

# ANALIZA IZRAŽAJA GENA TIJEKOM IN VITRO DIFERENCIJACIJE NEURONA

---

**Stojanac, Ante**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:052099>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-27**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Ante Stojanac

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

**Diplomski rad**

Zagreb, 2022.

Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju

Predstojnica: Prof. dr. sc. Martina Đuras

Mentori: Prof. dr. sc. Snježana Kužir

Doc. dr. sc. Ivan Alić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Tajana Trbojević Vukičević
2. Doc. dr. sc. Ivan Alić
3. Prof. dr. sc. Snježana Kužir
4. Doc. dr. sc. Maja Maurić Maljković (zamjena)

## *Zahvala*

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Snježani Kužir na ukazanom povjerenju te vodstvu i potpori tijekom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Dinku Mitrečiću, voditelju projekta „YoungBrain (EU-ESF)”, u sklopu kojega je napravljeno ovo istraživanje. Zahvaljujem se i svim djelatnicima Veterinarskog i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji su na bilo koji način pridonijeli izradi ovoga rada.*

*Posebno se zahvaljujem svojem dugogodišnjem mentoru i prijatelju doc. dr. sc. Ivanu Aliću na ideji i motivaciji, nesebičnoj pomoći i neprestanoj potpori, ne samo tijekom izrade ovog rada nego tijekom cjelokupnog studiranja.*

*Zahvaljujem se svojim kolegama i prijateljima na svakoj pomoći te na lijepim uspomnama kojih ću se rado sjećati.*

*Konačno, najveća hvala ide mojoj obitelji, a posebno mojim roditeljima. Zahvaljujem im na potpori i razumijevanju koje su mi pružali kroz sve ove godine, te na beskrajnom strpljenju i vjeri u konačan uspjeh.*

*Ante Stojanac*

## **Popis korištenih kratica:**

CFP (*engl.* cyan fluorescent protein, CFP), zeleno-plava fluorescentna bjelančevina  
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), fluorescentna boja koja boji DNA (jezgre stanica)  
E14,5 (*engl.* embryonic day), zametak u starosti 14,5 dana  
EGF (*engl.* epidermal growth factor), epidermalni čimbenik rasta  
FGF (*engl.* fibroblast growth factor), fibroblastni čimbenik rasta  
GFP (*engl.* green fluorescent protein), zelena fluorescentna bjelančevina  
GFAP (*engl.* glial fibrillary acidic protein), kisela glijalna fibrilarna bjelančevina  
ICC (*engl.* immunocytochemistry), imunocitokemija  
MAP2 (*engl.* microtubule associated protein), bjelančevina povezana s mikrotubulima  
PBS (*engl.* phosphate buffered saline), puferirana otopina fosfatnih soli  
PFA (*engl.* paraformaldehyde), paraformaldehid  
RFP (*engl.* red fluorescent protein, RFP), crvena fluorescentna bjelančevina  
RT-PCR (*engl.* real time – polymerase chain reaction), lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu  
SVZ (*engl.* subventricular zone), subventrikularna zona  
THY1 (*engl.* thymus cell antigen 1), antigen timusnih stanica  
VZ (*engl.* ventricular zone), ventrikularna zona  
YFP (*engl.* yellow fluorescent protein), žuta fluorescentna bjelančevina

## Popis priloga:

**Tablica 1.** Esej, proizvođač i kataloški broj.

**Tablica 2.** Primarna protutijela upotrijebljena u istraživanju.

**Tablica 3.** Sekundarna protutijela upotrijebljena u istraživanju.

**Slika 1.** Diferencijacija stanica od zigote do potpuno diferencirane stanice. Oplodnjom i posljedičnim staničnim diobama nastaje blastocista u kojoj embrionalne matične stanice tvore embrioblast od kojeg će se pod utjecajem različitih čimbenika razviti svi organi i organski sustavi. Od pluripotentne embrionalne matične stanice razvit će se multipotentna živčana matična stanica od koje će se pod utjecajem brojnih čimbenika diferencirati neuroni, astrociti, oligodendrociti te stanice mikroglije. Osim toga u *in vitro* uvjetima potpuno zrele somatske stanice (npr. fibroblasti) mogu se re-programirati do matične stanice te naknadno diferencirati u željenu vrstu stanica. Preuzeto i prilagođeno od (OLYNIK i RASTEGAR, 2012.).

**Slika 2.** Tijekom ranog embrionalnog razvoja živčane matične stanice povećavaju svoj broj simetričnim diobama. Kasnije od tih stanica asimetričnim diobama razvit će se neuroni, astrociti i oligodendrociti. Sve se to zbiva vrlo rano tijekom embrionalnog razvoja od neuroepitela rane neuralne cijevi (ventrikularna zona, VZ). Sazrijevanjem neuralne cijevi razvija se subventrikularna zona (SVZ) u kojoj se matične stanice zadržavaju tijekom čitavog života. Preuzeto i prilagođeno od (OLYNIK i RASTEGAR, 2012.).

**Slika 3.** Prikaz amplifikacije Nestina i  $\beta$ -Actina tijekom izvođenja RT-PCR-a. Svih pet gena prelazi prag detekcije u 14.–18. ciklusu što je na grafu prikazano krivuljama različitih boja koje imaju isti uzorak. Isprekidane plave crte predstavljaju negativnu kontrolu u kojoj nema uzorka (cDNA) pa do amplifikacije nije moglo doći.

**Slika 4. A)** Izražaj Nestina tijekom diferencijacije stanica. Izražaj je najjači tijekom nultog dana diferencijacije odnosno u živčanim matičnim stanicama. Sazrijevanjem stanica dolazi do smanjivanja izražaja Nestina. **B)** 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. **C)** 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 prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica (0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije), a na Y osi prikazana je razina izražaja Nestina (A), MAP2 (B) i GFAP-a (C); na stupcima je prikazana standardna pogreška aritmetičke sredine, a simbol (\*\*\*\*) predstavlja statistički značajnu razliku između pojedinih vremenskih točki.

**Slika 5.** A) Izražaj Neurologina1 tijekom diferencijacije stanica. B) Izražaj Synapsina1 tijekom diferencijacije stanica. Razina izražaja oba sinaptička biljega povećava se za 70% od početne vrijednosti (0 dan) tijekom diferencijacije stanica. Legenda: na X osi prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica (0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije), a na Y osi prikazana je razina izražaja Neurologina1 (A) i Synapsina1 (B); na stupcima je prikazana standardna pogreška aritmetičke sredine, a simbol (\*\*\*\*) predstavlja statistički značajnu razliku između pojedinih vremenskih točki ( $p < 0.0001$ ).

**Slika 6.** Imunocitokemija THY1 – YFP stanica (zeleno) tijekom diferencijacije. Na slici A-C prikazano je bojanje Nestinom (crveno) nultog dana diferencijacije; D-F 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. Mjerka = 50  $\mu\text{m}$ .

**Slika 7.** Izražaj sinaptičkih biljega tijekom diferencijacije stanica. Na slici A-C prikazano je bojanje Neurologina1 (zeleno) i MAP2-om (crveno) prvog dana diferencijacije; D-E prikazano je bojanje Synapsina1 (zeleno) i MAP2-om (crveno) sedmog dana diferencijacije. Mjerka = 50  $\mu\text{m}$ .

**Slika 8.** Imunocitokemija THY1 – YFP stanica (zeleno) tijekom sedmog dana diferencijacije. Na slici A-C prikazano je bojanje s MAP2 (crveno), a na slici D-E prikazano je bojanje s GFAP-om (crveno). Prikaz stanica napravljen je s 63x objektivom i super-rezolucijom. Mjerka = 10  $\mu\text{m}$ .

