

XXXI. OTDK

Biológia szekció

Hogyan állítsunk elő elektronmikroszkóppal is egyedileg vizsgálható gliasejteket?

Barti Benjámin

III. évfolyamos biológus BSc. hallgató

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék

Témavezető: Kis Viktor

Tanszékvezető: Dr. Löw Péter

Kutatócsoport vezető: Prof. Sass Miklós



2013

Tartalomjegyzék

Absztrakt.....	2
Abstract	3
Bevezetés	4
Gliasejtek az idegrendszerben	4
Egyedileg jelölt sejtek az idegrendszerben.....	5
A modell szervezet bemutatása.....	8
A Gal4-UAS rendszer és a klonális rendszer	11
Célkitűzések	14
Anyagok és módszerek.....	14
A kísérletben felhasznált transzgénikus törzsek és származási helyeik	14
Mintagyűjtés és a minták kezelése.....	15
Elektronmikroszkópos előkészítés	15
Eredmények és értékelésük	17
Fénymikroszkópos vizsgálatok.....	17
Elektronmikroszkópos vizsgálatok	19
Összefoglalás	22
Irodalomjegyzék	25
Köszönetnyilvánítás	28
Függelék	29
Nyilatkozat a szerzői hozzájárulásról.....	30

Absztrakt

Az idegrendszert két fő sejtípus építi fel: a sokat tanulmányozott idegsejtek, valamint a gliasejtek. Az érdeklődés középpontjában jelentőségüknek és speciális funkciójuknak köszönhetően hosszú idő óta az idegsejtek állnak. A közelmúlt kutatási eredményei alapján azonban bebizonyosodott, hogy a gliasejtek sem csupán az idegrendszer passzív résztvevői, meghatározó szerepük van annak működésében is. Részt vesznek a neuronok által termelt metabolitok reciklizációjában, a szinapszisok működésének szabályozásában, a vér-agy gát kialakításával pedig az idegrendszer védelmében.

Valószínű azonban, hogy korántsem ismert még a gliasejtek összes funkciója, sőt, előfordulhatnak eddig le sem írt gliatípusok is. Funkciójuk megismeréséhez nélkülözhetetlen, hogy tisztában legyünk ezen sejtek finomszerkezetével, ezért kutatásaink fókuszában egyedi gliasejtek elektronmikroszkópos vizsgálata állt. Modellállatnak az ecetmuslicát (*Drosophila melanogaster*) használtuk, mivel a törzsek kis helyen fenntarthatóak, fejlődésük gyors, idegrendszerük felépítése és génállományuk pedig az emberivel nagyfokú hasonlóságot mutat. Ebből kifolyólag a muslicából nyert információknak humán vonatkozásai is vannak.

Kísérletünkben többlépéses keresztezés-sorozattal létrehoztunk egy olyan transzgénikus muslicatörzset, melynek egyes gliasejtjeiben membránspecifikus torna-peroxidáz enzim fejeződik ki. Ezen állatok agyát kiboncoltam, lefixáltam, majd DAB-reakcióval a sejteket előhívtam. Az előhívást követően az egyedi gliasejtek teljes nyúlványrendszere láthatóvá vált. A mintákat műgyantába ágyaztam, ultravékony metszeteket készítettem belőlük, melyeket ezután elektronmikroszkópban vizsgáltunk. A minták az elektronmikroszkópban jó megtartásúnak bizonyultak. Mind az egyes sejtalkotók, mind az egyedi gliasejtek DAB-pozitív membránja könnyű szerrel azonosítható volt. Legjobb tudásunk szerint ez az első genetikai módszer mellyel fény- és elektronmikroszkóppal is vizsgálható gliasejtek hpzhatók létre.

Abstract

The nervous system consists of two major cell types: neurons and glial cells. For a long time neurons stood in the center of interest for their important roles and special functions. In the past few years numerous researches had shown that beside the neurons, glial cells also have a significant role in the operation of the nervous system. These cells do not only fill the space between nerv cells as it was thought before but they also participate in the recyclization of the metabolits made by neurons. They regulate the synaptic neurotransmission between neurons and with the configuration of the blood-brain barrier they defend the whole nervous system from mechanical or molecular impacts.

However, it seems that there are still a lot of unknown functions and procedures, controlled by glial cells, even undiscovered glial subtypes may exist. For the proper investigation of these functions it is necessary to have a clear vision of the ultrastructure of these cells. Therefore we performed an electronmicroscopical examination of single-labeled glial cells. We used fruit-flies as a model organism.

In this experiment we created a transgenic line where some glial cells are single-labeled in the nervous system. Those cells expresses a membrane-specific form of the horseradish-peroxidase enzyme. The brain of those animals were dissected, fixed and the marked cells were developed with DAB-reaction. After the reaction, the whole cell membrane with its projections became visible and could be easily recognised. The samples were embedded in Durcupan epoxy resin and were cut into ultra-thin sections. After that, the complete sections were studied under electron microscope. To our first knowledge this is the first genetic method to label glial cells directly for electron microscopic examination.

Bevezetés

Gliasejtek az idegrendszerben

Az élő szervezetek számára nélkülözhetetlen, hogy képesek legyenek a külvilágból és saját belső környezetükből érkező hatásokat, ingereket felfogni, feldolgozni majd azokra, reagálni. Már az egysejtű szervezeteknél is megfigyelhetünk különböző jelzőmolekulákkal működő, fény vagy kémiai ingerekre reagáló ingerületvezető rendszert [Wolfe, 2000]. Azonban minél komplexebb élőlényről beszélünk, az ingerületvezető rendszer felépítésének is annál komplexebbé kellett válnia, hogy el tudja látni a helyzetváltoztatások kivitelezését, a veszély vagy táplálék mozgásának észlelését, vagyis a válaszreakció kiváltását. A válaszreakció lehet egy mirigy működése vagy egy izomtónus kontrakciója, relaxációja. Ezek a folyamatok az idegrendszer működésén keresztül valósulnak meg.

Az idegrendszerben az ingerületvezetést speciális sejtek, az idegsejtek, neuronok végzik. Annak érdekében, hogy ezen sejtek képesek legyenek létrehozni egy ilyen felettébb bonyolult és csodálatos, összetetten működő szabályzórendszert, olyan mértékű specializációra volt szükségük mind morfológiájukban, mind funkcióik tekintetében, hogy emellett képtelenek lettek volna ellátni néhány egyéb, a sejtek életében alapvető fontossággal bíró biokémiai folyamatot. A neuronok hatékony ingerületvezetésében, védelmében, a tápanyagok metabolizálásában és a biológiai létfenntartó folyamatok során keletkezett melléktermékek eltávolításában a gliasejtek nélkülözhetetlen támogatást nyújtanak.

Általános jellemző, hogy az idegrendszer tanulmányozása folyamán a kutatók szemében a főszerep jellemzően mindig az idegsejteké volt, így a gliasejtek valódi jelentősége sokáig ismeretlen maradt. Az elmúlt pár évtized kutatásai kezdtek csak komolyabb hangsúlyt fektetni ezen sejtek megismerésére, azonban még mindig sok a megválaszolatlan kérdés a témában. Pontosan hogyan vesz részt a glia a szinapszisok működésének szabályozásában? Vajon gátló és serkentő szinapszisoknál is hasonlóan funkcionál a glia? Mi a gliasejtek szerepe a neurodegenerációs betegségekben? Ezen kérdések megválaszolása további vizsgálatokat igényel.

Egyedileg jelölt sejtek az idegrendszerben

A neuroanatómiai-neurofiziológiai vizsgálatok lényege, hogy megértsük egyes idegsejtek, agyterületek, működését, ezen keresztül pedig magát az idegrendszert. Ennek egy módja, ha megvizsgáljuk az egyes agyterületek alkotóelemeit, azokat az egységeket, amikből felépülnek. Ha ettől a szinttől fokozatosan haladunk az egyes agyterületeket összekötő hálózatok felé, egy logikus rendszert építhetünk fel az elsőre kaotikusnak tűnő kép helyett. Az élő organizmusok biológiailag legkisebb szerkezeti és funkcionális építőeleme a sejt. Az idegsejtek azonban az agyszövetben egy olyan kompakt rendszert alkotnak, amiben képtelenség precízen eligazodni. Szükséges tehát, hogy egyedi sejteket, s azok nyúlványrendszerét láthatóvá tegyünk.

Az ilyen vizsgálatok egyik nagy úttörője Camillo Golgi volt. Bár neve a legtöbbeknek az általa felfedezett Golgi apparátusról ismerős, ő volt az, aki elsőként sikeresen megfestett egy egyedi idegsejtet egy szöveten belül. A Golgi festés lényege az volt, hogy káliumdikromát oldatba tett agydarabokat, majd átitatta őket ezüst-nitráttal. Az eredmény ezüst-kromát csapadék kiválása lett, ami valamilyen (máig ismeretlen) oknál fogva véletlenszerűen festi meg az idegsejtek 1-5%-át [1. ábra/A, Mazzarello és mtsai, 2009]. Golgi a kisagyban róla elnevezett sejteket is ezzel a módszerrel fedezte fel. Ez a még ma is használatos módszer valóságos tudományos forradalomhoz vezetett az idegkutatásban. Az 1970-es évekre Golgi módszere már addig fejlődött, hogy képesek voltak vele elektronmikroszkópban is megjelölni egyedi idegsejteket, ezáltal vizsgálni az általuk kialakított szinaptikus kapcsolatokat [1. ábra/A', Somogyi, 1990].

