{-\Delta CT}$.

Tablica1. 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
Neuroligin1	Applied Biosystems	Mm02344305_m1
Synapsin1	Applied Biosystems	Mm00449772_m1
FG-MOUSE ACTB MGB	Applied Biosystems	4352933E

Imunocitokemija

Imunocitokemija napravljena je na fiksiranim stanicama. Stanice su nakon fiksacije 4% paraformaldehidom (PFA) isprane tri puta po pet minuta PBS-om (*engl.* phosphate buffered

saline) te im je dodano 500 μ L 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 μ L otopine primarnog protutijela (0,2% triton X-100 u PBS-u + 1% kozjeg seruma + 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 + 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 poklapanje (Dako Fluorescent Mounting Medium). Poklopljeni preparati, ostavljeni su u frižideru +4 °C do mikroskopiranja na konfokalnom mikroskopu (Zeiss, LSM 510 Meta).

Tablica 2. Primarna protutijela upotrijebljena za imunocitokemiju.

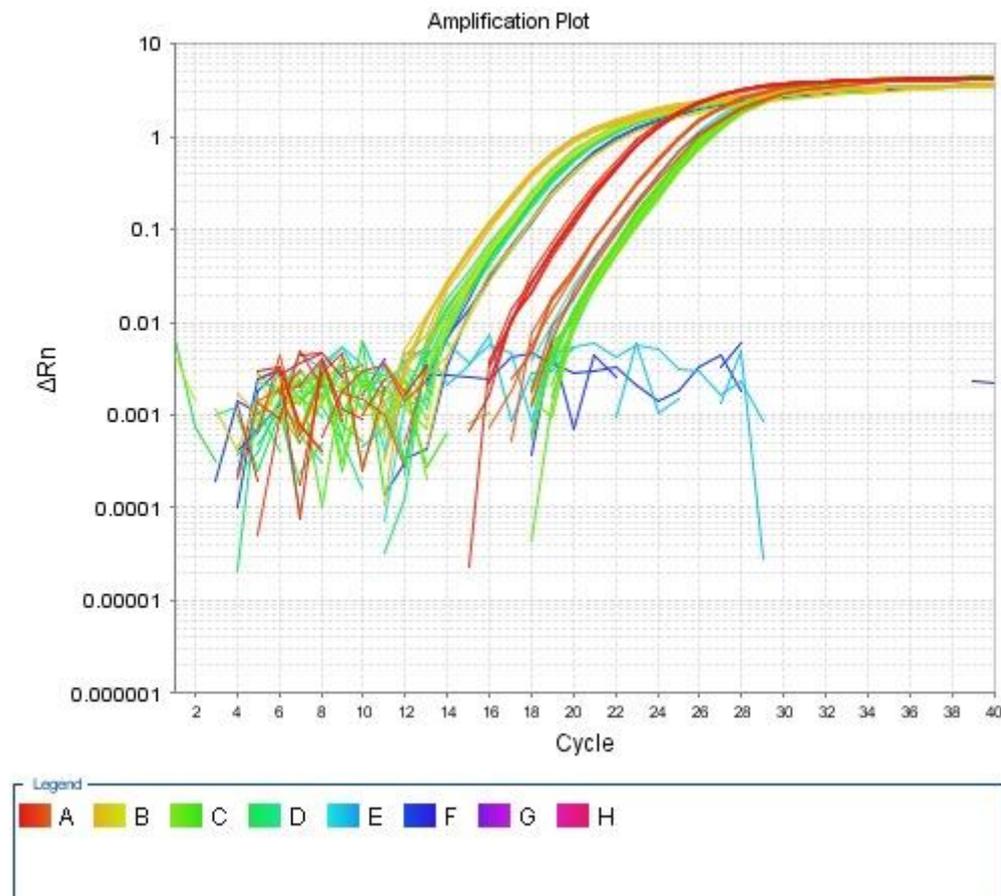
Protutijelo	Podrijetlo	Razrjeđenje	Proizvođač
GFAP	pile	1:250	Abcam (ab4674)
MAP2	pile	1:1000	Abcam (ab5392)
Nestin	miš	1:200	Millipore (MAB353)