**Slika 9.** Imunocitokemija THY1 – YFP stanica (zeleno) tijekom sedmog dana diferencijacije. Na slici A-D prikazano je konfokalna slika u maksimalnoj projekciji, a na slici E-H iste stanice nakon analize pomoću IMARIS softvera. Na slici I prikazano je Pearsonov koeficijent kolokalizacije između YFP i GFAP-a, između YFP i ukupne populacije MAP2+ stanica te

između YFP i MAP2+ stanica koje su YFP+. Na stupcima je prikazana standardna pogreška aritmetičke sredine. Mjerka = 10  $\mu$ m.

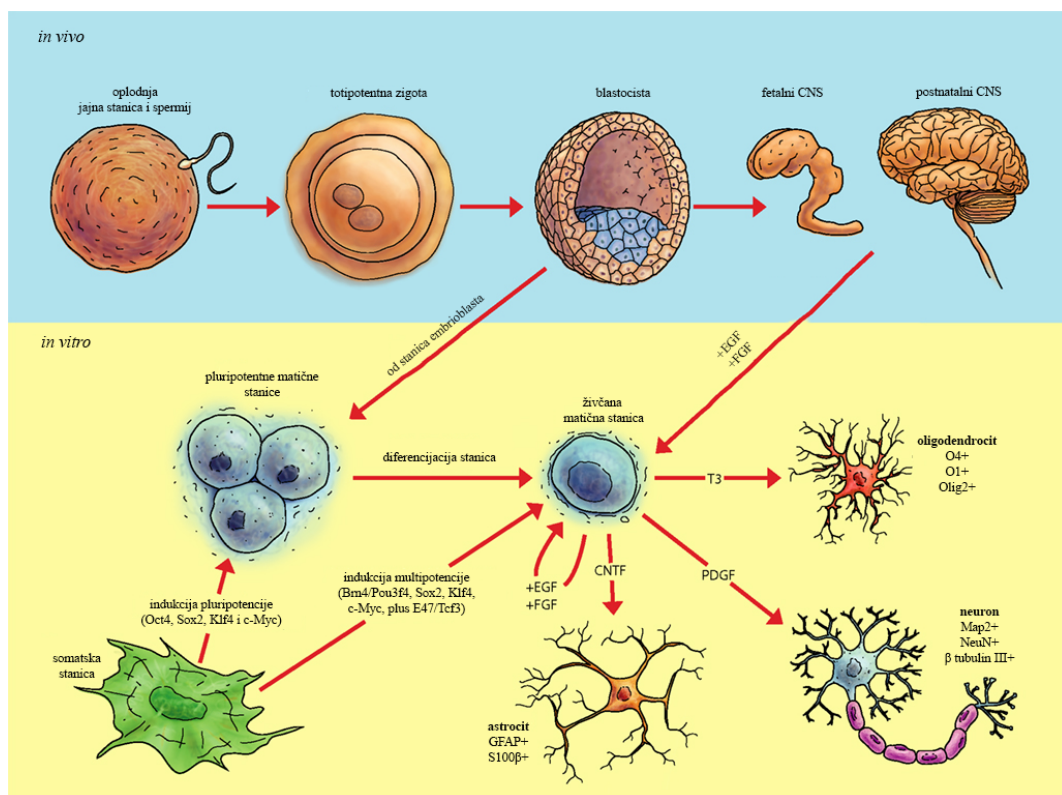


## SADRŽAJ

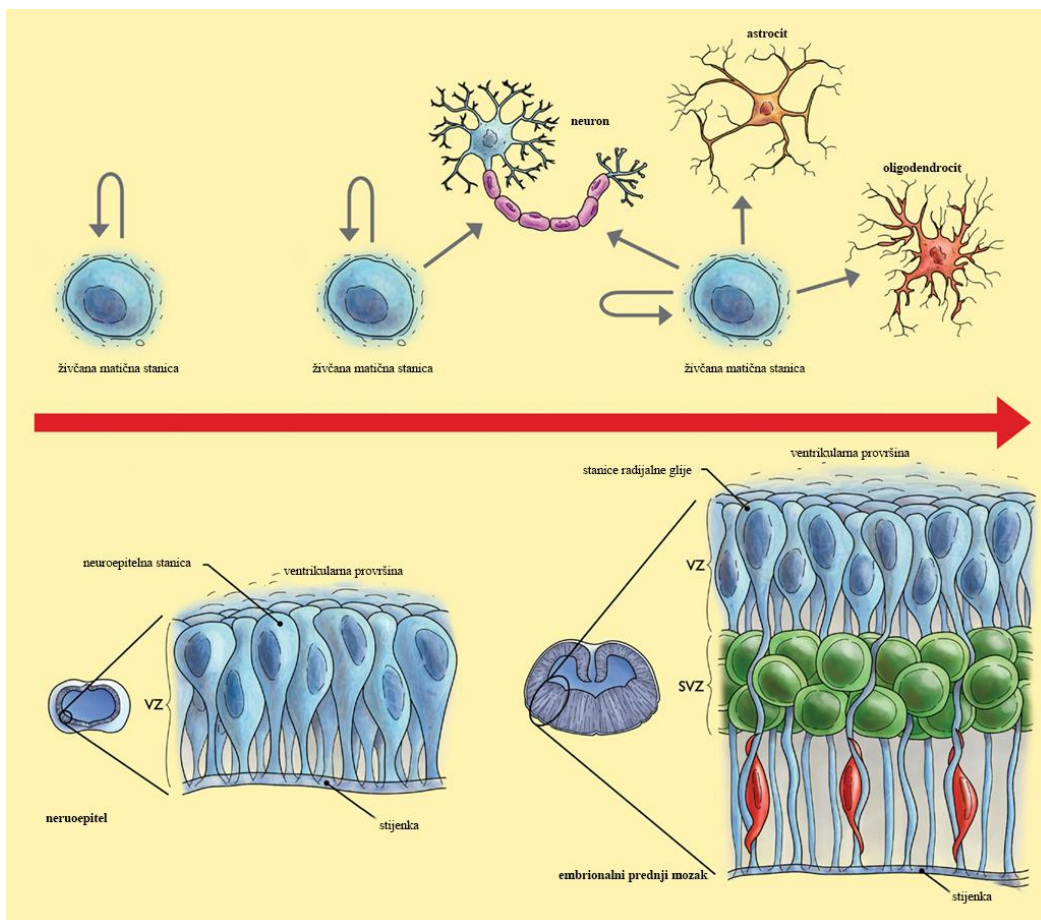
<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA</b> .....	4
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	7
3.1. Životinje.....	7
3.2. Izolacija živčanih matičnih stanica .....	7
3.3. Priprema podloga za diferencijaciju stanica.....	7
3.4. Diferencijacija stanica .....	8
3.5. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR, <i>engl.</i> real time – polymerase chain reaction) .....	8
3.6. Imunocitokemija (ICC).....	9
3.7. Statistička analiza rezultata.....	10
<b>4. REZULTATI</b> .....	11
4.1. RT-PCR .....	12
4.2. Imunocitokemija (ICC).....	15
<b>5. RASPRAVA</b> .....	20
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	23
<b>7. POPIS LITERATURE</b> .....	24
<b>8. SAŽETAK</b> .....	28
<b>9. SUMMARY</b> .....	29
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	30

# 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 (Slika 1 i Slika 2). 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 zratom sloju hipokampusa (GAGE, 2000.; MITREČIĆ i sur., 2009.; WATSON i sur., 2012.).



**Slika 1.** Diferencijacija stanica od zigote do potpuno diferencirane stanice. Oplodnjom i posljedičnim staničnim diobama nastaje blastocista u kojoj embrionalne matične stanice tvore embrioblast od kojeg će se pod utjecajem različitih čimbenika razviti svi organi i organski sustavi. Od pluripotentne embrionalne matične stanice razvit će se multipotentna živčana matična stanica od koje će se pod utjecajem brojnih čimbenika diferencirati neuroni, astrociti, oligodendrociti te stanice mikroglije. Osim toga u *in vitro* uvjetima potpuno zrele somatske stanice (npr. fibroblasti) mogu se re-programirati do matične stanice te naknadno diferencirati u željenu vrstu stanica. Preuzeto i prilagođeno od (OLYNIK i RASTEGAR, 2012.).