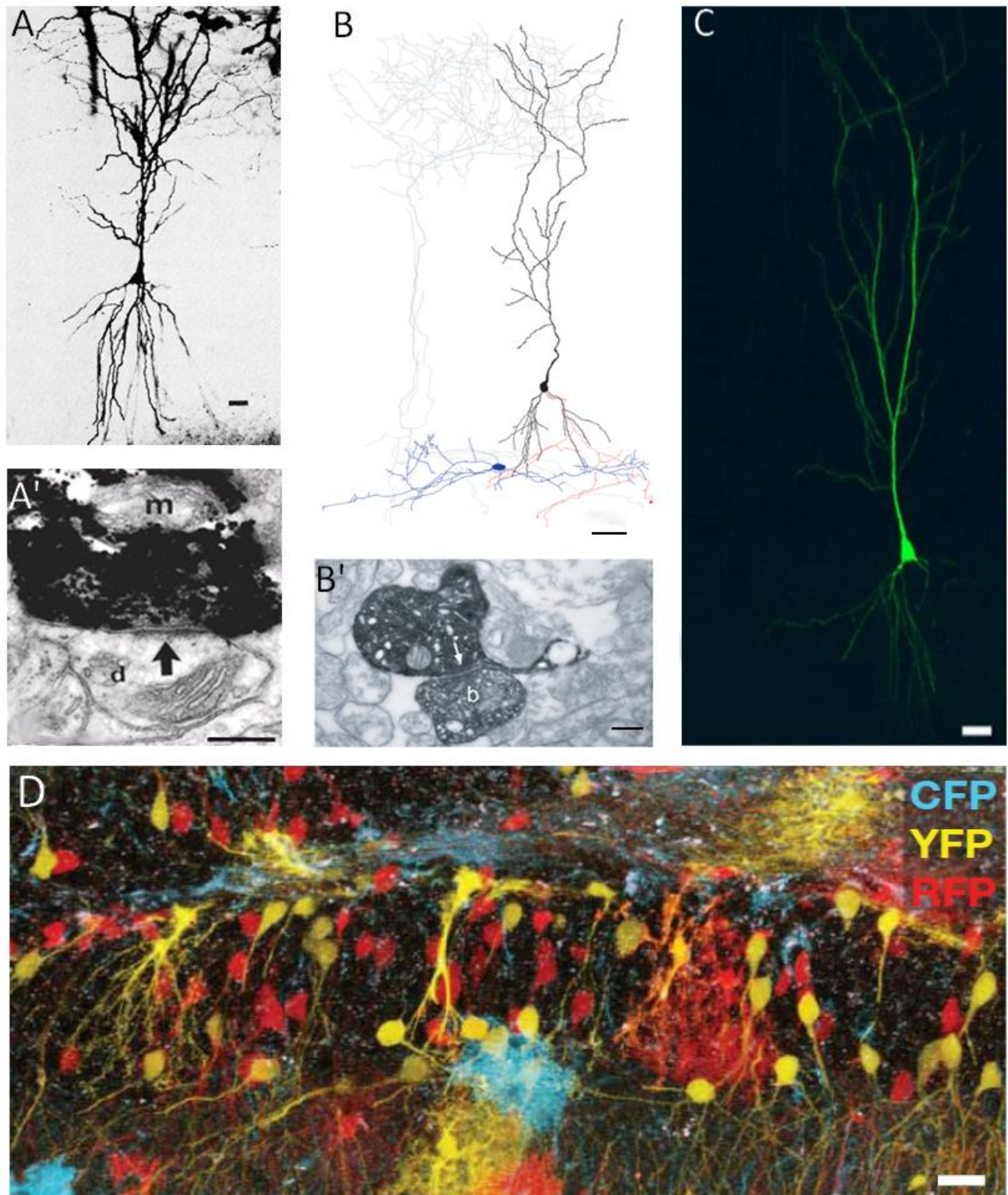
Az egyedi sejtek jelölésének másik módja, ha egy üvegapilláris segítségével lyukat ütünk a sejtek membránján, és ezen keresztül különböző biológiai jelzőmolekulát (biocitin, neurobiotin) juttatunk a sejt citoplazmájába, majd ezeket a jelzőmolekulákat, megjelöljük és DAB-reakcióval előhívjuk [Ágota és mtsai, 2005]. A reakció következtében az egész sejt kijelölődik, ezzel egyedileg azonosítható lesz. A módszerrel jól lehet vizsgálni például, hogy az általunk kiválasztott egy- vagy több sejt között fennáll-e szinaptikus kapcsolat [1. ábra/B-B']. Az elmúlt évtizedekben már biofizikai, élettani mérésekkel is megvalósítható volt egyes idegsejttípusok karakterizálása (*in vivo*) az alapján, hogy milyen gyakorisággal, milyen intenzitással tüzelnek [Freund és Buzsaki, 1996], sőt, a patkány hippocampusban a sejtek tüzelése és szinaptikus partnereik vizsgálata alapján tizenkét darab piramissejtet beidegző és négy egyéb, más interneuronokkal kapcsolatba lépő interneuront határoztak meg [Somogyi és Klausberger, 2005]. Napjainkban ez a szám már 20 felett van. Ezen sejtek funkciójának

megismerésében nélkülözhetetlen, hogy tüzelési mintázatuk mellett tisztában legyünk a sejtek morfológiájával, neurokémijával és szinaptikus kapcsolataival is.

A sejtek egyedi jelölését genetikai oldalról is megközelíthetjük. Olyan transzgenikus állattörzsek létrehozásával, amelyekben a zöld fluorescens protein (GFP), csak bizonyos idegsejtekben fejeződik ki, a jelölt sejtek nyúlványrendszere jól vizsgálható konfokális mikroszkóppal [1. ábra/C, Feng és mtsai, 2000]. Ha ezt az eljárást kombináljuk az immunhisztokémia módszereivel és GFP-felismerő antitesttel aranszemcséket kötünk a sejtekhez, mintánk láthatóvá tehető az elektronmikroszkópban is.

Egy a közelmúltban felfedezett módszer még jobban kibővítette a genetikai sejtjelöléses eljárások eszköztárát. Az úgynevezett Brainbow rendszerben lehetőségünk van rá, hogy egy mintán belül egyszerre jelöljünk több különböző neuront és gliasejtet, egymástól egyedileg megkülönböztethetően. Szintén ezen transzgenikus állatok keresztezésével megvalósítható, hogy egy sejtben több különböző színű fluorescens fehérje is aktiválódjon, melyek együttesen színárnyalatok tucatjait képesek létrehozni [1. ábra/D, Livet és mtsai, 2007]. A Golgi festés csupán az idegsejtek kis százalékában tűnik elő, ez pedig jelentős korlátot jelentett, ha statisztikai, kvantitatív információkat is le akartunk vonni a jelölt sejtekről. A Brainbow rendszerben nagyszámban jelölődnek sejtek, az optikai mikroszkóp felbontása pedig lehetővé teszi, hogy ezek között képesek legyünk különbséget tenni. Ugyanakkor szintén a mikroszkóp felbontása szab határt a precíz vizsgálatoknak is, hiszen a neurális hálózatokról jó képet kapunk, a szinaptikus kapcsolatok, valamint azok finomszerkezete (pl.: egyetlen szinapszison belül az aktív zónák száma s elrendeződése) nem látszik kielégítően.

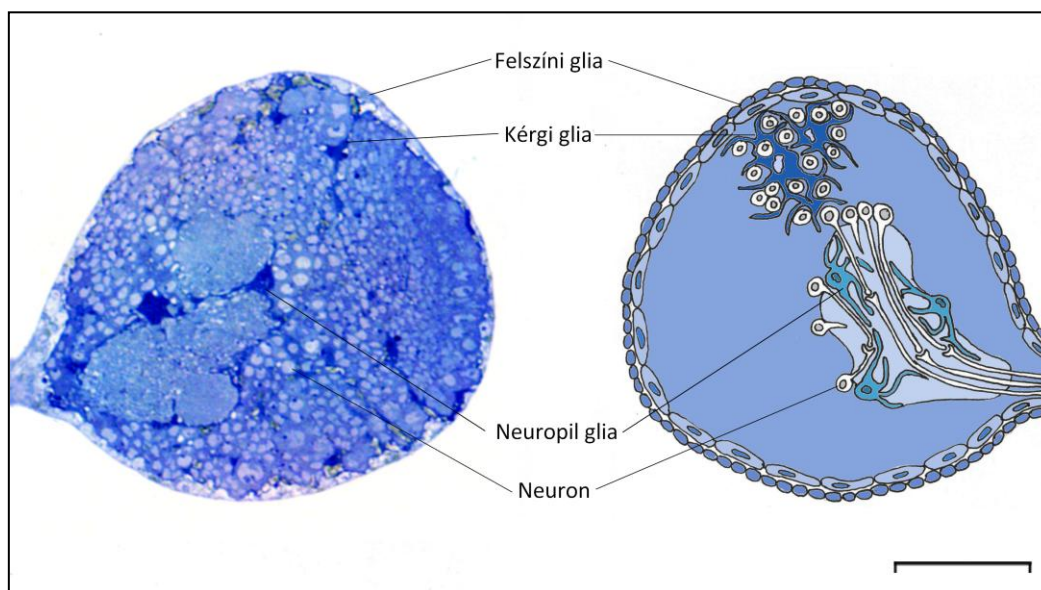
A felsoroltak tükrében könnyen beláthatjuk, hogy az egyedi sejtek *in vivo* morfo-funkcionális vizsgálata fontos részét képezi az agykutatásnak, s az ilyen jellegű vizsgálatok a mai napig is nagy jelentőséggel bírnak. Szembetűnő az is, hogy bár a gliasejtek roppant fontos szerepet játszanak az idegrendszer működésében, aránytalanul kevés ilyen tanulmány foglalkozik velük. Ez részben az idegsejtekre fektetett nagy hangsúly, részben pedig a kísérleti rendszerek hiányának tudható be.



1. ábra – Agyszöveten belül egyedi piramissejteket jelölő kísérleti módszerek. **A.** – Golgi impregnáció. **A'.** – elektronmikroszkópos felvétel egy Golgi festéssel jelölt- és egy jelöletlen sejt közti serkentő szinapszistról (fekete nyíl). m: mitokondrium, d: dendrit. (hippocampus; A: Harris és mtsai, 1980, A': Somogyi 1990). **B.** – biológiai jelzőmolekulával való intracelluláris sejteltöltés. **B'.** – elektronmikroszkópos felvétel két feltöltött idegsejt közti szinapszistról (fehér nyíl). b: bouton. (hippocampus; Bíró és mtsai, 2005). **C.** – transzgenikus patkánytörzsek alkalmazásával genetikai úton történő sejtjelölés (Patkány hippocampus; Young és mtsai, 2008). **D.** – Brainbow rendszer által fluorescens proteinekkal jelölt neuronok és asztrociták egér hippocampus gyrus dentatusában (Livet és mtsai, 2007). Skála: A: 10 μm , A': 0,2 μm , B: 50 μm , B': 0,2 μm , C: 20 μm , D: 20 μm .

A modell szervezet bemutatása

Az elmúlt évtizedekben felderítették, hogy a rovarok és az emlősök génállományában sok biokémiai folyamat molekuláris szabályozása azonos úton megy végbe (pl.: sejtek közötti kommunikáció, szinapszisok szerkezete, génexpresszió szabályozása, sejtes önemésztő folyamatok, stb). Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) ezen felfedezések következtében vált előszeretettel alkalmazott modell szervezetté. A muslicának 2002. óta ismert a DNS állománya, azt is tudjuk, hogy nagyjából 14000 gént tartalmaz, a géncsaládok száma pedig nagyjából azonos az emberivel. Ebből kifolyólag nem meglepő az sem, hogy a muslicában jelen van az emberi örökletes betegségekkel kapcsolatos gének homológjainak háromnegyede [Bier, 2005]. Népszerűségét tovább növeli, hogy az állatok kis helyen, könnyen és olcsón fenntarthatóak, egy generáció kifejlődéséhez csak két hétre van szükség, és számos mutáns törzs áll a kutatók rendelkezésére. A *Drosophila* idegrendszerének szerkezete, felépítése és működési mechanizmusa is nagyon hasonló az emlősökéhez. Ez okból választottuk mi is ezt a szervezetet a vizsgálatainkhoz. Megkönnyíti a kutatásunkat az a tény is, hogy a muslicában sokkal kevesebb sejtípus található az idegrendszerben, mint az emlősökben [2. ábra]. A másik dolog, ami nagyon ütőképes vizsgálati alannyá teszi ezt a rendszert, az az, hogy transzgénikus muslicatörzsek is ezzel állnak a kutatók rendelkezésére. Az ilyen típusú genetikai módszerek lehetőségek tárházát nyitják meg előttünk az idegkutatásban.