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)

4. REZULTATI

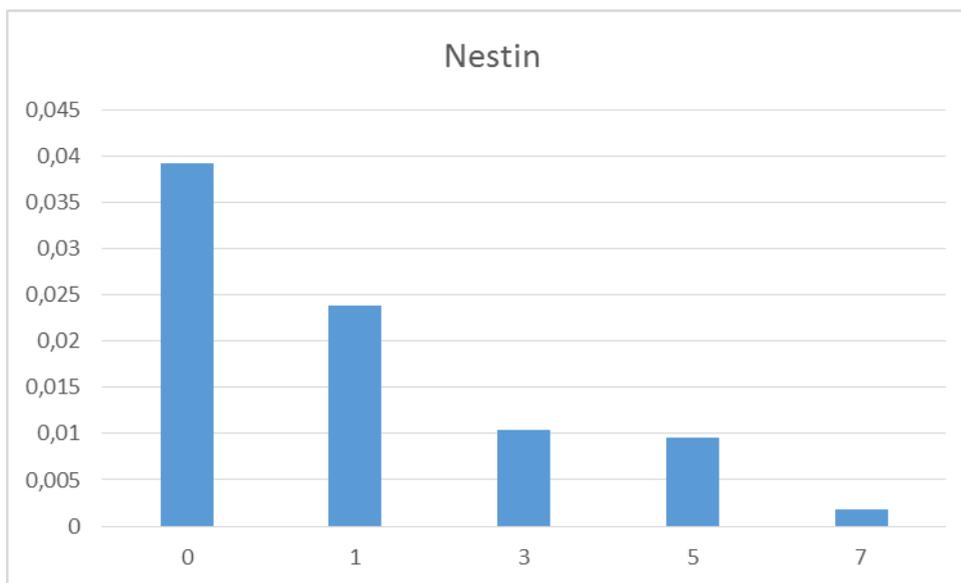
Kako bi se napravila analiza izražaja gena tijekom diferencijacije neurona iz živčanih matičnih stanica izolirana je RNA iz koje je pomoću RT-PCR-a određena analiza izražaja gena specifičnih za matične stanice (Nestin), neurone (MAP2), astrocite (GFAP) te za sinaptičku aktivnost stanica (Neurologin1 i Synapsin1). Razina izražaja pojedinog gena određena je pomoću standardnog programa u 40 ciklusa. Istraživani geni prelaze prag detekcije u 14.-18. ciklusu umnažanja (Grafikon1). Osim analize izražaja gena napravljene na razini nukleinskih kiselina, u istim vremenskim točkama napravljena je i imunocitokemija kako bi se rezultati RT-PCR-a usporedili s rezultatima imunocitokemije.



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 doći.