**Slika 2.** Tijekom ranog embrionalnog razvoja živčane matične stanice povećavaju svoj broj simetričnim diobama. Kasnije od tih stanica asimetričnim diobama razvit će se neuroni, astrociti i oligodendrociti. Sve se to zbiva vrlo rano tijekom embrionalnog razvoja od neuroepitela rane neuralne cijevi (ventrikularna zona, VZ). Sazrijevanjem neuralne cijevi razvija se subventrikularna zona (SVZ) u kojoj se matične stanice zadržavaju tijekom čitavog života. Preuzeto i prilagođeno od (OLYNIK i RASTEGAR, 2012.).

U istraživanjima diferencijacije živčanih matičnih stanica veliku ulogu imaju različiti sojevi miševa. Osim uobičajenih sojeva, tzv. „divlji tip“ (*engl.* wild type), 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).

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

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

Kako je već navedeno u uvodnom dijelu, u istraživanjima iz područja neuroznanosti, posebice u istraživanjima diferencijacije živčanih matičnih stanica veliku ulogu imaju različiti animalni modeli, prvenstveno miševi. Od tzv. „divljeg tipa“ miša, genetskim manipulacijama uzgojeni su različiti sojevi miševa kao što su npr. „knock-out“, „knock-in“ ili pak transgenični sojevi miševa 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 [žuta (*engl.* yellow fluorescent protein, YFP), crvena (*engl.* red fluorescent protein, RFP) ili zeleno-plava (*engl.* cyan fluorescent protein, CFP)], 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 gotovo dvadesetak godina, uzorak fluorescencije u svih sojeva 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; ALIĆ i sur., 2016.). U navedenom istraživanju opisana je pojava izražaja THY1 – YFP te usporedba s brojnim biljezima matičnih stanica, neurona i astrocita. Kao nastavak ovog istraživanja, nakon transplantacije THY1 – YFP stanica u mozak miša s moždanim udarom kao i pripadajućih kontrolnih skupina opisan je izražaj gena uključenih u programiranu staničnu smrt (HRIBLJAN i sur., 2018.).

Izražaj YFP-a opisan je i u projekcijskim neuronima, uključujući i ganglijske stanice mrežnice (MITREČIĆ i sur., 2017.; GRILLO i STELLA, 2018.). Izražaj YFP-a, osim tijekom fiziološkog razvoja oka i kasnije u odrasle jedinke, od velike je pomoći u istraživanjima različitih patoloških stanja (HANLON i sur., 2017.). Isto tako izražaj YFP-a opisan je i u

različitim ganglijima perifernog živčanog sustava, kao što su trigeminalni i vagusni ganglij te spinalni gangliji (TAYLOR-CLARCK i sur., 2015.).

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. Budući da se u ovoj skupini nalazi preko stotinu različitih biljega u ovom istraživanju će se koristiti svega pet osnovnih biljega koji su, prema dostupnim podacima iz literature najčešće korišteni i jedni su od najvažnijih biljega tijekom diferencijacije i sinaptogeneze stanica. Biljezi koji će se detaljno prikazati u ovom istraživanju su: Nestin (biljeg živčanih matičnih stanica), MAP2 (biljeg neurona), GFAP (biljeg astrocita) te Neuroligin1 (post-sinaptički biljeg) i Synapsin1 (pre-sinaptički biljeg).

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) sastavni je dio citoskeleta neurona i ima važnu ulogu tijekom diferencijacije stanica. Ovaj biljeg ima veliku ulogu tijekom neurogeneze, a izražen je preventivno u dendritima (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 zrelih staničnim kulturama, odnosno tek krajem fetalnog razdoblja ili čak nakon rođenja jedinke (GOMES i sur., 1999.).

Sinaptogeneza je izrazito složen proces koji se zbiva u nekoliko glavnih faza. U prvoj fazi se inducira stvaranje sinapsi nakon uspostave međustaničnog kontakta. Na mjesto budućih sinapsi se potom privuku i ostale sinaptičke bjelančevine koje omogućuju daljnju izgradnju. U posljednjoj fazi, koja je i najdulja, dolazi do postupnog sinaptičkog sazrijevanja (CHIA i sur.,

2013). Iako se ovaj proces zbiva vrlo polagano, smatra se jednim od temeljnih procesa koji se zbivaju tijekom rasta i razvoja neurona. 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.).

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Životinje**

Životinje su smještene u nastambi Hrvatskog instituta za istraživanje mozga na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Uvjeti smještaja i držanja laboratorijskih i pokusnih životinja propisani su Pravilnikom o zaštiti životinja (NN 47/2001) i Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/2006); svjetlosni ciklus je 12 sati svijetlo i 12 sati mrak, hrana i svježa voda su *ad libitum*, temperatura u objektu je  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , relativna vlaga  $55\% \pm 10\%$ , dok je osvjetljenje 300 luksa.

#### **3.2. Izolacija živčanih matičnih stanica**

Za izolaciju živčanih matičnih stanica korištene su dvije 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  $37^\circ\text{C}$ . 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  $\mu\text{L}$  B-27 (B-27®Supplement (50X), Gibco by life Technologies), 250  $\mu\text{L}$  N-2 (N-2 Supplement (100X), Gibco by life Technologies), 250  $\mu\text{L}$  Pen Strep (Penicillin Streptomycin, Gibco by life Technologies), 50  $\mu\text{L}$  FGFb (Recombinant Mouse Fibroblast Growth Factor-basic) i 50  $\mu\text{L}$  EGF (Recombinant Mouse Epidermal Growth Factor). Stanice su uzgajane do pojave neurosfera, nakon čega su disocirane i pripremljene za nasađivanje.

#### **3.3. Priprema podloga za diferencijaciju stanica**

Stanice su uzgajane na podlogama obloženim Poly-D-lizinom u koncentraciji 500  $\mu\text{g/mL}$  (Poly-D-lysine hydrobromide, SIGMA) koji je stajao 24 sata. Nakon ispiranja Poly-D-lizina sterilnom vodom, podloge su obložene lamininom u koncentraciji 10  $\mu\text{g/mL}$  (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. dan 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.

### **3.4. 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).

### **3.5. 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, Neuroligin1 i Synapsin1), dok je kao kontrola odnosno „housekeeping“ gen korišten β-Actin (ACTB MGB) (TaqMan Gene Expression Assays). U Tablici 1 navedeni su eseji, proizvođač i kataloški broj. Svi uzorci napravljeni 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  $2^{-\Delta CT}$ .

**Tablica 1.** Esej, proizvođač i kataloški broj.

Esej	Proizvođač	Kataloški broj
GFAP	Applied Biosystems	Mm01253033_m1
MAP2	Applied Biosystems	Mm00485231_m1
Nestin	Applied Biosystems	Mm00450205_m1
Neurologin1	Applied Biosystems	Mm02344305_m1
Synapsin1	Applied Biosystems	Mm00449772_m1
FG-MOUSE ACTB MGB	Applied Biosystems	4352933E

### 3.6. Imunocitokemija (ICC)

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  $\mu$ 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 na stanice dodano 85  $\mu$ L otopine primarnog protutijela (0,2% triton X-100 u PBS-u + 1% kozjeg seruma + primarno protutijelo) koje je inkubirano u frižideru na +4°C preko noći. Primarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju navedena 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) koja su inkubirana dva sata na sobnoj temperaturi u zamračenoj prostoriji. Sekundarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju navedena 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, pohranjeni su u frižideru na +4°C do mikroskopiranja na konfokalnom mikroskopu (Zeiss).