2. ábra – Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) agydúcában található főbb gliatípusok. Toluidin kézzel festett fél agydúc és az agydúc alapján a szerző által készített sematikus ábra. Skála: 150 μ m.

Ugyancsak a közelmúlt kutatási eredményeiből állapíthatjuk meg azt is, hogy modellszervezetünk az ecetmuslica központi idegrendszerében lévő gliasejttípusok meglepően sok hasonlóságot mutatnak emlős megfelelőikkel. Az alábbiakban néhány olyan példát olvashatunk, amelyek ezeket a hasonlóságokat támasztják alá.

Emlősökben a gliasejteket főleg morfológiájuk alapján négy nagyobb csoportba oszthatjuk [Kettenmann és Ransom, 2005]. A központi idegrendszerben az idegsejtek közvetlen támogatását a nagy, csillag alakú asztrociták végzik. Az oligodendrociták a neuronok axonjait borítják, kialakítva ezzel a myelin-hüvelyt, ami szeparálja egymástól a nyúlványokat, védi azokat és az akciós potenciál terjedését segíti bennük. A mikroglia az immunsejtek funkcióit látja el, szerepe van az elpusztult neuronok bekebelezésében/eltávolításában. A negyedik típus, a Schwann-sejtek a perifériás idegrendszerben borítják az axonokat. Meg kell említenünk továbbá az agykamrákat és a gerincvelő központi csatornáját bélelő ependyma sejteket, amelyek egy sejtréteget alkotva csillózatukkal segítik a liquor áramlását, valamint a perifériás idegdúcok gliasejtjeit, a szatellita sejteket.

Morfológiai alapon a rovarok idegrendszerének esetében szintén négy fő típust különíthetünk el [Edwards és Meinertzhagen, 2010]. Az agydúcot kívülről a felszíni glia határolja. Ennek nagy szerepe van az idegszövet védelmében, a vér-agy gát kialakításában. Emlősök esetében a központi idegrendszerben az erek falát speciális endotél sejtek borítják, amelyek egymással szoros sejtközi kapcsolatban állnak (tight junction). Ezeket mesodermális eredetű pericyták veszik körül. Végül az eret majdnem teljesen beborítják az asztrociták végtalpacskái, amik felveszik a vérből a glükózt, majd egy részét metabolizálják és továbbítják a neuronoknak [Kettenmann és Ransom, 2005]. A muslicák esetében, mivel nyílt keringésről beszélünk, a tápanyagok felvétele a haemolymphából történik. Az agy felszínét kétrétegű glia borítás veszi körül: a perineuriális és a szubperineuriális gliasejtek, ezek a felszíni glia két alcsoportját alkotják [2. ábra, Stork és mtsai, 2008]. Felépítésük tekintetében a perineuriális gliasejtek szabálytalan alakú, hosszúkás sejtek. Az alattuk fekvő szubperineuriális gliasejtek jóval nagyobb, ellapult sejtek. Egymással szeptális kapcsolatokat alakítanak ki (septate junction) és ezzel alkotják a vér-agy gátat [Ito és mtsai, 1995, Stork és mtsai, 2008]. Felépítését tekintve ezek a struktúrák nagyban eltérnek egymástól, épp ezért sokáig nem is állították párhuzamba a rovarokat e tekintetben az emlősökkel. A közelmúlt kutatási eredményeiből kiderült azonban, hogy ugyanaz a claudin fehérje szabályozza a vér-agy gát sejtkapcsoló struktúráinak áteresztőképességét mind emlősben, mind rovarban

[Daneman és Barres, 2005]. Funkciójukban is könnyen láthatjuk a homológiát, hiszen mindkét típusú barrier meggátolja a molekulák és ionok bediffundálását az idegrendszerbe [Juang és Carlson, 1994, Stork és mtsai, 2008], valamint állandó ionkoncentrációt biztosít az agynak [Gloor és mtsai, 2001, Mayer és mtsai, 2009].

Az agy kérgi részében az idegsejtek közti teret a kérgi glia tölti ki [Pereanu és mtsai, 2005]. Abból kifolyólag, hogy az idegsejtekkel ők állnak a legközelebbi fizikai kapcsolatban, felépítésükben az emlős asztrocitákkal mutatnak hasonlóságot. Az asztrociták egyik legfontosabb feladata a feleslegben maradt neurotranszmitterek felvétele a szinaptikus részből. Ez egyrészt a precíz idegi szabályozás segítése végett fontos, másrészt viszont a túl magas glutamát koncentráció toxikus lehet a neuronok számára (glutamát excitotoxicitás), azok pusztulása pedig neurodegenerációt eredményez [Rothstein és mtsai, 1966]. A gliasejtek által pontosan szabályozhatóvá válik az extracelluláris glutamát szintje. Ennek a folyamatnak a biokémiai mechanizmusa szintén nagyon hasonló emlősökben és rovarokban. Az emlősök esetében az asztrociták közvetlen kapcsolatban állnak a szinaptikus résszel, így ezt a funkciót ezek a sejtek töltik be. Nagy affinitású excitatorikus aminosav transzportereket fejeznek ki, (GLAST és GLT1) amik extracelluláris glutamátot szállítanak a gliasejtekbe [Danbolt, 2001]. A glutamát glutaminná alakul glutamin-szintetáz enzim segítségével [Sibon és mtsai, 2001]. Ezt követően a glutamin visszaszállítódik az idegsejteknek, így azokból szükség szerint újra neurotransmitter képződhet. A muslicák és méhek központi idegrendszerében is hasonló mechanizmus és transzporter (dEAAAT1 – *Drosophila* excitatory amino acid transporter 1) folyamán megy végbe a glutamát reciklizációja [Tsacopoulos és mtsai, 1997, Besson és mtsai, 2000].

A gerincesek oligodendrocitáival funkcióját tekintve a muslica neuropil glia azonosítható. Ez a gliatípus a neuropilemában, a gerinctelenek esetében az agy integratív részében található meg. Az itt helyet foglaló sejtek az axonok nyúlványait borítják és szeparálják, szerepet játszanak azok vezetésében a növekedés során [Jacobs és Goodman, 1989], a szinapszisok működésének szabályozásában, valamint a fel nem használt neurotranszmitterek felvételét a szinaptikus részből is ezek a sejtek végzik [Jackson és Haydon, 2008]. A periférián az idegeket a perifériális glia borítja, motoros és szenzoros rostokat is beleértve, amik az emlős Schwann-sejtekkel azonosíthatók [Auld és mtsai, 1995]. A mikrogliához hasonló sejtek hiányoznak a rovarok idegrendszeréből ám ennek kompenzációjaként itt minden gliasejt képes ennek a funkcióját ellátni, eltávolítani a sérült, elpusztult neuronokat [Sonnenfeld és Jacobs, 1995]. Az itt felvázolt összefüggéseket az alábbi táblázatban foglaltam össze:

Emlős gliasejttípus	Funkció	Rovar gliasejt megfelelő
Asztrocita	Vér-agy gát kialakítása	Felszíni glia
	Szinapszisok működésének szabályozása, neurotranszmitter reciklizáció	Kérgi glia
Oligodendrocita	Axonok vezetése, védelme a központi idegrendszerben	Neuropil glia
Mikroglia	Immunrendszer funkciójának betöltése	Kérgi-, felszíni- és neuropil glia
Schwann sejt	Periférián lévő idegek borítása, myelin-hüvely kialakítása	Perifériás glia

Az elmúlt két évtized kutatásai alapján kijelenthetjük tehát, hogy a rovarok és az emlősök idegrendszere nagyfokú hasonlóságot mutat. Azt is láthatjuk, hogy a felszíni, a kérgi és a neuropil gliának is megvannak az emlős homológjai. Ezeket az evolúciósan konzervált karaktereket kihasználhatjuk az idegrendszert alkotó gliasejtek további megismerésében és a neurodegenerációs betegségek kutatásában, hiszen a rovar modellben megszerzett információinkat kivetíthetjük az emlős, így az emberi diagnosztikára is [Feany és Bender, 2000, Bonini és Fortini, 2003, Iijima és mtsai, 2004].