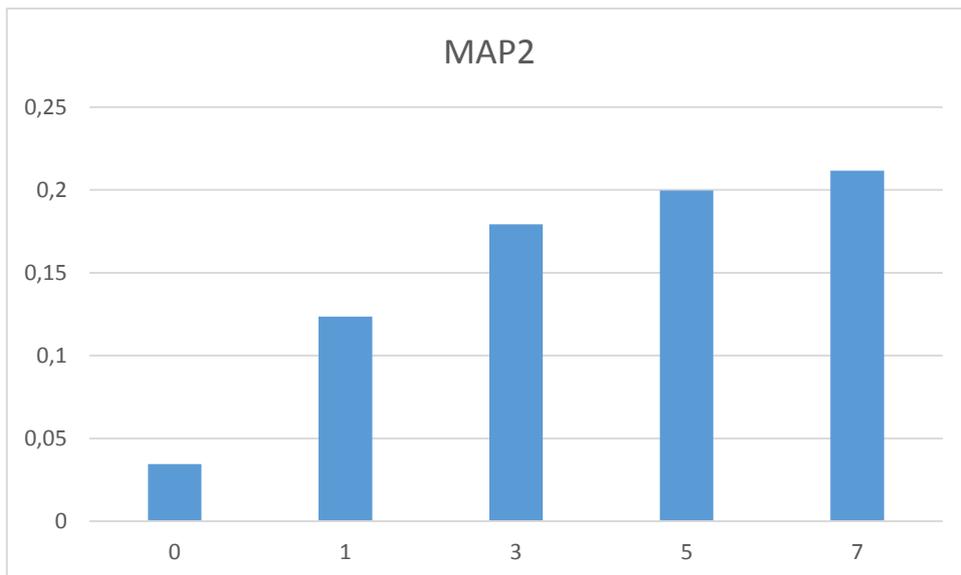
RT-PCR

Tijekom diferencijacije THY1 – YFP stanica, razina izražaja Nestina najviša je nultog dana diferencijacije, odnosno u živčanih matičnih stanica. Tijekom prvog dana diferencijacije, razina izražaja Nestina još je uvijek visoka, ali je ipak 40% manja u odnosu na živčane matične stanice. Trećeg dana diferencijacije razina Nestina se očekivano smanjuje i za 20% je manja nego prvog dana diferencijacije. Tijekom petog dana diferencijacije razina Nestina je gotovo na istoj razini kao i trećeg dana. Sedmog dana diferencijacije razina Nestina izrazito se smanjuje i čini svega 2,5% početne vrijednosti Nestina izražene u živčanim matičnim stanicama. Budući da je Nestin karakterističan za matične stanice, razina izražaja Nestina naglo se smanjuje tijekom diferencijacije stanica, no ipak mali dio stanica ostaje Nestin pozitivan, odnosno zadržava se u tzv. „matičnom“ obliku (Grafikon 2.).

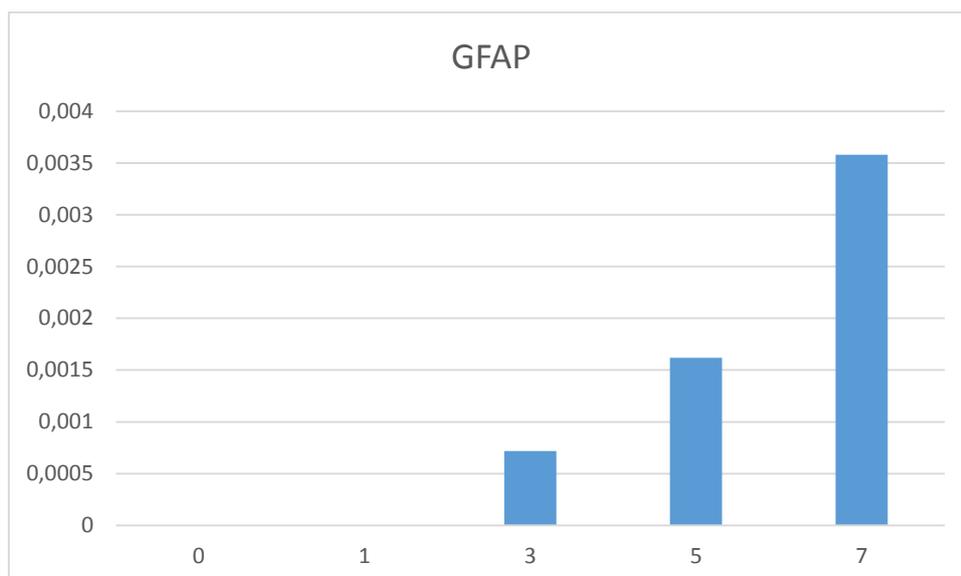


Grafikon 2. Izražaj Nestina tijekom diferencijacije stanica. Izražaj je najjači tijekom nultog dana diferencijacije odnosno u živčanim matičnim stanicama. Sazrijevanjem stanica dolazi do smanjivanja izražaja Nestina. Legenda: na X osi prikazana je razina izražaja Nestina, a na Y osi prikazane su vremenske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

Razina izražaja MAP2, tipičnog biljega neurona izrazito se povećava tijekom diferencijacije stanica. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da tijekom nultog dana 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 sedmog dana 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. dana iznosi 90% od ukupnog broja stanica u staničnoj kulturi (Grafikon 3.). Za razliku od tipičnog biljega neurona, izražaj biljega astrocita (GFAP) javlja se tek 3. dana diferencijacije stanica i iznosi 20% od maksimalnog izražaja koji se javlja sedmog dana diferencijacije stanica (Grafikon 4.). Izrazito mala razina izražaja biljega astrocita je i očekivana budući da su podloge i medij u kojem se uzgajaju stanice usmjerene ka uzgoju neurona.