**Tablica 2.** Primarna protutijela upotrijebljena u istraživanju.

Protutijelo	Podrijetlo	Razrjeđenje	Proizvođač
GFAP	pile	1:250	Abcam (ab4674)
MAP2	pile	1:1000	Abcam (ab5392)
Nestin	miš	1:200	Millipore (MAB353)
Neurologin1	kunić	1:200	Millipore (AB15512)
Synapsin1	kunić	1:100	Cell Signaling (#2312)

**Tablica 3.** Sekundarna protutijela upotrijebljena u istraživanju.

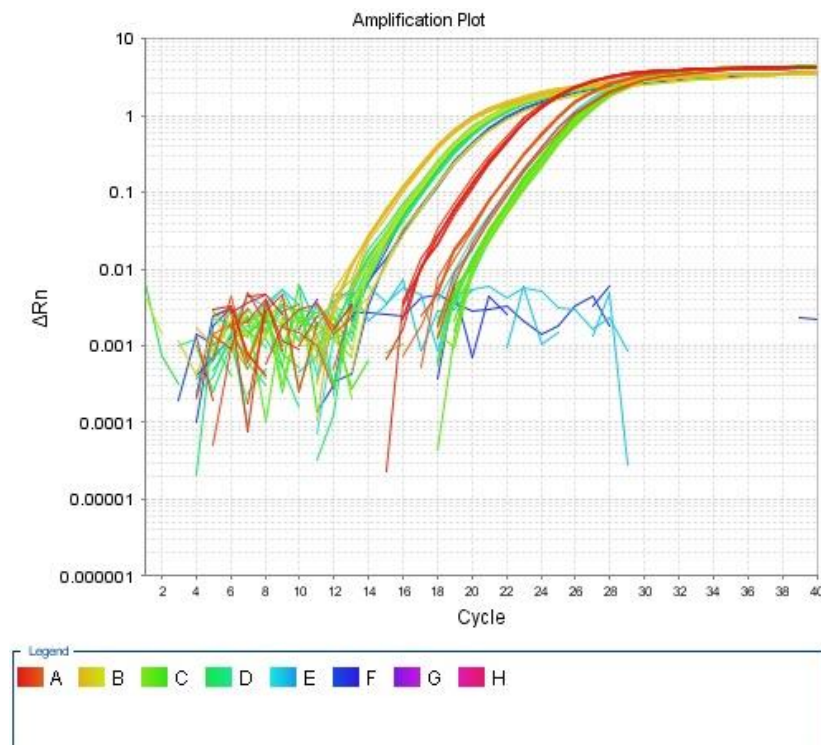
Protutijelo	Razrjeđenje	Proizvođač
Alexa Fluor 488 koza anti - kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11034)
Alexa Fluor 546 koza anti - kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11010)
Alexa Fluor 546 koza anti - miš IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11003)
Alexa Fluor 546 koza anti - pile IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11040)

### 3.7. Statistička analiza rezultata

Rezultati RT-PCR-a napravljeni su u triplicatu, a rezultati su analizirani pomoću formule  $2^{-\Delta CT}$ . Iz dobivenih vrijednosti izračunata je prosječna vrijednost, standardna devijacija te standardna pogreška aritmetičke sredine čije su vrijednosti prikazane na grafikonima. Kako bi se odredila statistička značajnost između dvije vrijednosti korišten je studentski t-test, dok su za usporedbu više uzoraka korišteni jednosmjerna ANOVA i Holm-Bonferroni analiza: [http://astatsa.com/OneWay\\_Anova\\_with\\_TukeyHSD](http://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD). Fluorescentne slike nakon analize na konfokalnom mikroskopu obrađene su pomoću IMARIS x64-v9.1.2. (BITPLANE, An Oxford Instruments Co., Zurich, Switzerland) software-a te je izračunat Pearsonov koeficijent kolokalizacije. Statistička značajnost prikazana je pomoću (\*) te se razlikuje ukoliko je:  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,01$  (\*\*),  $P < 0,001$  (\*\*\*),  $P < 0,0001$  (\*\*\*\*).

## 4. REZULTATI

Kako bi se napravila analiza izražaja gena tijekom diferencijacije neurona, 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. Analizirani geni prelaze prag detekcije u 14.–18. ciklusu umnažanja (Slika 3). 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.

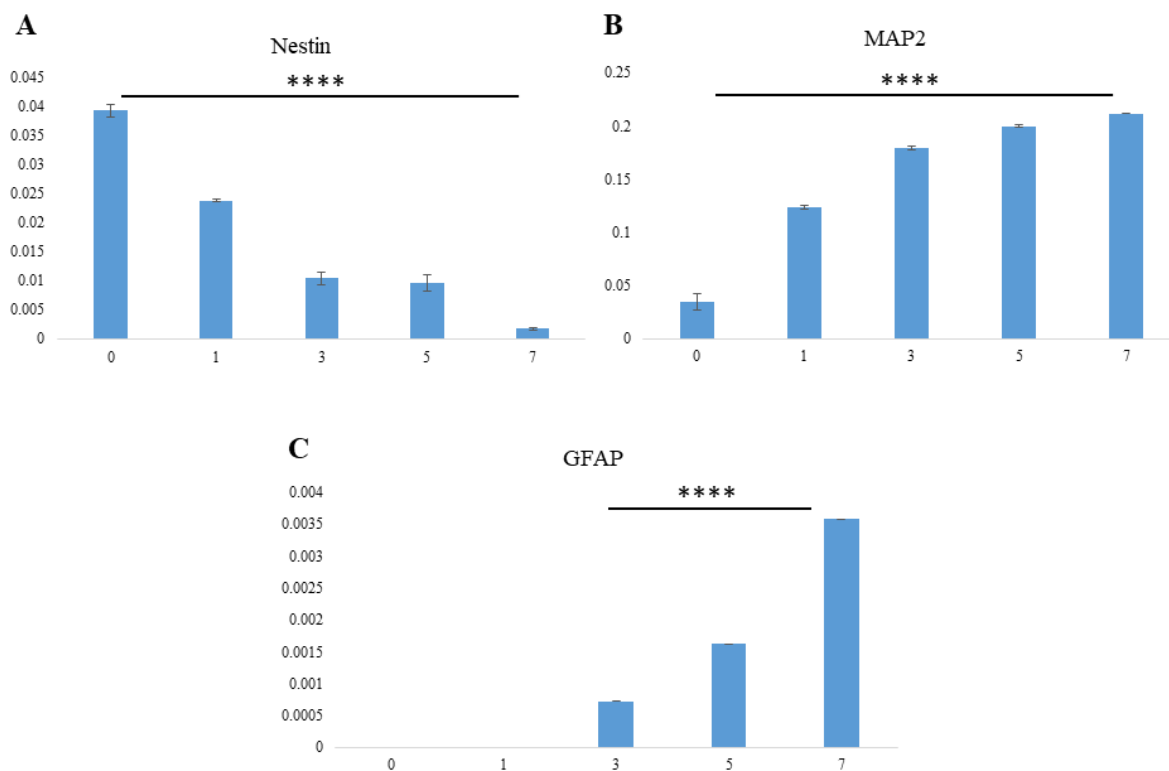


**Slika 3.** Prikaz amplifikacije Nestina i  $\beta$ -Actina tijekom izvođenja RT-PCR-a. Svih pet gena prelazi prag detekcije u 14.–18. ciklusu što je na grafu prikazano krivuljama različitih boja koje imaju isti uzorak. Isprekidane plave crte predstavljaju negativnu kontrolu u kojoj nema uzorka (cDNA) pa do amplifikacije nije moglo doći.