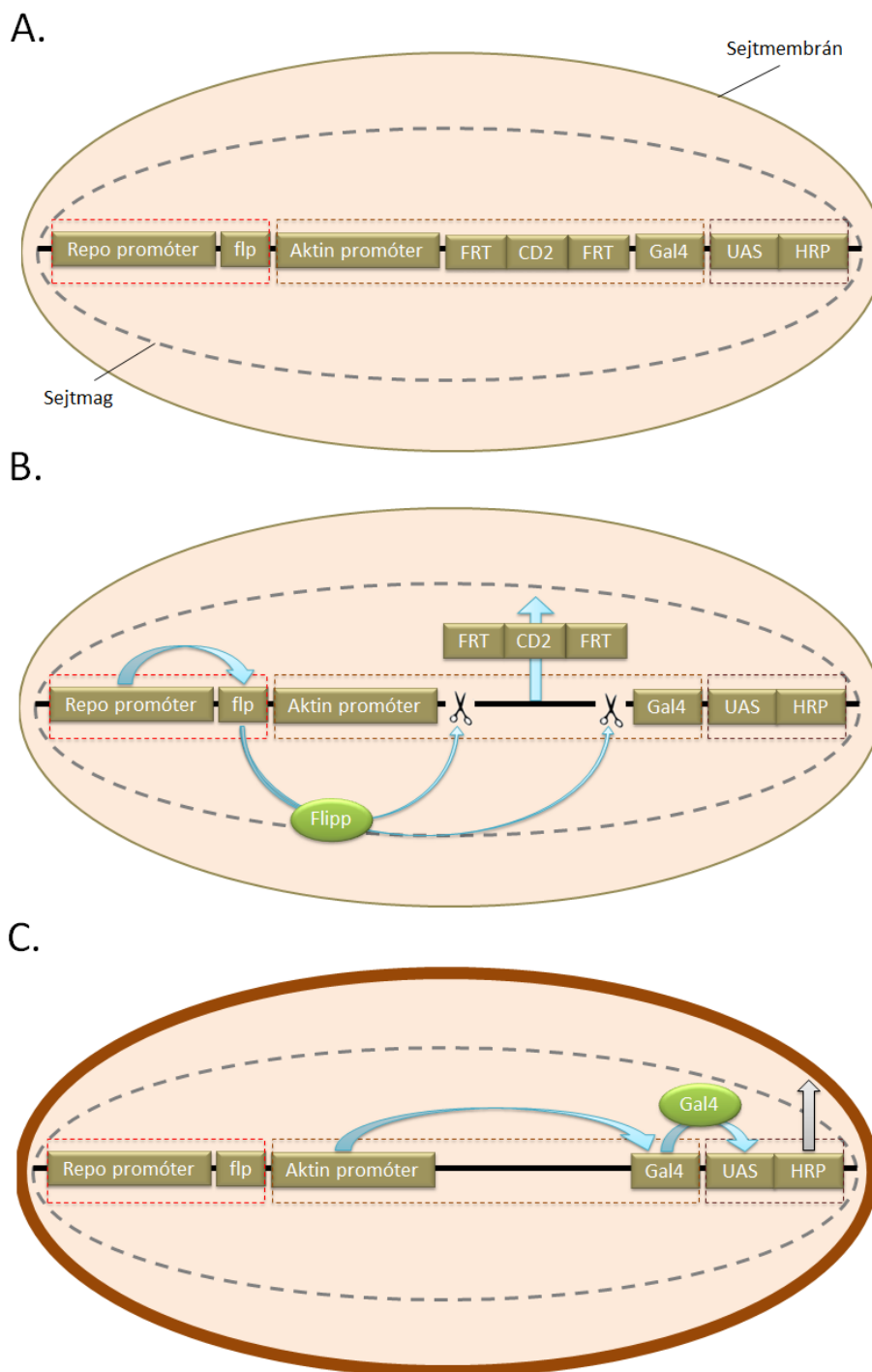
A Gal4-UAS rendszer és a klonális rendszer

A Gal4-UAS rendszert először élesztőben írták le, azóta pedig a genetikai kutatást végző laborok „svájci-bicskája” lett nagykörű felhasználhatósága miatt, mivel a rendszer más élőlényekben is működőképes [Brand és Perrimon, 1993, Duffy, 2002].

A Gal4 egy transzkripció faktor, amely képes a célszekvenciája (UAS - Upstream Activation Sequence) mögötti DNS szakasz átírását serkenteni. Az, hogy a Gal4 elé milyen gén promoterét illesztjük, illetve, hogy az UAS-szakasz mögé, milyen gén kódoló régióját kapcsoljuk; adja meg a rendszer sokszínűségét. Alaphelyzetben a Gal4 fehérje és az UAS szakasz két különböző muslica törzsben van jelen, és a rendszer a törzsek összekeresztezésével hozható működésbe.

A kísérletünkben használatos másik genetikai eszköz a klonális rendszer. E rendszer fontossága abban rejlik, hogy egy adott szöveten belül hozunk létre klonális - genetikailag módosított sejteket. A genetikailag létrehozott sejtek (legyen az GFP-jelölt, mutáns, RNS

csendesített, vagy valamely fehérjét túlkifejező sejt) melletti vad típusú sejtek kontrollként használhatóak, így biztosak lehetünk benne, hogy a kísérletek során alkalmazott bármely kezelés/behatás egyformán éri őket és a vizsgálni kívánt célsejteket. Az ugyanazon állatban lévő sejtek mindig azonos hőmérsékleten, azonos páratartalom mellett, azonos tápanyagok felvételével fejlődnek, így kizárhatjuk azt a szórási tényezőt, ami a több állatból nyert információk eltéréséből adódhat. A klonális rendszer működésének lényege, hogy a flipp-rekombináz (endonukleáz) enzim egy gliasejt-specifikus promoter (*repo*) szabályozása alatt fejeződik ki. Egyes gliasejtekben ez az enzim kivágja a sejtek DNS-ből a célszekvenciái (FRT (Flip Recognition Target), közé illesztett CD2 kazettát, így a kazetta előtt és mögött lévő génszakasz, egy aktin promóter és egy Gal4 szekvencia egymás mellé kerül, és működőképesé válik. Ezt a rendszert kombináltuk egy harmadik transzgén konstrukcióval, egy UAS szekvencia mögött lévő tormaperoxidáz enzimmal [2. ábra]. A flip rekombináz által létrehozott aktin-Gal4 beindítja a tormaperoxidáz expresszióját, de csak azokban a gliasejtekben, amelyekben az FRT helyek közötti CD2 kazetta kivágódása megtörtént. A tormaperoxidáz enzimhez egy plazmamembrán specifikus szignál szekvencia is hozzá van fuzionálva, így az enzim a sejtmembránba lokalizálódik. (A *repo* egy csak és kizárólag a gliasejtekben expresszálni transzkripció faktor.)



3. ábra – Az expressziós rendszerünk működésének mechanizmusa. Az ábrán egy adott gliasejt sematikus képe látható, valamint a sejtmagon belül lévő – a rendszer szempontjából jelentős – gének (**A**). Működésének lényege, hogy a kromoszómán található Repo, ami egy csak gliasejtben aktív promóter, meghajtja az flp-gént. Az így kifejeződő Flipp-rekombináz enzim kihatározza a DNS-ből a két FRT-hely között lévő CD2 kazettát (**B**), aminek következtében az aktin promóter a Gal4 gén mögé kerül és meghajtja azt (**C**). E gén terméke a Gal4 transzkripciós faktor, ami lehetővé teszi, hogy az UAS szekvencia mögött elhelyezkedő gén, adott esetben a membrán specifikus torma-peroxidáz enzim génje működésbe léphessen, róla fehérje íródjon. A tormaperoxidáz DAB-reakcióval előhívható, s azzal a sejt membránja kifesthető.

Célkitűzések

- Legfőbb célunk az volt, hogy keresztezésekkel létrehozzunk egy olyan, stabilan fenntartható transzgenikus modellállat törzset, aminek a központi idegrendszerében egyes gliasejtek véletlenszerűen fejeznek ki membrán specifikus torna-peroxidáz enzimet.
- A fent említett törzsek létrehozása után láthatóvá tenni, majd megvizsgálni ezeket a sejteket. Ehhez ki kellett boncolnunk az agyakat az állatokból, majd beágyazást követően metszeteket készíteni a szövetekből.
- Fénymikroszkópos szinten detektálni és rögzíteni a klonális gliasejteket az agyon belül, megfigyelni a főbb morfológiai jellemzőket.
- Klonális gliasejtek teljes nyúlványrendszerének ultrastrukturális vizsgálata elektronmikroszkóp segítségével. Megfigyelni, hogy adott gliasejtek milyen kapcsolatban állnak a neuronokkal, a szinapszisokkal és a többi gliasejttel.

Anyagok és módszerek

Az állatokat standard táptalajon tartottuk, 25°C hőmérsékleten, 12 órás megvilágítás és 75% páratartalom mellett [Ashburner és mtsai, 2005].

A kísérletben felhasznált transzgenikus törzsek és származási helyeik

Repo flp (II.kromoszóma) - Christian Klämbt (Westfälische Wilhelms-Universität Münster), UAS-HRP/CyO (II.kromoszóma) - Bloomington Drosophila Stock Center (No.: 8763; <http://flystocks.bio.indiana.edu/>), Act<CD2<Gal4 (III.kromoszóma) – Juhász Gábor (ELTE – Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék) A fenti három törzsből, többlépéses keresztezéssel létrehoztunk egy: **repo-flp, UAS-HRP/+; Act<CD2<Gal4/+** genotípusú vonalat, melyen további vizsgálatainkat végeztük [Függelék: 1/F. ábra].

Mintagyűjtés és a minták kezelése

A kísérletekhez felhasznált összes vegyszer a Sigma-Aldrich-tól származott. Az agyakat kb. 120 órás vándorló lárvákból preparáltam ki. Ez után jéghideg foszfát pufferbe (PBS, pH=7,4) gyűjtöttem őket, nem több mint fél óráig. A frissen boncolt szöveteket fixálóba helyeztem. A fixáló összetétele: 0,5% Glutár-aldehid, 1,5% szukróz (biztosítja az ozmolalitást), 0,0375% CaCl_2 (stabilizálja a membránokat). A fentieket 0,1M-os pH 7,4-es Na-kakodilát pufferben oldottam fel. A fixáló elkészítése során nem használtam formaldehidet, ugyanis a formaldehydes fixálás lecsökkenti a HRP enzim aktivitását, így gyengébb jelet kapnánk [Dubois és mtsai, 2001]. A minták billegőasztalon, szobahőmérsékleten 20 percig fixálódtak, majd 2×10 percig mosódtak Na-kakodilát pufferben. Ezután 15 perces mosás következett 50mM-os ammónium-klorid, 50mM glicin - PBS oldatban, amely segít elreagáltatni a mintában maradt aldehid csoportokat. Ezután csipesszel a commissuráknál kettéválasztottam a két féltekét és eltávolítottam a hasdúccláncot. Ezúton a vér-agy gát sérül, a reagensek képesek lesznek behatolni a szövetbe anélkül, hogy a mintánkat detergenssekkel kellene kezelnünk. A különálló féltekékkel való munka megkönnyíti dolgunkat, hiszen valószínű, hogy egy agyban több klón sejt is jelen lesz, a beágyazás után viszont lehetetlen lenne úgy orientálni a mintánkat, hogy a metszéssíkban látható legyen az összes klón sejt. A féltekék külön blokkokba ágyazásával lehetőség szerint minden klónsejtet megvizsgálhatunk. Az agyakat 2×10 percig TBS (Tris-Buffered Saline: 0,05M+0,9% NaCl)-ben mostam, majd 10 perces TBS+0,75% H_2O_2 oldatba tettem őket. Ez a lépés inaktíválja az endogén peroxidázokat, így lecsökkenti a diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB) aspecifikus jelét. Ezután 4×10 perc TBS mosás következett. Az előinkubálás 60 percig szobahőmérsékleten, sötétben történt DAB-TBS oldatban (50mg DAB/100ml TBS). Az előhívást 30 percen keresztül végeztem DAB-TBS oldatban, sötétben (+0,01% H_2O_2). A mintákat az előhívás után 3×10 percig mostam TBS-ben.