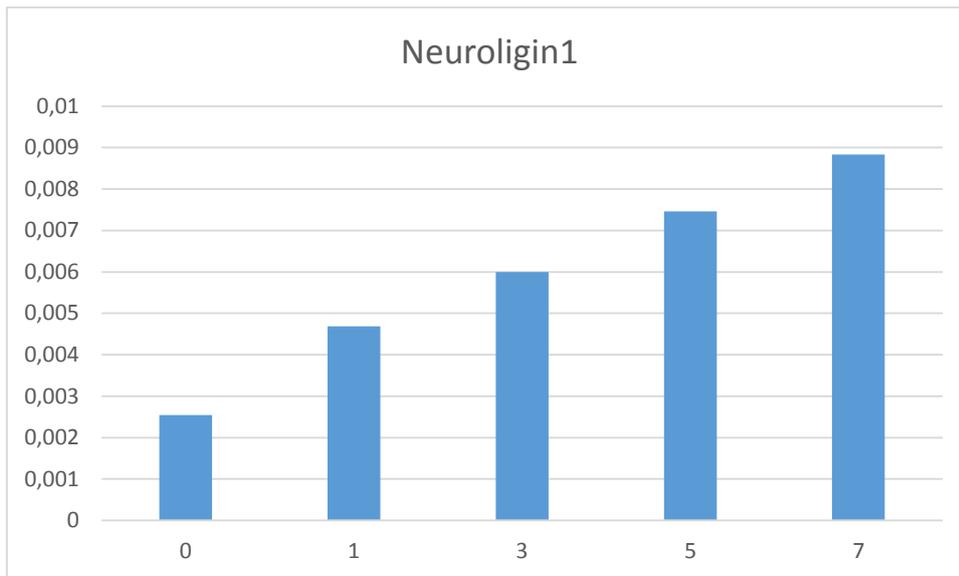


Grafikon 3. Izražaj MAP2 tijekom diferencijacije stanica. Tijekom nultog dana diferencijacije mali postotak stanica izražava MAP2, a razina izražaja raste tijekom diferencijacije budući da je MAP2 tipični biljeg neurona. Legenda: na X osi prikazana je razina izražaja MAP2, a na Y osi prikazane su vremenske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