#### 4.1. RT-PCR

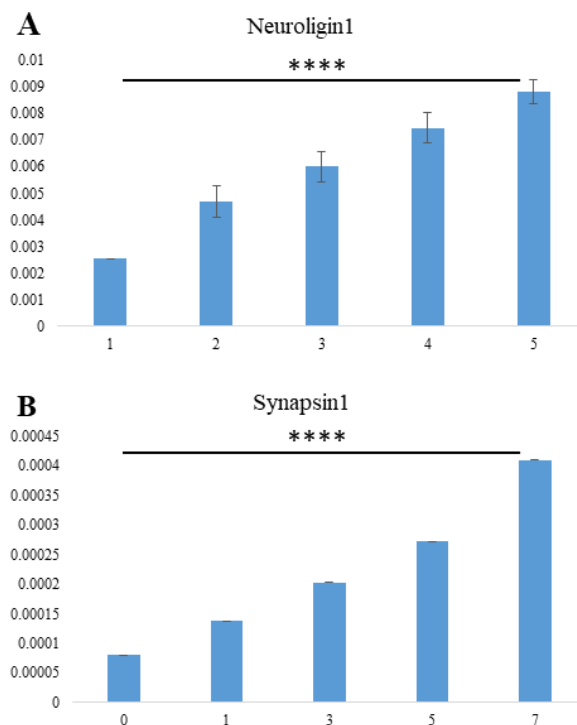
Tijekom diferencijacije THY1 – YFP stanica, razina izražaja Nestina najviša je nultog dana diferencijacije, odnosno u živčanih matičnih stanica. Tijekom prvog dana diferencijacije, razina izražaja Nestina još je uvijek visoka, ali je ipak 40% manja u odnosu na živčane matične stanice. Trećeg dana diferencijacije 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. Tijekom sedam dana diferencijacije razina izražaja Nestina drastično se smanjuje pri čemu je vidljiva statistički značajna razlika između pojedinih vremenskih točki ( $p < 0.0001$ ), koja se ne mijenja nakon Holm-Bonferroni analize (Slika 4A).

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, a statistička značajnost vidljiva je između pojedinih vremenskih točki ( $p < 0.0001$ ) (Slika 4B). 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 (Slika 4C). Izrazito mala razina izražaja biljega astrocita je i očekivana budući da su podloge i medij u kojem se uzgajaju stanice usmjerene ka uzgoju neurona. Iako se radi o izrazito niskim vrijednostima izražaja ovoga biljega, između posljednje tri vremenske točke vidljiva je statistički značajna razlika ( $p < 0.0001$ ). U obje analize, bilo da se radi o neuronima ili astrocitima, visoka statistička značajnost je zadržana i nakon Holm-Bonferroni analize.



**Slika 4. A)** Izražaj Nestina tijekom diferencijacije stanica. Izražaj je najjači tijekom nultog dana diferencijacije odnosno u živčanim matičnim stanicama. Sazrijevanjem stanica dolazi do smanjivanja izražaja Nestina. **B)** 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. **C)** 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 prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica (0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije), a na Y osi prikazana je razina izražaja Nestina (A), MAP2 (B) i GFAP-a (C); na stupcima je prikazana standardna pogreška aritmetičke sredine, a simbol (\*\*\*\*) predstavlja statistički značajnu razliku između pojedinih vremenskih točki.

Osim biljega matičnih stanica, neurona i astrocita određena je i razina izražaja dva sinaptička biljega. Izražaj Neurologina1 javlja se tijekom nultog dana i znatno se pojačava tijekom sedam dana diferencijacije. Razina Neurologina1 od nultog dana do sedmog dana diferencijacije povećava se za 70%, što upućuje na izrazitu sinaptičku aktivnost stanica tijekom diferencijacije (Slika 5A). Izražaj Synapsina1 također se javlja nultog dana diferencijacije i povećava se za 70% tijekom procesa diferencijacije (Slika 5B). Na slikama jasno je vidljiva statistički značajna razlika između pojedinih vremenskih točki ( $p < 0.0001$ ) koja prolazi Holm-Bonferroni analizu. Razina izražaja Neurologina1 kao post-sinaptičkog biljega izrazito je veća u odnosu na Synapsin1 koji je pre-sinaptički biljeg.



**Slika 5. A)** Izražaj Neurologina1 tijekom diferencijacije stanica. **B)** Izražaj Synapsina1 tijekom diferencijacije stanica. Razina izražaja oba sinaptička biljega povećava se za 70% od početne vrijednosti (0 dan) tijekom diferencijacije stanica. Legenda: na X osi prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica (0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije), a na Y osi prikazana je razina izražaja Neurologina1 (A) i Synapsina1 (B); na stupcima je prikazana standardna pogreška aritmetičke sredine, a simbol (\*\*\*\*) predstavlja statistički značajnu razliku između pojedinih vremenskih točki ( $p < 0.0001$ ).

## 4.2. Imunocitokemija (ICC)

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 živčane matične stanice (Nestin), za neurone (MAP2), za astrocite (GFAP) te za sinaptičke biljege (Neuroigin1 i Synapsin1). Budući da je imunocitokemija napravljena na THY1 – YFP stanicama, koje u određenim neuronima izražavaju zelenu fluorescentnu bjelančevinu (488), upotrijebljeno je sekundarno protutijelo u crvenom spektru (568), osim u slučaju sinaptičkih biljega koji su bojani zajedno s MAP2.

Tijekom nultog dana diferencijacije stanica, od ukupnog broja prebrojanih stanica 99% stanica je Nestin pozitivno (Slika 6 A-C). Svega 1% stanica je MAP2 pozitivno, i pokazuje kolokalizaciju s Nestin pozitivnim stanicama.

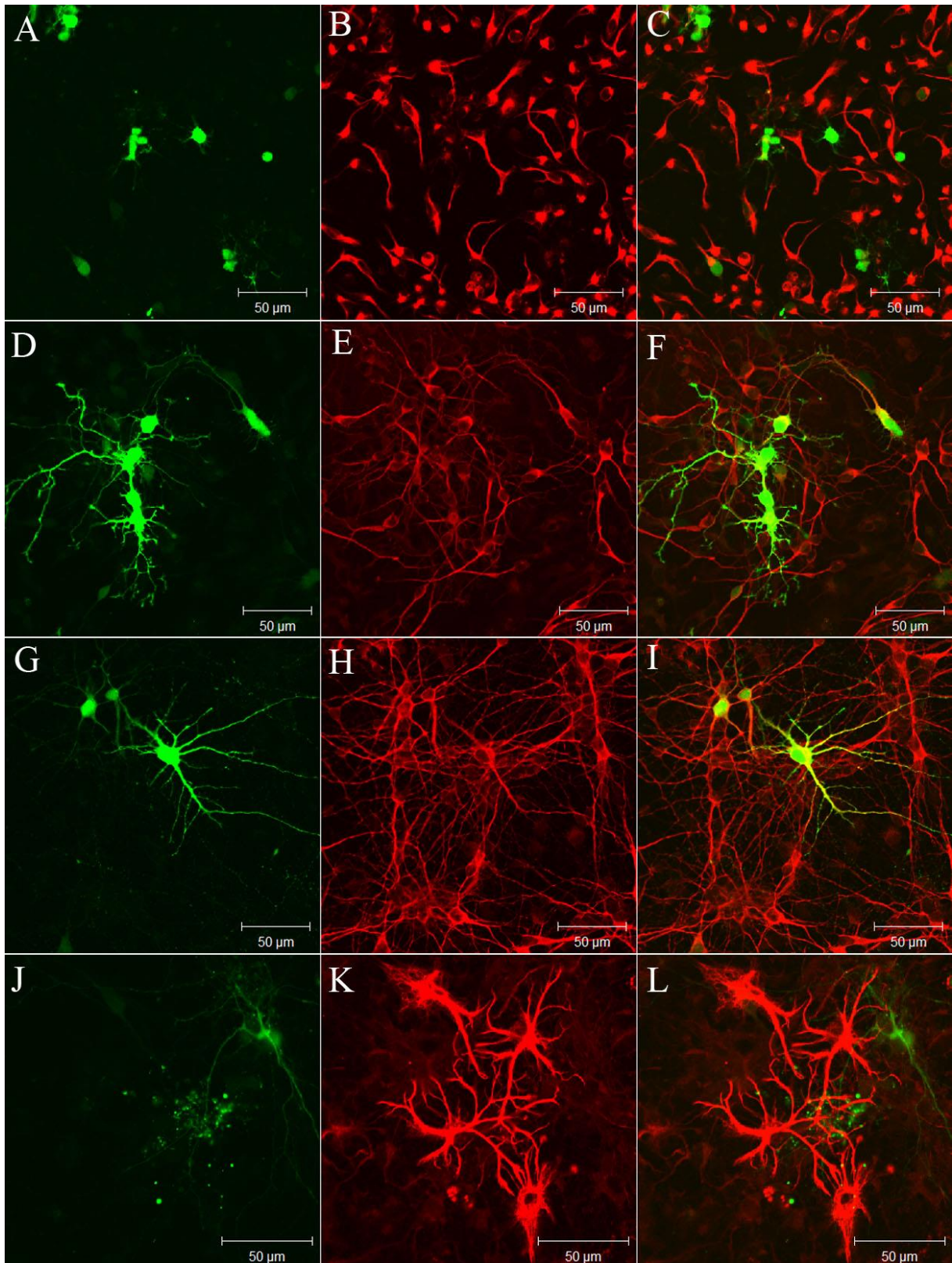
Tijekom prvog dana diferencijacije stanica, 80% stanica je Nestin pozitivno, a udio MAP2 pozitivnih stanica se povećava na 20%. Kako je bilo i očekivano, niti jedna stanica nije GFAP pozitivna.