Elektronmikroszkópos előkészítés

Az előhívás során azokban a sejtekben, amelyekben a HRP enzim jelen van a DAB monomerekből DAB polimer képződik, ami egy ozmiofil csapadék. A DAB csapadék által kifestett struktúráknak egyik, számunkra előnyös tulajdonsága, hogy ozmium-tetroxidos kezelést követően az elektronmikroszkópban fokozott kontrasztot mutatnak, a környező sejtalkotóktól könnyen elkülöníthetőek [Graham és Karnovsky, 1966]. Ennek kivitelezéséhez a mintáinkat először 2×5 percig mostam desztillált vízben, majd 0,5%-os ozmium tetroxid

oldatban inkubáltam, 40 percig, sötétben. Ezt követően desztillált vízben mostam a mintáinkat 2×10 percig. Következő lépéseként a szövetek dehidratálása következett felszálló alkoholsorban, (30%, 50%, 70% majd 96%-os etanolban) mindegyikben oldatban 8 percig, majd abszolút etanolban 2×5 percig. Ezt követően 10 percig propilén-oxidba tettem azokat. Az uranil-acetáttal történő blokkfestést elhagytam, mert fennállt a veszélye, hogy az erős alapkontraszt elnyomja a DAB jelet. Mivel a későbbiekben az agyakon már nem akarunk immunjelölést végezni, így a Durcupan (Fluka) gyanta tökéletesen megfelel a beágyazáshoz. A mintákat műgyantába ágyaztam, majd három napig 60°C -on polimerizáltattam. Az így kapott műgyanta blokkokat sztereomikroszkóp alatt befaragtam, mikrotóm segítségével a laborban készített üvegekkel félvékony ($0,5\text{-}1\text{ }\mu\text{m}$), esetenként $2\text{ }\mu\text{m}$ vastag metszeteket készítettem belőlük. Az agyakat teljes terjedelmükben lemetszettem. Ezeket a metszeteket tárgylemezre helyeztem, glicerinnel lefedtem, majd Zeiss AxioImager Z1-es mikroszkóppal, 63-as olajimmerziós objektívvel vizsgáltam, fotóztam. Ezen vizsgálatot követően a megfigyelt mintákról levettem a fedőlemezt, a mintákat egy másik blokk felszínére ragasztottam pillanatragasztóval, majd ebből szintén üveggel 60-80nm-es ultravékony metszeteket készítettem, melyeket 1%-os formvar hártvás, 150-, illetve 200 mesh-es réz gridre vettem fel. A mintákat JEOL JEM 1011-es transzmissziós elektronmikroszkópban vizsgáltuk.

Eredmények és értékelésük

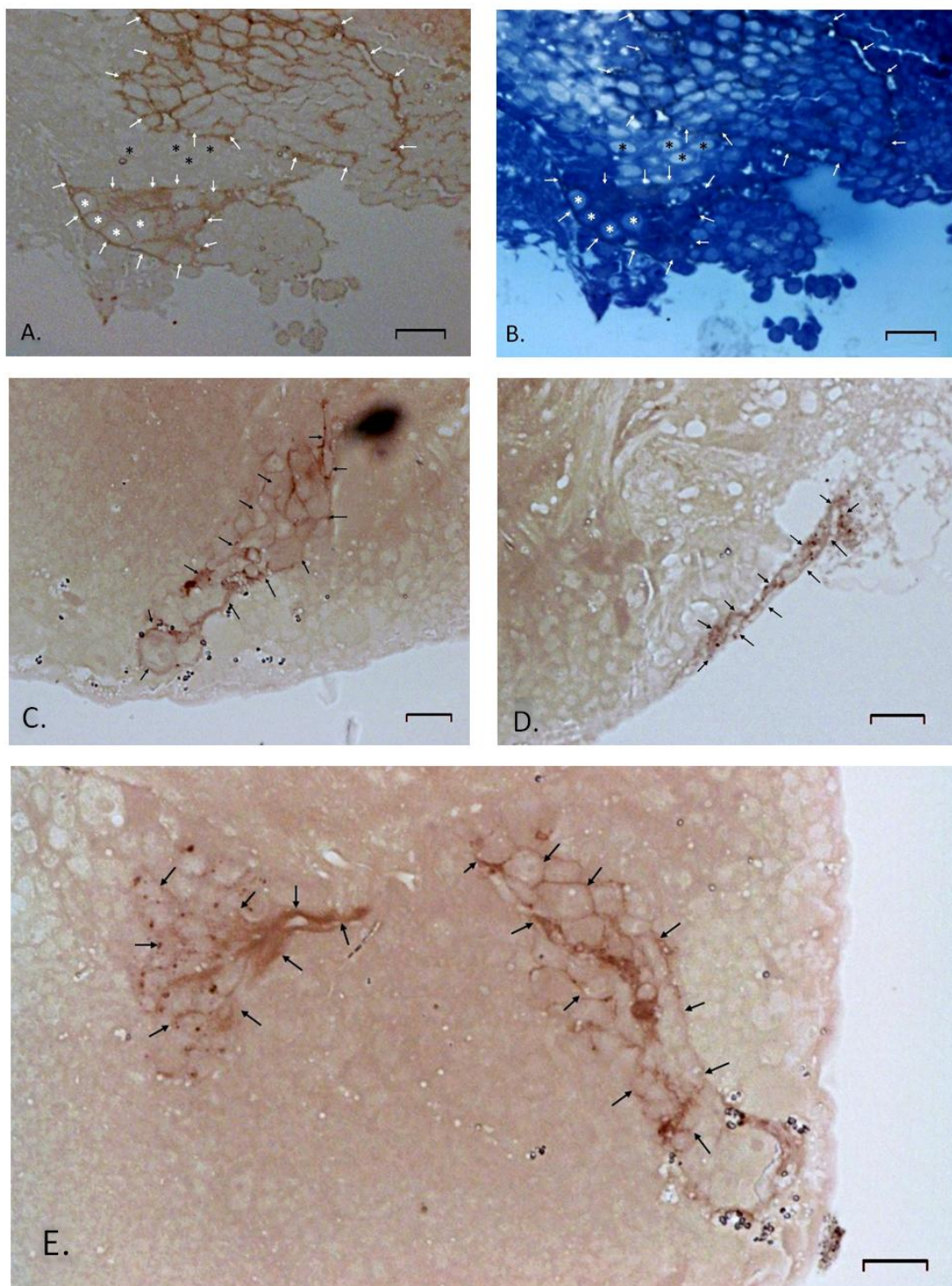
Fénymikroszkópos vizsgálatok

A megfogalmazott célkitűzések szerint sikeresen létrehoztuk azt a transzgenikus törzset, amelyben egyedi gliasejtek jelölését lehet elvégezni. A boncolás, preparálás és beágyazás végeztével a várt eredményt tapasztaltuk: sikeresen detektálhattunk a muslicák agyában olyan gliasejteket, melyek membránjában a DAB csapadék keletkezett. A jelölődött sejtek már közvetlenül a DAB-reakció után jól megfigyelhetők voltak az agyszöveten belül sztereo- és fénymikroszkóppal is [4. ábra].



4. ábra – Fénymikroszkópos felvétel egy DAB+ sejtről (fekete nyilak) muslica agydúcán belül. Skála: 150µm

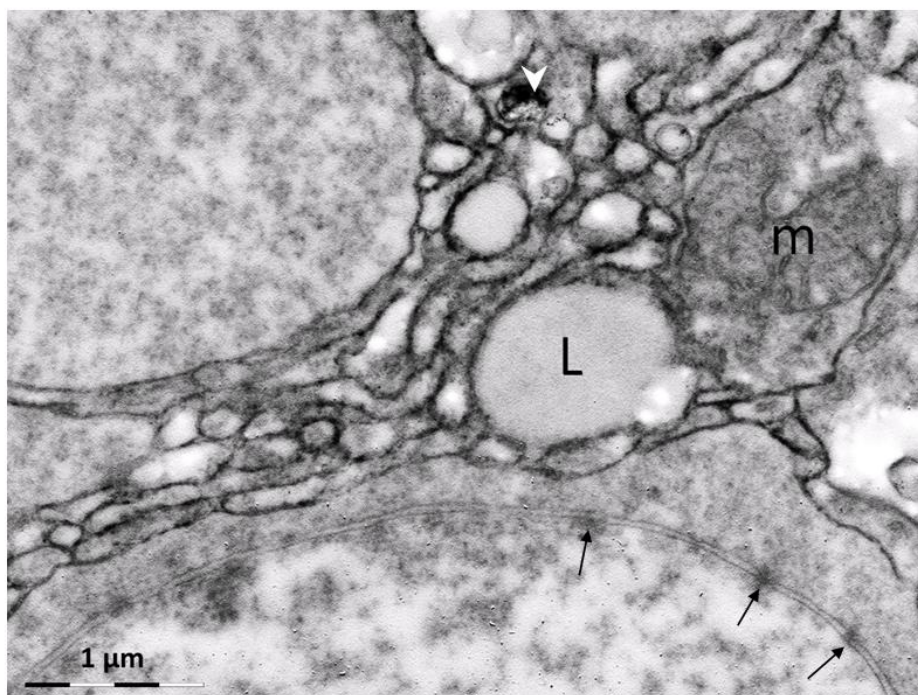
Egyes mintákat festetlenül fotóztunk le, majd a képek elkészítése után megfestettük toluidin kék-oldattal. Ezzel arra kaptunk kísérletes bizonyítékot, hogy a két sejt melletti térben nem azért nem látunk csapadékot, mert ott neuropil régió található, vagy mert a metszet sérült. A festés után ugyanis jól kivehető, hogy abban a régióban ugyanúgy neuronokat találhatunk, amiknek úgyszintén rendelkezniük kell gliaborítással [5. ábra/A-B]. Elsősorban kérgi és felszíni gliasejteket sikerült jelölnünk [5. ábra/C-D], kisebb számban találtunk neuropil gliát [8. Ábra/E]. Ez azzal magyarázható, hogy a flip-rekombináz aktivitása e két sejt típusban a legmagasabb.