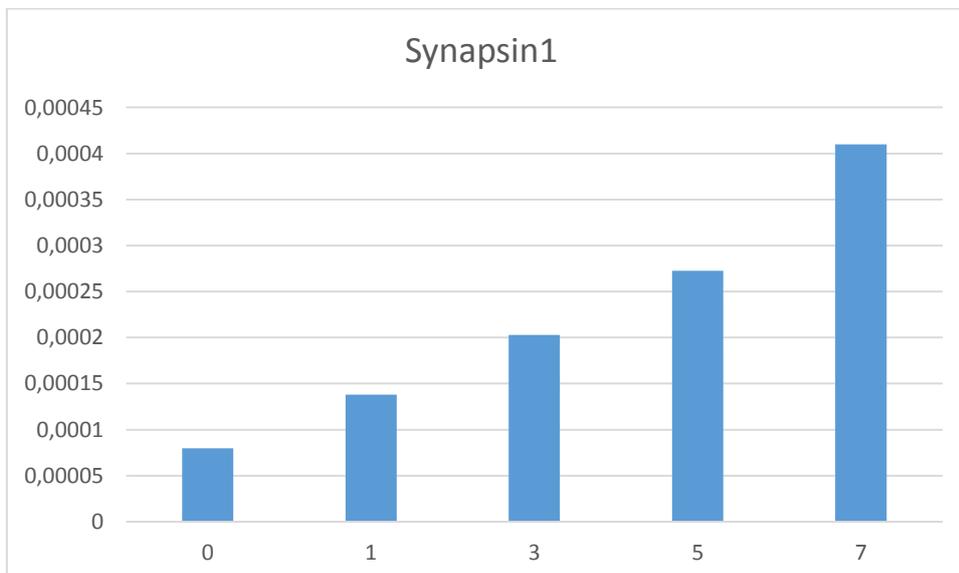


Grafikon 4. Izražaj GFAP-a tijekom diferencijacije stanica. Tijekom nultog i prvog dana diferencijacije nema izražaja GFAP-a. U izrazito malom postotku stanice izražavaju GFAP tijekom trećeg dana, da bi do kraja diferencijacije razina izražaja porasla do svega 3%. Legenda: na X osi prikazana je razina izražaja GFAP-a, a na Y osi 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 dva sinaptička biljega. Izražaj Neuroligina1 javlja se tijekom nultog dana i znatno se pojačava tijekom sedam dana diferencijacije. Razina Neuroligina1 od nultog dana do sedmog dana diferencijacije povećava se za 70%, što upućuje na izrazitu sinaptičku aktivnost stanica tijekom diferencijacije (Grafikon 5.). Izražaj Synapsina1 također se javlja nultog dana diferencijacije i povećava se za 70% tijekom procesa diferencijacije (Grafikon 6.). Na grafikonima 5. i 6. jasno je vidljiv značajan porast izražaja oba sinaptička biljega, ali je razina izražaja Neuroligina1 kao post-sinaptičkog biljega izrazito veća u odnosu na Synapsin1 koji je pre-sinaptički biljeg.



Grafikon 5. Izražaj Neurologin1 tijekom diferencijacije stanica. Razina izražaja tijekom diferencijacije stanice povećava se za 70% od nultog dana diferencijacije. Legenda: na X osi prikazana je razina izražaja Neurologin1, a na Y osi prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica (0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije).



Grafikon 6. Izražaj Synapsin1 tijekom diferencijacije stanica. Razina izražaja tijekom diferencijacije stanice povećava se za 70% od nultog dana diferencijacije. Legenda: na X osi prikazana je razina izražaja Synapsin1, a na Y osi prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica (0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije).

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 obojane specifičnim protutijelima za matične stanice (Nestin), za neurone (MAP2) i za astrocite (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 prebrojanih stanica 99% stanica je Nestin pozitivno (Slika 1A-C). Svega 1% stanica je MAP2 pozitivno, i pokazuje kolokalizaciju s Nestin pozitivnim stanicama.