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 6 D-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 udio MAP2 (Slika 6 G-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 6 J-L) pozitivnih stanica narastao na 3%.

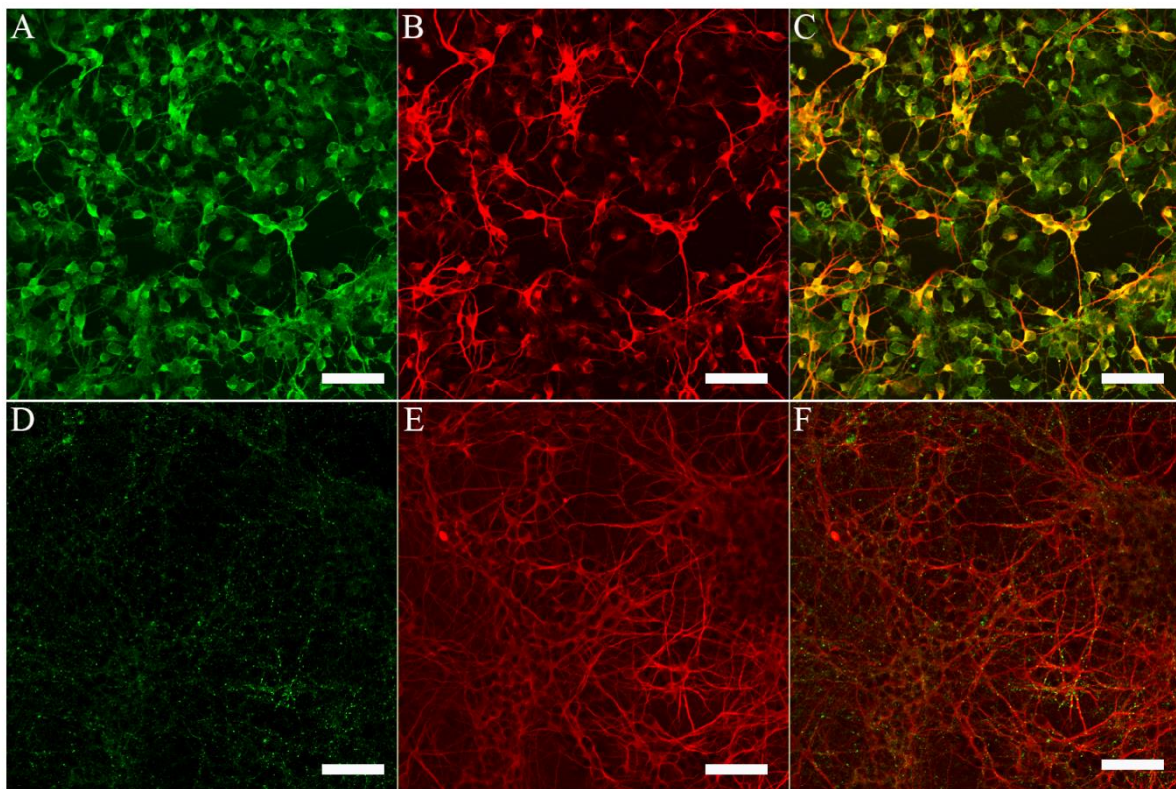




**Slika 6.** Imunocitokemija THY1 – YFP stanica (zeleno) tijekom diferencijacije. Na slici A-C prikazano je bojanje Nestinom (crveno) nultog dana diferencijacije; D-F prikazano je bojanje s MAP2 (crveno) trećeg dana diferencijacije; G-I prikazano je bojanje s MAP2 (crveno) sedmog

dana diferencijacije te na slici J-L bojanje s GFAP-om (crveno) sedmog dana diferencijacije. Mjerka = 50  $\mu\text{m}$ .

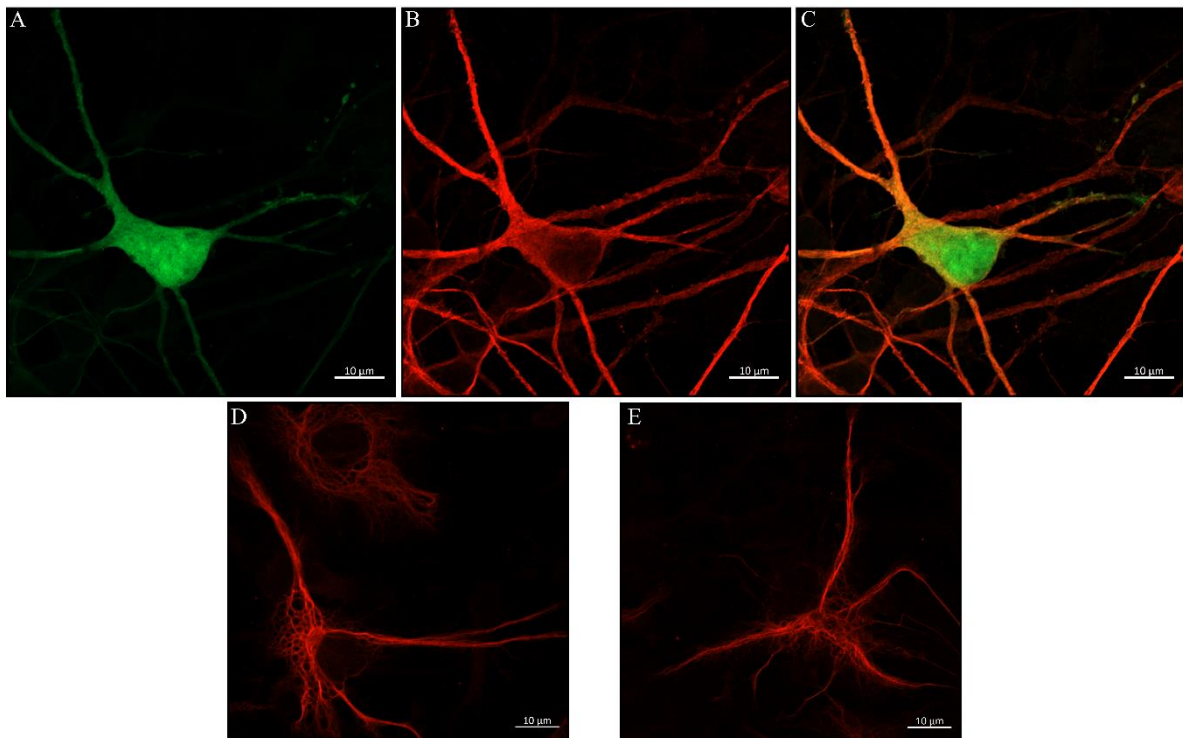
Osim biljezima karakterističnim za matične stanice, neurone ili astrocite, stanice su obojane i sa sinaptičkim biljezima, Neuroligin1 i Synapsin1 koji su pozitivni već u stadiju matičnih stanica tj nultog dana diferencijacije. Sazrijevanjem stanica dolazi do značajnog povećanja izražaja oba ova biljega što upućuje na snažnu sinaptičku aktivnost neurona i astrocita te njihovu funkcionalnu zrelost (Slika 7). Rezultati bojanja pokazuju isti uzorak kao i RT-PCR rezultat tj. izražaj oba biljega se znatno pojačava tijekom diferencijacije stanica, ali je intenzitet Neuroligin1 dvostruko jači od Synapsin1 što u potpunosti odgovara prethodnom rezultatu.