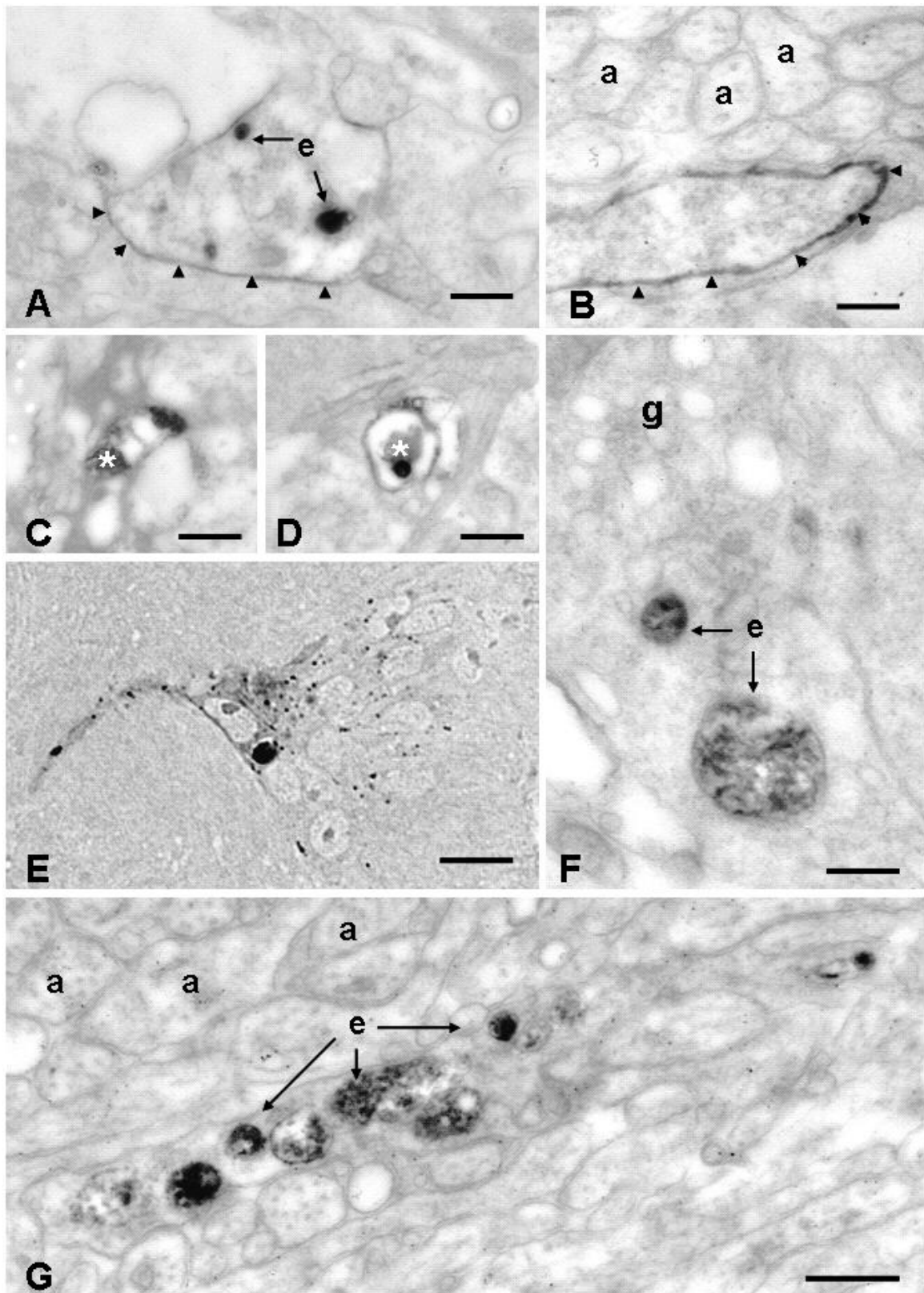
5. ábra – Félvékony (2 μ m vastag) metszetek *Drosophila* lárvális stádiumban lévő agydúcából. **A:** festetlen minta. **B:** azonos minta toluidin kézzel való festés után. A fekete nyilak a klonális gliasejtek nyúlványrendszerének körvonalát jelölik ki mindkét képen. A fekete csillagok a klonális gliasejtek által nem határolt neuronokat jelölnék, a fehér csillagok pedig olyan neuronok sejttesteit, amelyet a vizsgált sejt körülvesz. **C:** klonális kérgi gliasejt. **D:** klonális szubperineurális gliasejt. **E:** a C-képen látható - és egy másik kérgi gliasejt, nagyobb nagyításban. Fekete nyilakkal az említett sejtek nyúlványrendszerének körvonala látszik. Skála: A, B, C, D, E: 10 μ m.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok

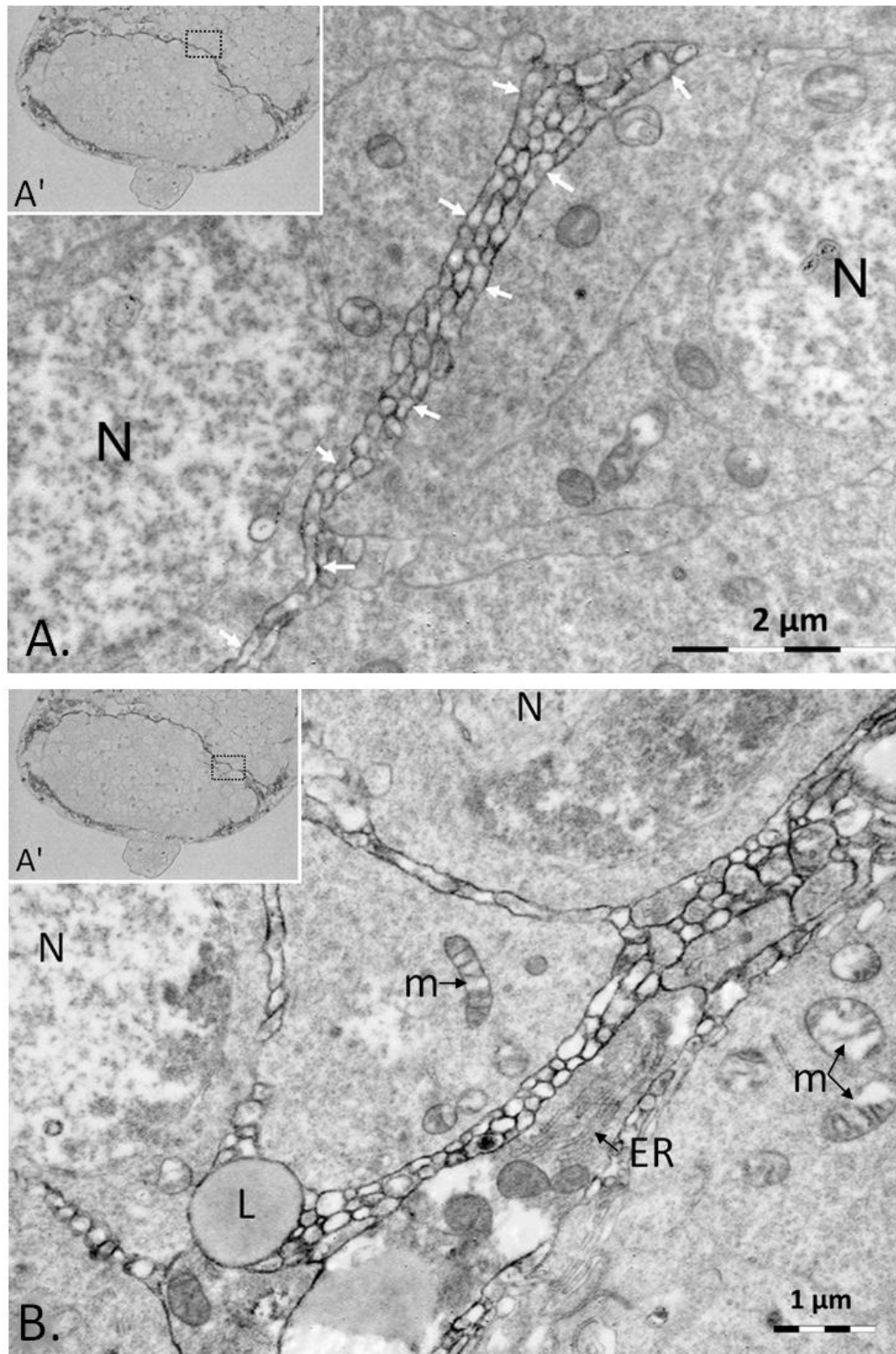
Mintáink az elektronmikroszkópban igen jó megtartásúaknak bizonyultak. Minden sejtorganellum és azok finomszerkezete könnyűszerrel azonosítható volt. A mintánk halványszürke alapkonzasztjából élesen kitűntek a DAB-al jelölt gliasejtmembránok [6.ábra]. Több klónsejt esetében megtaláltuk azok nyúlványait, mind keresztmetszetben, mind hosszmetzetben. Minden esetben a DAB csapadék egyenletesen festette ki a gliasejtek membránját amely nagyban megkönnyítette azok azonosítását [7. Ábra A-D, fehér csillagok]. Fontos megfigyelés, hogy a membránból visszavevődő tormaperoxidáz endoszómákba, kerül, felhalmozódik így számos olyan vakuólát találtunk, melyekben a DAB csapadékot figyeltünk meg [7.ábra/E]. A tormaperoxidáz lassan bomlik le a lizoszómákban, így azok at is kifesti [Dubois és mtsai, 2001]. Bizonyos gliasejtekben (főleg a neuropil) kifejezetten nagy mennyiségű ilyen DAB-pozitív endoszómát találtunk [7. ábra/F, G]. Ezek vélhetően jól reprezentálják az egyes sejtek fagocitotikus/endocitotikus kapacitását. A módszer azonnal bebizonyította, hogy mekkora szükség van az elektronmikroszkóp szintjén való vizsgálatokra, hiszen csupán a fénymikroszkópos képek láttán arra következtethetnénk, hogy a fénymikroszkópos képeken látható sötét vonalak minden esetben egyetlen gliasejtnyúlványnak felelnek meg [8. ábra/A’]. Ez azonban téves feltevés, a gliasejt számos különálló nyúlványával, mintegy polipkarokhoz vagy kesztyű ujjaihoz hasonló struktúrát létrehozva veszi körül a neuronokat. Számos ilyen vékony nyúlvány keresztmetszetét láthatjuk a 8.ábra/A.-képen. Az egyedileg jelölt sejt nyúlványrendszere minden esetben jól elkülöníthető a körülötte lévő neuronok és mitokondriumok membránjaitól.



6. ábra – Elektronmikroszkópos felvétel a muslica agy kérgi régiójából. A képen két neuron sejttestje közti DAB-al jelölt glianyúlványokat figyelhetjük meg. A képen felfedezhetünk egy endoszómát (fehér nyílhegy) melyben felhalmozódott a torna-peroxidáz. A neuron sejtmaghártáján lévő magpórusokat fekete nyilak jelzik. L: lipidcsepp, m: mitokondrium



7. ábra Egyedileg jelölt gliasejtek nyúlványairól készült elektronmikroszkópos felvételek. A, C, D – keresztmetszeti képek, B – hosszmetset. E-DAB pozitív neuropil gliasejt fénymikroszkópos képe. Figyeljük meg, a DAB csapadék finom szemcsés mintázatát. F,G-Ugyanezen sejt elektronmikroszkópos képe. A plazmamembrán-specifikus tormaperoxidáz, endoszómákba vevődik vissza, s ott felhalmozódik. Skála: 200 nm A-D, F, G és 10 μ m az E esetében. a: axon, e: endoszóma, g: Golgi-készülék



8. ábra – Elektronmikroszkópos felvételek torna-peroxidázzal egyedileg jelölt gliasejt nyúlványrendszeréről. **A'**- fénymikroszkópos kép a vizsgált gliasejtről. **A**- két neuron között lévő gliális nyúlványrendszer. A körvonalát fehér nyilak jelölik. Jól látható, hogy mennyivel denzebb membránszerkezettel rendelkezik az idegsejtekhez képest a klonális sejt. **B**- nagyobb nagyítású kép ugyanazon sejt nyúlványairól. A jól kivehető sejtorganellek a szövet jó megtartását tanúsítják. N: neuron, m: mitokondrium, L: lipidcsepp, ER: endoplazmás retikulum, m: mitokondrium.