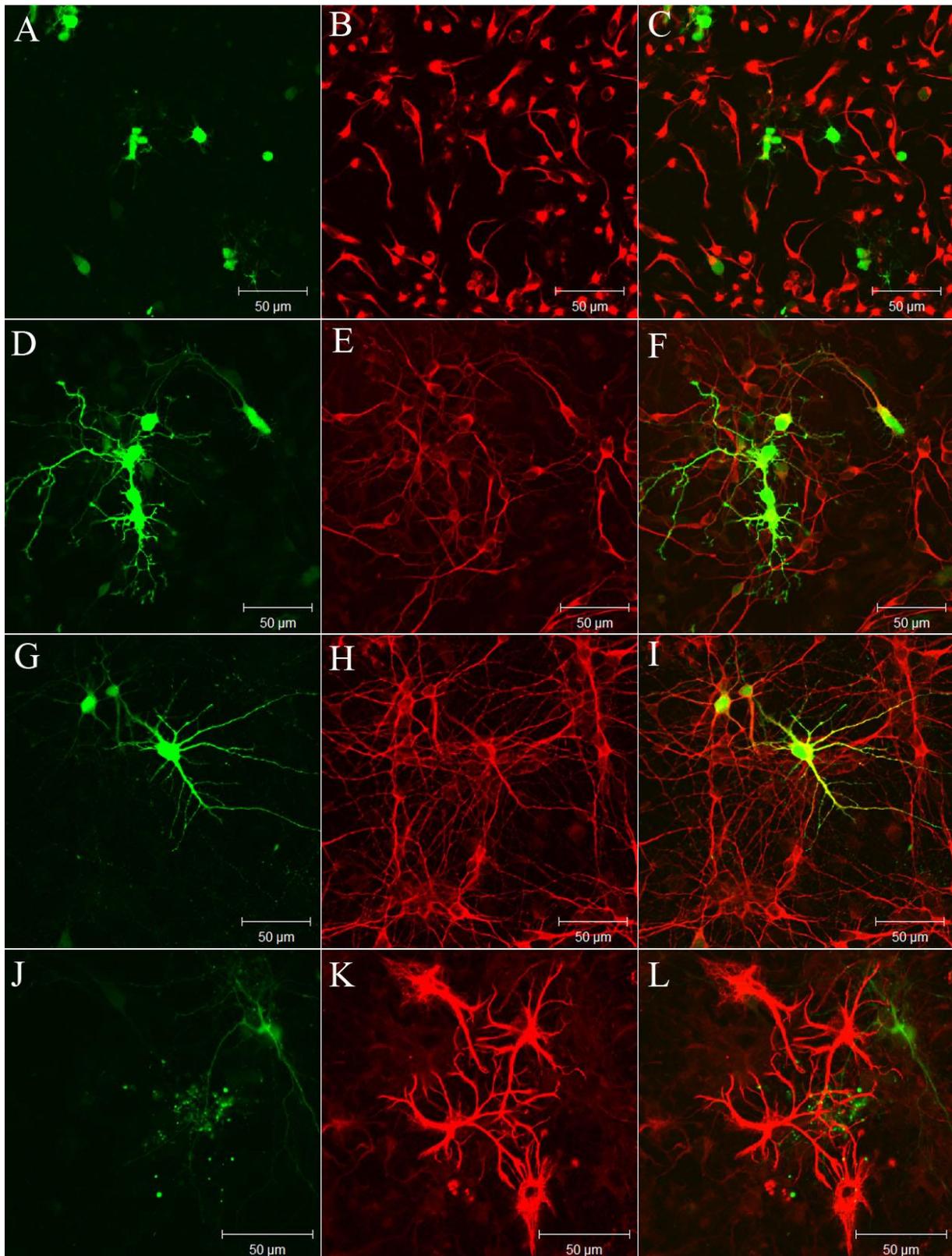
Tijekom prvog dana diferencijacije stanica, 80% stanica je Nestin pozitivno, a udio MAP2 pozitivnih stanica se povećava na 20%. Kako je bilo i očekivano, niti jedna stanica nije GFAP pozitivna.

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 (Slika 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.



Slika 1. Imunocitokemija THY1 – YFP stanica (zeleno) tijekom diferencijacije. Na slici A-C prikazano je bojenje Nestinom (crveno) nultog dana diferencijacije; D-E prikazano je bojanje s MAP2 (crveno) trećeg dana diferencijacije; G-I prikazano je bojanje s MAP2 (crveno) sedmog dana diferencijacije te na slici J-L bojanje s GFAP-om (crveno) sedmog dana diferencijacije.

5. RASPRAVA

Na živčanim matičnim stanicama određena je analiza izražaja gena tijekom diferencijacije stanica u pet vremenskih točaka (0., 1, 3., 5. i 7. dan diferencijacije). Svi uzorci rađeni su u triplicatu 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 (Neuroigin1 i Synapsin1). Rezultati izražaja gena uspoređeni su sa rezultatima imunocitokemije te s podacima iz literature.

Izražaj Nestina izrazito je visok tijekom nultog dana diferencijacije odnosno u živčanih matičnih stanica koje još nisu krenule u diferencijaciju. Visoki izražaj je i očekivan budući da se radi o visoko specifičnom 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 nalaz u potpunosti se slaže i s istraživanjem LENDAHL i suradnika (1990.) prema kojem je Nestin tipičan biljeg progenitornih stanica živčanog sustava bilo da se radi o neuronima ili glija-stanicama. Tijekom diferencijacije razina Nestina značajno se smanjuje sa sazrijevanjem kulture, budući da zrele stanice nisu Nestin pozitivne. Rezultati RT-PCR-a u potpunosti se podudaraju sa rezultatima imunocitokemije. Međutim, vidljiva je razlika trećeg i petog dana diferencijacije gdje se na RT-PCR-u očituje ista razina izražaja dok imunocitokemijski dolazi do značajnog pada sa 30 na 15%. Ovakav nalaz objašnjava se prerastanjem nastavaka diferenciranih stanica uslijed čega nije moguće prebrojati sve nediferencirane stanice.