**Slika 7.** Izražaj sinaptičkih biljega tijekom diferencijacije stanica. Na slici A-C prikazano je bojanje Neuroliginom1 (zeleno) i MAP2-om (crveno) prvog dana diferencijacije; D-E prikazano je bojanje Synapsinom1 (zeleno) i MAP2-om (crveno) sedmog dana diferencijacije. Mjerka = 50  $\mu\text{m}$ .

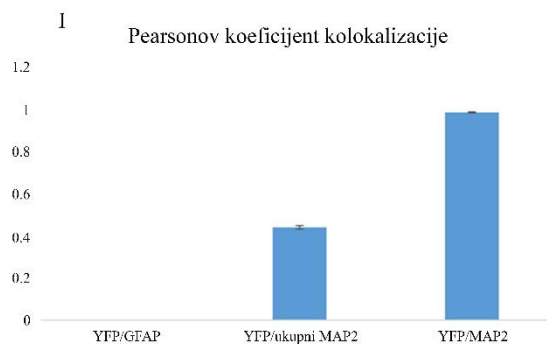
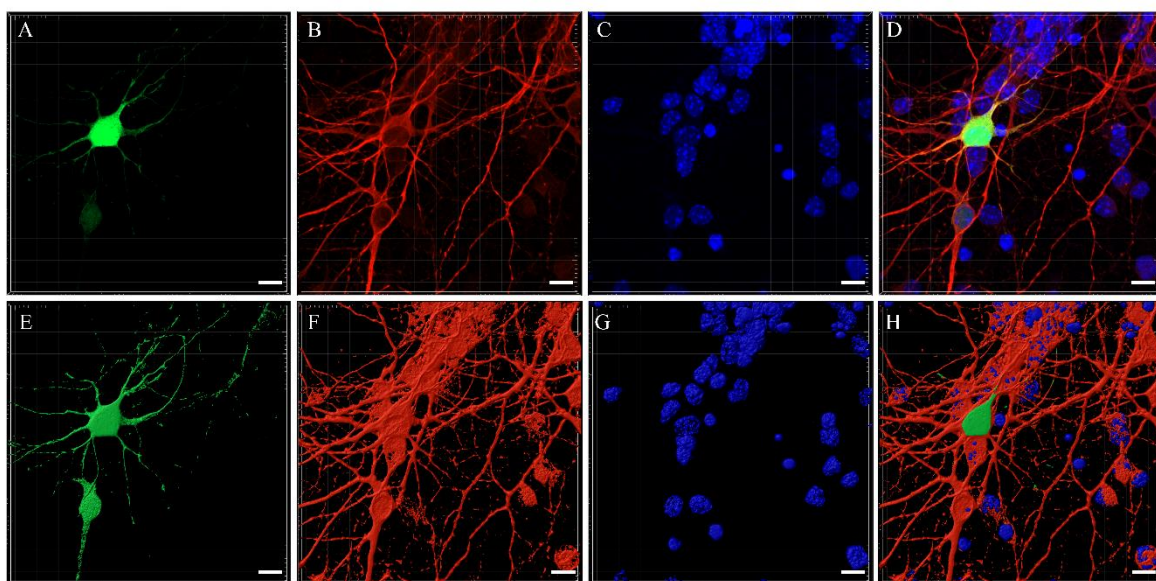


Budući da je imunocitokemija napravljena na transgeničnim stanicama koje u pojedinim neuronima izražavaju YFP, prebrojavanjem je utvrđeno da se tijekom diferencijacije stanica u *in vitro* uvjetima pojavljuje svega 20% YFP pozitivnih stanica i taj broj ne mijenja se tijekom diferencijacije stanica. Za potrebe ovog istraživanja stanice su analizirane pomoću konfokalnog mikroskopa s Airyscanom (super-rezolucija), zahvaljujući kojoj je prikazana vrlo precizna i detaljna mikrotubularna građa MAP2 pozitivnih neurona, kao i savršena kolokalizacija s YFP (Slika 8 A-C) te građa astrocita sedmog dana diferencijacije (Slika 8 D-E).



**Slika 8.** Imunocitokemija THY1 – YFP stanica (zeleno) tijekom sedmog dana diferencijacije. Na slici A-C prikazano je bojanje s MAP2 (crveno), a na slici D-E prikazano je bojanje s GFAP-om (crveno). Prikaz stanica napravljen je s 63x objektivom i super-rezolucijom. Mjerka = 10 μm.

Pomoću IMARIS x64-v9.1.2. software-a izračunat je Pearsonov koeficijent kolokalizacije koji pokazuje visoke vrijednosti između THY1 – YFP i MAP2 pozitivnih stanica (Slika 9). Rezultati ove analize također pokazuju da nema kolokalizacije između THY1 – YFP pozitivnih stanica i astrocita (GFAP), Pearsonov koeficijent = 0. Pearsonov koeficijent između THY1 – YFP i svih MAP2 pozitivnih stanica iznosi 0,446. U sljedećem koraku izračunat je Pearsonov koeficijent između THY1 – YFP i MAP2, ali samo u ograničenoj populaciji MAP2 stanica koje su i YFP pozitivne te u tom slučaju njegova vrijednost iznosi 0,992 od maksimalnih 1,0 (Slika 9I).



**Slika 9.** Imunocitokemija THY1 – YFP stanica (zeleno) tijekom sedmog dana diferencijacije. Na slici A-D prikazano je konfokalna slika u maksimalnoj projekciji, a na slici E-H iste stanice nakon analize pomoću IMARIS softvera. Na slici I prikazn je Pearsonov koeficijent kolokalizacije imeđu YFP i GFAP-a, između YFP i ukupne populacije MAP2+ stanica te između YFP i MAP2+ stanica koje su YFP+. Na stupcima je prikazana standardna pogreška aritmetičke sredine. Mjerka = 10  $\mu$ m.

## 5. RASPRAVA

Na živčanim matičnim stanicama napravljena je analiza izražaja gena tijekom diferencijacije stanica u pet vremenskih točaka (0., 1, 3., 5. i 7. dan diferencijacije). Svi uzorci rađeni su u triplikatu kako bi se izbjegla pogreška i smanjila varijabilnost između pojedinih uzoraka. Na uzorcima je određena razina izražaja biljega za živčane matične stanice (Nestin), neurone (MAP2), astrocite (GFAP) te dva sinaptička biljega (Neurologin1 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 stanica, budući da zrele stanice nisu Nestin pozitivne. Rezultati RT-PCR-a u potpunosti se podudaraju s 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 s 30 na 15%. Ovakav nalaz objašnjava se smanjivanjem fluorescentnog signala sazrijevanjem stanica, ali stanice još uvijek imaju veliku, gotovo jednaku vrijednost izražaja na razini nukleinskih kiselina.

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 6A-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-a potvrđuju izražaj MAP2 u živčanim 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 upućuje da je dio stanica predodređen da postanu astrociti te se „pripremaju“ u diferencijaciju. Međutim, imunocitokemijski u ovoj vremenskoj točki stanice, predodređeni budući astrociti još uvijek ne izražavaju GFAP. Ovakav nalaz odgovara i nalazu YUASA (2001.) koji opisuje da razvoju astrocita, 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 6. 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 neurona. 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 Neuroligin1 je izrazito veća od razine Synapsina1, što upućuje na veću važnost ovog biljega tijekom same diferencijacije stanica. Rezultati RT-PCR-a u potpunosti odgovaraju i rezultatima imunocitokemije (Slika 7) gdje se vidi znatno jači signal Neuroligin1 trećeg dana diferencijacije u odnosu na Synapsin1 sedmog dana diferencijacije stanica. Ovaj nalaz odgovara nalazu BEMBEN i sur. (2014.) i potvrđuje veliku važnost Neuroligin1 kao adhezijske molekule tijekom neurogeneze. S druge strane, Synapsin1 je važan za razvoj aksona i samu diferencijaciju stanica pa je porast također očit tijekom diferencijacije (HEDEGAARD i sur., 2013.). Sličan rezultat, ali na razini bjelančevina (Western Blot analizom) opisan je u istraživanju KOSI i sur. (2018.).