Összefoglalás

Célkitűzéseinknek megfelelően létrehoztunk egy olyan stabilan fenntartható transzgenikus muslica törzset, amelyben véletlenszerűen képződnek genetikai úton jelölt egyedi gliasejtek. Munkánkkal – legjobb tudásunk szerint – e tudományterületen elsőként egy olyan módszert dolgoztunk ki, ami lehetővé teszi egyedi gliasejtek teljes nyúlványrendszerének *in vivo*, genetikai úton való megjelölését, és vizsgálatát elektronmikroszkópos szinten.

Kísérleti módszerünknek számos előnyös tulajdonsága van: 1. gyors, kivitelezéséhez, a fixálástól a beágyazásig két nap alatt eljuthatunk. 2. permeabilizáló reagens hiányában a minták a kezelés után jó megtartásúak, ultrastruktúrájuk informatív marad. 3. a különböző biológiai jelzőmolekulákkal feltöltött sejtekkel szemben itt a sejtmembránban fejeződik ki a marker, így a citoplazma festetlen marad, sikeresen vizsgálhatjuk a sejt belső organelleumait és a citoplazmát is. 4. kivitelezéshez nem szükségesek különleges eszközök (pl.: vibratóm), így költségkímélő a megvalósítása. 5. ozimumos utófixálás és rövid víztelenítéssel a lipidcseppek sem oldódnak ki a szövetből, így azok jelenlétéből, hiányából, alakjából is következtetéseket vonhatunk le.

Azonban mint minden módszernél, itt is számolnunk kell hátrányokkal. 1. A metszeteken postembedding immuncitokémia már csak nagyon korlátozottan végezhető, az erős posztfixálás következtében valamint a Durcupan gyanta tulajdonságai miatt a legtöbb antitest nem fér hozzá a megfelelően az epitópokhoz. Egyes bioaktív kismolekulák (GABA, glutamát) kimutatása tűnhet eredményesnek, mivel ezekre léteznek olyan antitestek amik ilyen körülmények között is működnek [Somogyi és Hodgson, 1985, Ottersen és mtsai 1992]. Ekkor metszetszöveteket kell fölvennünk, külön gridekre, mert a minták maratása kiszedi a számunkra fontos DAB jelet. Ebben az esetben az egyik metszeten végezzük a gliasejtnyúlványok azonosítását, a másikon pedig az immunreakciót. 2. A flipp rekombináza véletlenszerű aktiválódása következtében nem lehetünk biztosak abban, hogy mennyi sejt jelölődik, a jelölődött sejtek pedig ritkán fordulnak elő, így a metszések során időigényes lehet az egyes sejtek megtalálása a szövetben.

A gliasejtekkel foglalkozó kutatások legtöbbje fluorescens fehérjékből nyert adatokra épül. Ezek a vizsgálatok, habár nagyon informatívak, napjaink kutatásaihoz már nem elégedhetünk meg csupán fénymikroszkópos adatokkal. Ezek alapján ugyanis nem derül ki egyértelműen két sejt kölcsönhatásának mibenléte, a szövetben való precíz tájékozódás csak elektronmikroszkóppal kivitelezhető. Ebből kifolyólag nélkülözhetetlen hangsúlyozni, hogy

az elektronmikroszkópiának mekkora szerepe van az idegrendszer pontos megértésében. Munkánkban genetikai mutációktól mentes egyedekben jelöltünk gliasejteket, így az egészséges, normális fejlődésű egyedek gliasejtjeiről nyerhettünk értékes információkat. A genetikai kutatások széleskörű eszköztárát megvizsgálva azonban beláthatjuk, hogy a módszer alkalmazása nem merül ki ennyiben. Ha az egyedi gliasejtekben nem csak HRP-t fejeztetünk ki, hanem vele egyidejűleg egy adott génre specifikus kettősszálú RNS-t, megvizsgálhatjuk az adott gén gliasejtekben betöltött funkcióját, illetve azt is, hogy ez a funkcióvesztéses fenotípus milyen hatással van az idegsejtekre. Kettősszálú RNS-ek mellett túlkifejeztethetünk más, pl.: domináns-negatív, konstitutívan aktív, vagy éppen GFP-vel jelölt fehérjéket is. Az itt felsorolt módszereket a dolgozatomban ismertetett metódussal kombinálva értékes adatokat nyerhetünk az agyfejlődés, működés és a neurodegenerációs betegségek genetikai hátteréről.

Különös figyelmet érdemelnek az idegrendszeri betegségek, amelyek az embereket érintő betegségek közül a legsúlyosabbak közé tartoznak. Nem csupán azért, mert az idegsejtek nem képesek korlátlanul újratermelődni, nehezen regenerálódnak és műtéti beavatkozást kisebb hatásokkal lehet alkalmazni a kezelésében, hanem azért is, mert az ilyen típusú elváltozások fenotípusosan, külsőleg is megmutatkoznak a páciens viselkedésén, mentális tevékenységén. Az egyik változata az ilyen típusú betegségeknek az agytumor, azon belül is a Glioblastoma multiforme (GBM). Ez a legsúlyosabb, legjobban terjedő rosszindulatú agyi daganat. A kezelésekkel szemben nagyon ellenálló, gyors lefolyása miatt pedig csaknem mindig végzetes kimenetű. Kialakulásában sok gén mutációja játszik szerepet. Egy genetikai károsodás következtében mutáció következik be az epidermális növekedési faktor receptor tirozin kinázban (EGFR), ami további mutációkat aktivál a PI-3 kináz (PI3K) útvonalban. A sok éves kutatások ellenére azonban még mindig nem egyértelmű, hogy történik a gliális kórfejlődés szabályozása. Megfőkezésében elengedhetetlenül fontos szempont, hogy megismerjük a betegség keletkezésének pontos folyamatát, a kialakulásának okait, a genetikai, sejttani háttereit, molekuláris folyamatait. A bevezetőben már olvashattunk róla, hogy mennyire jó kísérleti alanya az ecetmuslica az emberi idegrendszerrel kapcsolatos kutatásoknak. A közelmúltban készítettek egy EGFR/PI3K útvonal mutáns muslica törzset, amelyben a glia progenitor sejtek abnormálisan fejlődő, invazív sejteket hoznak létre, amelyek tumor kialakulásához vezetnek [Read, 2011]. Ez a törzs tökéletes modellként szolgál a GBM vizsgálatához, hiszen itt is mutáció által okozott tumor kialakulásról beszélünk.

Ha az általunk kifejlesztett módszerben használatos transzgenikus törzseket bekeresztezzük az EGFR/PI3K útvonal mutáns muslicákkal, lehetőségünk lenne egyedileg vizsgálni a mutáns gliasejtek morfológiáját, belső szerkezetét, a sejtorganelleket és a citoplazma állományát, ezzel is közelebb kerülve a GBM gliasejtekre vonatkoztatott hatásainak megismeréséhez. Ez a vizsgálat képezi jövőbeli kutatásaink középpontját.

Irodalomjegyzék

- **Ágota A. B., Noémi B. H, Zoltán N.** 2005. Quantal Size Is Independent of the Release Probability at Hippocampal Excitatory Synapses. *J Neurosci.* 25(1):223–232.
- **Ashburner, M, Golic, K.G, Hawley, R.S.** 2005. Tolerance to environmental variables (*Drosophila*: a laboratory handbook). 6/12, 166-173. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- **Auld, V.J, Fetter, R.D, Broadie, K, Goodman, C.S.** 1995. Gliotactin, a novel transmembrane protein on peripheral glia, is required to form the blood-nerve barrier in *Drosophila*. *Cell* 81:757-767.
- **Besson, M.T, Soustelle, L, Birman, S.** 2000. Selective high-affinity transport of aspartate by a *Drosophila* homologue of the excitatory amino-acid transporters. *Curr Biol.* 10(4):207-210.
- **Bier, E.** 2005. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nature Rev.* 6:9-23.
- **Bonini, N.M. and Fortini, M.E.** 2003. Human neurodegenerative disease modeling using *Drosophila*. *Ann. Rev. Neurosci.* 26:627-656.
- **Brand, A. and Perrimon, N.** 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.
- **Carlson, S.D, Saint Marie, R.L.** 1990. Structure and function of insect glia. *Annu. Rev. Entomol.* 35:597-621.
- **Danbolt, N.C.** 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65:1-105.
- **Daneman, R. Barres, B.A.** 2005. The blood-brain barrier--lessons from moody flies. *Cell* 123(1):9-12.
- **Duffy, J.B.** 2002. Gal4 system in *Drosophila*: A fly genetic's Swiss army knife. *Genesis* 34:1-15.
- **Dubois, L, Lecourtois, M, Alexandre, C, Hirst, E. Vincent, J.P.** 2001. Regulated endocytotic routing modulates wingless signaling in *Drosophila* embryos. *Cell* 105:613-624.
- **Edwards, N, T, Meinertzhagen I. A.** 2010. The functional organisation of glia in the adult brain of *Drosophila* and other insects. *Progress in Neurobiology* 90: 471–497.
- **Feng, G, Mellor, R.H, Bernstein M, Keller-Peck, C, Nguyen, Q.T, Wallace, M, Nerbonne, J.M, Lichtman, J.W, Sanes J. R.** 2000. Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP. *Neuron*, 28, 41–51.
- **Feany, M.B, and Bender, W.W.** 2000. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404:394-398.
- **Freud, T.F. and Buzsaki, G.** 1996. Interneurons of the Hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.