Izražaj MAP2 vidljiv je već u živčanih matičnih stanica i iznosi 16,6% od vrijednosti koju stanice izražavaju sedmog dana diferencijacije kao zreli neuroni. Ovakav nalaz odgovara i nalazu imunocitokemije što je prikazano na Slici 1A-C gdje se jasno vide THY1 – YFP pozitivne (zelene) 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 biljege neurona. Stanice koje su THY1 – YFP pozitivne su zreliji oblici matičnih stanica i više nisu Nestin pozitivne. Prema istraživanju CORTI i sur. (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 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 petog dana diferencijacije i to u svega 1% prebrojanih stanica, a udio im se sedmog dana povećava do 3%. Mali postotak astrocita može se objasniti načinom uzgoja koji je prvenstveno usmjeren ka uzgoju neurona. Izražaj GFAP-a trećeg dana diferencijacije opisan pomoću RT-PCR-a nam govori da je dio stanica predodređen da postanu astrociti te se „pripremaju“ u diferencijaciju. Međutim, 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 javlja tek postanatalno, prethode različiti oblici astro-glije koji se mogu detektirati visoko specifičnim protutijelima poput tenascina-C koji je pozitivan prije GFAP-a. Osim toga, na Slici 1. jasno je vidljivo da nema kolokalizacije između GFAP pozitivnih stanica i THY1 – YFP koji je specifičan za neurone što se slaže s drugim istraživanjima FENG i sur. (2000.) te CORTI i sur. (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 neophodno za normalnu diferencijaciju. U ovom radu korištena su dva sinaptička biljega, Neuroligin1, koji je post-sinaptički, i Synapsin1, koji je pre-sinaptički biljeg. Rezultati ovoga istraživanja pokazuju da se oba biljega tijekom diferencijacije povećavaju za 70% od početne vrijednosti. Međutim, razina izražaja Neuroligina1 je izrazito veća od razine Synapsina1, što upućuje na veću važnost ovog biljega tijekom same diferencijacije stanica. Ovaj nalaz odgovara nalazu BEMBEN i sur. (2014.) i potvrđuje veliku važnost Neuroligina1 kao adhezijske molekule tijekom neurogeneze. S druge strane, Synapsin1 je važan za razvoj aksona i samu diferencijaciju stanice pa je porast također očit tijekom diferencijacije (HEDEGAARD i sur., 2013.).

6. ZAKLJUČCI

1. Izražaj Nestina najveći je u živčanih matičnih stanica i znatno se smanjuje do kraja diferencijacije stanica što je utvrđeno i imunocitokemijom.
2. Izražaj MAP2 javlja se u živčanih matičnih stanica, te naglo raste do kraja diferencijacije stanica u neurone, što je u skladu s rezultatima imunocitokemije.
3. Izražaj GFAP-a javlja se trećeg dana diferencijacije, ali imunocitokemijski je vidljiv tek petog dana što upućuje na to da su trećeg dana pojedine stanice predodređene da postanu astrociti, ali još uvijek nisu pozitivne na GFAP protutijelo.
4. Oba sinaptička biljega pozitivna su u živčanih matičnih stanica i razina izražaja povećava se za 70% od početne vrijednosti, pri čemu je razina izražaja znatno jača kod Neurologinal u odnosu na Synapsin1.

7. ZAHVALA

Zahvaljujem se prije svega mentoru dr. sc. Ivanu Aliću na ideji, vodstvu i potpori koju je pružao tijekom čitave izrade ovog rada. Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Dinku Mitrečiću, voditelju Laboratorija za matične stanice pri Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. Ovo istraživanje napravljeno je u sklopu projekta „YoungBrain (EU-ESF)” čiji je voditelj doc. dr. sc. Dinko Mitrečić. Zahvaljujem se i djelatnicima Veterinarskog i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji su na bilo koji način pridonijeli izradi ovoga rada.