Korištenjem jednog od najsuvremenijih mikroskopa (ZEISS, LSM800 s Airyscanom) napravljena je analiza stanica u super-rezoluciji. Kao što je prikazano na Slici 8 vidljiva je vrlo precizna mikroskopska građa stanice na visokom povećanju i u neusporedivo boljoj rezoluciji u odnosu na Sliku 6. Zahvaljujući najsuvremenijoj opremi moguće je 100% sigurnošću raditi histološka istraživanja bez straha o lažno pozitivnom signalu. Isto tako uređaji sa super-rezolucijom nam omogućuju vrlo detaljnu i preciznu vizualizaciju najsitnijih staničnih organela, kao što su sinaptički mjehurići te na taj način uvelike doprinose njihovoj analizi. Nakon takve analize stanica izračunat je i Pearsonov koeficijent kolokalizacije koji nam kazuje koliko se dva signala THY1 – YFP i MAP2 podudaraju. Za izračunavanje ovog koeficijenta sve slike snimljene su u maksimalnoj (3D) projekciji, a pomoću IMARIS-a izračunat je koeficijent kolokalizacije (Slika 9).

Diplomski rad temelji se na rezultatima studentskog znanstvenog rada Ante Stojanca [STOJANAC, A. (2016): Analiza izražaja gena tijekom *in vitro* diferencijacije neurona. Studentski znanstveni rad. Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska.]. Studentski znanstveni rad je kao najbolje ocjenjen rad (završna ocjena: 4,9) na Veterinarskom fakultetu, nagrađen nagradom Rektora. Osim rezultata iz studentskog rada, za potrebe diplomskog rada napravljene su i dodatni rezultati pomoću konfokalnog mikroskopa sa super-rezolucijom (ZEISS, LSM800 s Airyscanom) te analiza istih pomoću IMARIS softvera.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Izražaj Nestina najveći je u živčanih matičnih stanica i znatno se smanjuje do kraja diferencijacije stanica.
2. Izražaj MAP2 javlja se u živčanih matičnih stanica i naglo raste do kraja diferencijacije stanica u neurone.
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 GFAP pozitivne.
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 Neurologina1 u odnosu na Synapsin1.
5. Pearsonov koeficijent kolokalizacije iznosi 0,446 (YFF/ukupna populacija MAP2) te 0,992 od maksimalnih 1,0 u populaciji MAP2+ stanica koje su i YFP+



## 7. 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.

ALIĆ, I., N. KOSI, K. KAPURALIN, D. GORUP, S. GAJOVIĆ, R. POCHET, D. MITREČIĆ (2016): Neural stem cells from mouse strain Thy1 YFP are a valuable tool to monitor and evaluate neuronal differentiation and morphology. *Neurosci lett* 634, 32–41.

ANONYMOUS (2019): One-way ANOVA (ANalysis Of VAriance) with post-hoc Tukey HSD (Honestly Significant Difference) Test Calculator for comparing multiple treatments [citirano 09. 04. 2019.] Dostupno na: <http://astatsa.com/OneWayAnovaWithTukeyHSD/>

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. *Nat Neurosci* 17, 56–64.

CHIA, P., H., P. LI, K. SHEN (2013): Cellular and molecular mechanisms underlying presynapse formation. *J Cell Biol* 203, 11–22.

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.

GRILLO, S. L., S. L. STELLA Jr (2018): Melanopsin retinal ganglion cells are not labeled in Thy-1 YFP-16 transgenic mice. *NeuroReport* 29, 118–122

HANLON, K. S., N. CHADDERTON, A. PALFI, A. B. FERNANDEZ, P. HUMPHRIES, P. F. KENNA, S. MILLINGTON-WARD, G.J. FARRAR (2017): A Novel Retinal Ganglion Cell Promoter for Utility in AAV Vectors. *Front Neurosci* 11, doi: 10.3389/fnins.2017.00521.

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.

HRIBLJAN, V., I. SALAMON, A. ĐEMAILI, I. ALIĆ, D. MITREČIĆ (2018): Transplantation of neural stem cells in the mouse model of ischemic brain stroke and expression of genes involved in programmed cell death. *Croat Med J* 50, 203–212.

HYTTEL, P., F. SINOWATZ, M. VEJLSTED (2010): Essentials of Domestic Animal Embryology. Saunders Elsevier. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto.

KOSI, N., I. ALIĆ, I. SALAMON, MITREČIĆ (2018): Stroke promotes survival of nearby transplanted neural stem cells but does not influence their differentiation. *Neurosci Lett* 666, 111–119.

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.

MITREČIĆ, D., I. ALIĆ, D. GORUP. (2017): Stem cells and stroke - how glowing neurons illuminate new paths. *Neurogenesis* 4, DOI:10.1080/23262133.2017.1304847

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.

OLYNIK, B. M., M. RASTEGAR (2012): The genetic and epigenetic journey of embryonic stem cells into mature neural cells. *Front Genet* 3, 1–16.

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.

TAYLOR-CLARCK, T. E., K. Y. WU, J. A. THOMPSON, K. YANG, P. K. BAHIA, J. M. AJMO (2015): Thy1.2 YFP-16 transgenic mouse labels a subset of large-diameter sensory neurons that lack TRPV1 expression. Plos One, doi: 10.1371/journal.pone.0119538.

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.

## 8. 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. Imnositokemijski 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 Neurologin1 jača u odnosu na Synapsin1.

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

## 9. 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 highest Nestin expression was detected on the day zero and expression 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

## 10. 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](mailto: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

### Nagrade i priznanja:

- 2016. Rektorova nagrada

### Aktivnosti tijekom studija:

- Član IVSA Hrvatska (International Veterinary Students Association)
- Sudjelovanje na kongresima:
  1. XXIX EAVA Congress – Stara Zagora, Bugarska
  2. 7<sup>th</sup> Meeting of the Young Generation of Veterinary Anatomists – Leipzig, Njemačka
  3. 8<sup>th</sup> Meeting of the Young Generation of Veterinary Anatomists – Poznan, Poljska
  4. The 6<sup>th</sup> International Congress „Veterinary Science and Profession“
- ERAZMUS+ program “Sycamore Lodge Equine Hospital” 1. travnja – 30 lipnja 2018.

### Publikacije:

- ALIĆ, I., M. ĐURAS GOMERČIĆ, A. **STOJANAC**, T. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, S. KUŽIR, V. GJURČEVIĆ KANTURA (2012): Unilateral agenesis of intercostal muscles in a dog. BJVM, 25–28 July, Stara Zagora, Bulgaria, pp. 129.
- ALIĆ, I., R. REBAC, A. **STOJANAC**, M. ĐURAS, T. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, S. KUŽIR, V. GJURČEVIĆ KANTURA (2013): Persistent left cranial cadinal vein in a dog. Proceedings of the 7<sup>th</sup> Meeting of the Young Generation of Veterinary Anatomists, 17–20 July, Leipzig, Germany, pp. 11.
- TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, T., A. **STOJANAC**, R. REBAC, S. KUŽIR (2015): Comparative arcaezological analysis from two medieval sites. 8<sup>th</sup> Meeting of Young Generation of Veterinary Anatomists (YGVA). 15-17 July, Poznan, Poland, pp. 78.
- **STOJANAC**, A., I. ALIĆ (2017): Analiza izražaja gena tijekom in vitro diferencijacije neurona. Veterinar: časopis studenata veterinarske medicine Zagreb. 55 (2), 2-12.