- **Freeman, M.R, Delrow, J, Kim, J, Johnson, E, Doe, CQ.** 2003. Unwrapping glial biology: Gcm target genes regulating glial development, diversification and function. *Neuron* 28:567-580.
- **Gloor, S.M, Wachtel, M, Bolliger, M.F, Ishihara, H, Landmann, R. and Feri, K.** 2001. Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 36:258-264.
- **Graham, R.C. JR. and Karnovsky, M.J.** 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 14:291-302.
- **Harris M. Cruce W.L.R., Greenough, W.T., Teyler T.J.** 1980. A golgi impregnation technique for thin brain slices maintained in vitro. *J. Neuroscience Methods*, 2, 363-371.
- **Iijima, K, Liu H.P, Chiang, A.S, Hearn S.A, Konsolaki M and Zhong Y.** 2004. Dissecting the pathological effects of human A β 40 and A β 42 in *Drosophila*: A potential model for Alzheimer's disease. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 101:6623-6628.
- **Ito, K, Urban, J, Technau, G.** 1995. Distribution, classification and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerv cord. *Roux Arch's. Develop. Biol.* 209:289-307.
- **Jacobs, J.R, Goodman CS.** 1989. Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS. I. A glial scaffold appears before the first growth cones. *J Neurosci* 9:2402-2411.
- **Jackson, F.R, Haydon PG.** 2008. Glial cell regulation of neurotransmission and behavior in *Drosophila*. *Neuron Glia Biol* 4:11-17.
- **Juang, J.L. and Carlson, S.D.** 1994. Analog of vertebrate anionic sites in blood-brain barrier interface of *Drosophila*. *Cell Tissue Res* 277:87-95.
- **Kettenmann, H. and Ransom, B.R.** 2005. *Neuroglia*. Oxford University Press.
- **Livet, J, Weissman, T.A, Kang, H, Draft, R.W, Lu, J, Bennis, R.A, Sanes, J.R, Lichtman, J.W.** 2007. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 450, 56-62.
- **Mayer, F, Mayer, N. Chinn, L. Pinsonneault, R.L. Kroetz, D. and Bainton, R.J.** 2009. Evolutionary conservation of vertebrate blood-brain barrierchemoprotective mechanisms in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 29:3538-3550.
- **Mazzarello, P, Garbarino, C, Calligaro A.** 2009. How Camillo Golgi became "the Golgi". *FEBS Lett.* 583(23):3732-3737.
- **Ottersen O. P, Zhang N, Walberg, F.** 1992. Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neurosci.* 46, No. 3, pp. 519-534.
- **Pereanu, W, Shy, D, Hartenstein, V.** 2005. Morphogenesis and proliferation of the larval brain glia in *Drosophila*. *Dev Biol* 283:191-203.

- **Read, R.D.** 2011. *Drosophila melanogaster* as a model system for human brain cancers. *Glia*. 59:1364-1376.

- **Rothstein, J.D. Dykes-Hoberg, M. Pardo, C.A. Bristol, L.A. Jin, L. Kuncl, R.W. Kanai, Y. Hediger, M.A. Wang, Y. Schielke, J.P. Welty, D.F.** 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16(3):675-86.

- **Sibson, N.R, Mason, G.F, Shen, J, Cline, G.W, Herskovits, A.Z, Wall, J.E, Behar, K.L, Rothman. D,L, Shulman, R.G.** 2001. *In Vivo* ¹³C NMR measurement of neurotransmitter glutamate cycling, anaplerosis and TCA cycle flux in rat brain during. *J. Neurochem.* 76:975-989.

- **Somogyi, P.** 1990. Synaptic connections of neurones identified by Golgi impregnation: characterization by immunocytochemical, enzyme histochemical, and degeneration methods. *J. Electron Microsc. Tech.* 15(4):332-51.

- **Somogyi, P. and Hodgson, A. J.** 1985. Antisera to gamma-aminobutyric acid. III. Demonstration of GABA in Golgi-impregnated neurons and in conventional electron microscopic sections of cat striate cortex. *J Histochem Cytochem* 33: 249.

- **Somogyi, P. and Klausberger, T.** 2005. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J. Physiol.* 562(Pt 1):9-26.

- **Sonnenfeld, M.J. and Jacobs J.R.** 1995. Macrophages and glia participate in the removal of apoptotic neurons from the *Drosophila* embryonic nervous system. *J. Comp. Neurol.* 359:644-652.

- **Spindler S. R., Ortiz I., Fung S., Takashima S., Hartenstein V.** 2009. *Drosophila* cortex and neuropile glia influence secondary axon tract growth, pathfinding, and fasciculation in the developing larval brain *Developmental Biology* 334:355–368

- **Stork T, Engelen D, Krudewig A, Silies M, Bainton RJ, Klambt C.** 2008. Organization and function of the blood-brain barrier in *Drosophila*. *J Neurosci* 28:587-597.

- **Sugimoto, Y, Taniguchi, M, Yagi, T, Akagi, Y, Nojyo, Y, Tamamaki, N.** 2001. Guidance of glia precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerv. *Development* 128:3321-3330.

- **Tsacopoulos, M, Poitry-Yamate, C.L, Poitry, S.** 1997. Ammonium and glutamate released by neurons are signals regulating the nutritive function of a glial cell. *J. Neurosci.* 17:2383-2390.

- **Wolfe G.V.** 2000. The chemical defense ecology of marine unicellular plankton: constraints, mechanisms, and impacts. *Biol. Bull.* 198: 225–244.

- **Young P, Qiu L, Wang D, Zhao S, Gross J, Feng G.** 2008. Single-neuron labeling with inducible Cre-mediated knockout in transgenic mice. *Nat Neurosci.* 11:721–28.

Köszönetnyilvánítás

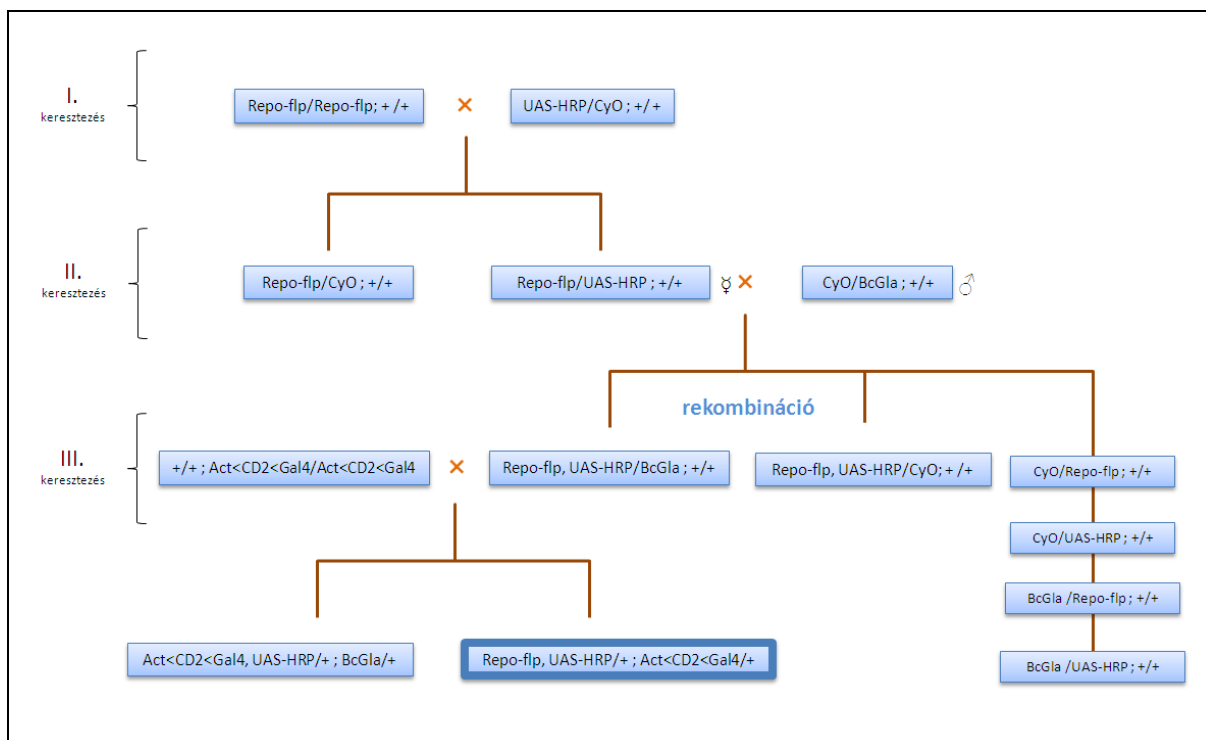
Mindenekelőtt szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, **Kis Viktornak**, mind azért a rengeteg segítségért, tanácsért, türelemért, és odafigyelésért, mind szakmailag - mind emberileg, amit a munkám során Tőle kaptam.

Köszönettel tartozom az ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék vezetőjének, **Dr. Lőw Péternek** és **Prof. Dr. Sass Miklósnak**, hogy lehetővé tették, hogy a laboratóriumban dolgozhassak.

Szeretném megköszönni a Tanszék munkatársainak, kiváltképp: **Lőrincz Péternek** és **Maruzs Tamásnak**, valamint **Széplaki Szilviának**, **Skrapits Katalinnak** és **Sándor Zoltánnak**, hogy végig támogattak tanácsaikkal, segítséget nyújtottak munkám folyamán és biztosították az állandó jó hangulatot a laboratóriumban.

Nem utolsó sorban köszönettel tartozom **Korponai Kristófnak**, **Németh Márknak** és **Pecsics Tibornak**, hogy ötleteikkel segítették a munkám végzését.

Függelék



F/1. ábra – A háromlépéses keresztezés-sorozattal előállított *Repo-flp*, *UAS-HRP/+*; *Act<CD2<Gal4/+* genotípusú törzs keresztezési sémája. A rekombináns egyedek szelektálása a balancerek által kifejeztetett fenotípus alapján történt. A *Repo-flp* gén és az *UAS-HRP* gén jelenléte is halványsárga szemszínt eredményez. A két gén együttes jelenlétével azonban narancssárga szemszínt fog jelentkezni, ami alapján az olyan egyedek, amelyekben rekombináció történt kiválaszthatóak. A *BcGla* balancer jellemzője, hogy a haemolymphába fekete hemociták jelennek meg, amik már sztereomikroszkóp alatt is szembetűnnek. Az utolsó keresztezés F1 nemzedékéből ezek alapján válogattuk a számunkra megfelelő genotípussal rendelkező egyedeket.

Nyilatkozat a szerzői hozzájárulásról

Név: Barti Benjámin

Intézmény: Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi kar

Dolgozat címe: Hogyan állítsunk elő elektronmikroszkóppal is egyedileg vizsgálható gliasejteket?

A dolgozat szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló munkám eredménye, saját szellemi termékem, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam, mások által írt részeket a megfelelő idézés nélkül nem használtam fel.

A kísérletek megtervezését témavezetőmmel, Kis Viktorral közösen végeztük. A transzgenikus törzsek keresztezését, a szövetek preparálását, fixálását, klonális sejtek DAB-reakcióval történő előhívását én hajtottam végre. Az agyak elektronmikroszkópos előkészítését, beágyazását, metszését, a metszéshez használatos üvegek készítését, a minták lefedését és fotózását, a hártyás gridek elkészítését, az ultramikrotómos metszést is saját kezűleg végeztem. Az elektronmikroszkópos vizsgálatokat Kis Viktorral közösen végeztük.

Budapest, 2013.01.08.

a hallgató aláírása