8. POPIS LITERATURE

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 neuroligin-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.

LEND AHL, 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. POCHE (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 KOOY (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. CAMBBRAY-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.

9. SAŽETAK

Analiza izražaja gena tijekom *in vitro* diferencijacije neurona

Ante Stojanac

Analiza izražaja gena napravljena je tijekom *in vitro* diferencijacije živčanih matičnih stanica 0., 1., 3., 5. i 7. dana diferencijacije. U ovom istraživanju napravljena je analiza izražaja gena karakterističnih za živčane matične stanice (Nestin), neurone (MAP2), astrocite (GFAP) te za dva sinaptička biljega (Neurologin1 i Synapsin1) pomoću RT-PCR-a. Rezultati RT-PCR-a uspoređeni su sa rezultatima imunocitokemije. Razina izražaja Nestina najveća je tijekom nultog dana diferencijacije i nakon toga smanjuje se tijekom diferencijacije stanica. Međutim, dio stanica ostaje u nediferenciranom obliku, i čini 2,5% početne razine Nestina. Stanice, MAP2 izražavaju već nultog dana diferencijacije na razini 16,6% od maksimalnog izražaja koji se javlja sedmog dana diferencijacije. Izražaj GFAP-a javlja se trećeg dana diferencijacije i postupno raste do sedmog dana. Imunocitokemijski GFAP pozitivne stanice vidljive su tek petog dana u 1% prebrojanih stanica. Oba sinaptička biljega pozitivna su već nultog dana diferencijacije i razina njihovog izražaja postupno se povećava za 70% od početne vrijednosti, pri čemu je razina Neurologina1 jača u odnosu na Synapsin1.

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

10. SUMMARY

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

Ante Stojanac

Analysis of genes expression during *in vitro* differentiation of neural stem cells 0, 1, 3, 5 and 7 days of differentiation were made. In this study expression of genes typical for neural stem cells (Nestin), neurons (MAP2), astrocytes (GFAP) and two synaptic markers (Neurologin1 and Synapsin1) were analysed using RT-PCR. Results of RT-PCR were compared with the results of immunocytochemistry. The Nestin expression was highest during zero day of differentiation and then decreased with cell differentiation. Some cells remained undifferentiated, and accounted 2.5% of the initial Nestin expression. MAP2 expression on the 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 positive already at day zero of differentiation and their expression gradually increased to 70% of the initial value; Neurologin1 expression was stronger than Synapsin1 expression.

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

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

- Datum rođenja: 16. lipnja 1992.
- Mjesto rođenja: Slavonski Brod, Hrvatska
- Nacionalnost: Hrvat
- Adresa: Gornja Vrba, Braće Radić 39, 35 000 Slavonski Brod
- Telefon: 097/ 616 70 98
- E-mail: stojanacante@gmail.com

Školovanje:

- 1999. – 2003. - Osnovna škola „Vladimir Nazor“, Gornja Vrba
- 2003. – 2007. - Osnovna škola „Vladimir Nazor“, Slavonski Brod
- 2007. – 2011. – „Klasična gimnazija fra Marijana Lanosovića“ s pravom javnosti, Slavonski Brod
- 2011. – danas – Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Aktivnosti tijekom studija:

- Član IVSA Hrvatska (International Veterinary Students Association)
- Sudjelovanja na kongresima:
 1. XXIX EAVA Congress – Stara Zagora, Bugarska
 2. 7th Meeting of the Young Generation of Veterinary Anatomists – Leipzig, Njemačka
 3. 8th Meeting of the Young Generation of Veterinary Anatomists – Poznan, Poljska
 4. The 6th International Congress „Veterinary Science and Profession“

Izvanfakultetske aktivnosti:

- Uzgoj sportskih konja
- Rekreativno – jahanje, nogomet i atletika
- Strani jezik: engleski aktivno