

**Idegi őssejtek anyagcsere útvonalainak és ionos stimulációra  
adott mozgás válaszainak változása az *in vitro*  
idegsejtképződés során**

Doktori (PhD) disszertáció

Jády Attila Gyula

Témavezető: Dr. Madarász Emília DSc

Belső konzulens: Dr. Karmos György PhD



Pázmány Péter Katolikus Egyetem

Információs Technológiai és Bionikai Kar

Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola

Budapest, 2017

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	2
Rövidítésjegyzék .....	4
Irodalmi áttekintés .....	9
Bevezetés .....	9
Kitekintés: Idegi őssejt és idegsejt képző technikák jelentősége.....	10
Őssejtek .....	14
Embrionális idegi ős és progenitor sejtek.....	16
Agykéreg fejlődése .....	19
Progenitor sejtek és idegsejt előalakok vándorlása a fejlődő előagyban .....	21
Felnőtt kori idegi őssejtek .....	23
Anyagcsere az embrionális fejlődés és a differenciáció során .....	24
Anyagcsere a kifejlett idegszövetben, neuronokban és asztrocitákban .....	28
Vizsgálati modellek .....	34
Az NE-4C idegi őssejtvonal .....	34
A radiális glia jellegű ős/progenitor sejtvonal .....	36
Célkitűzések .....	38
Anyagok és módszerek.....	39
Sejttenyészetek .....	39
NE-4C őssejtek fenntartása .....	39
NE-4C őssejtek differenciálása neuronokká.....	39
Primer neuronális tenyészet izolálása és fenntartása .....	40
Primer asztrocita tenyészetek izolálása és fenntartása.....	40
Anyagcsere vizsgálatok .....	41
MTT redukciós teszt, életképesség mérés .....	41
Sejtanyagcsere mérés oxigénfogyasztás és savasodás alapján .....	42
Génexpresszió meghatározása qPCR-rel.....	45

Immuncitokémia.....	46
Sejtmotilitás vizsgálat elemzése .....	47
Statisztika .....	49
Eredmények.....	50
Anyagcsere sajátságok változása az NE-4C embrionális idegi őssejtek neuron képzése során .	50
Az ioneloszlás változásának hatása radiális glia jellegű sejtek mozgására .....	61
Megbeszélés .....	65
Az anyagcsere változás.....	65
A stimuláció okozta motilitás változása .....	70
Összefoglalás.....	73
Summary.....	75
Hivatkozások.....	77
A szerző publikációi.....	83
Köszönetnyilvánítás .....	84

## Rövidítésjegyzék

ACSF: artificial cerebrospinal fluid, mesterséges agy-gerincvelői folyadék

aIP: apikális intermedier progenitor

ANLS: astrocyte-neuron lactate shuttle, asztrocita és idegsejt közötti laktát forgalom modellje

aRGC: apikális radiális glia sejt

*atg12*: autophagy related 12 fehérje génje

BDNF: brain-derived neurotrophic factor, agyból származó neurotrofikus faktor

bIP: bazális intermedier progenitorok

BMP: bone morphogenic protein, a csont morfogénikus fehérje család

bRGC: bazális radiális glia sejtek

BSA: bovine serum albumin, borjú szérumában található albumin

$\beta$ -III-tubulin: neuronokban előforduló mikrotubulus építő fehérje

ChR2: channelrhodopsin-2, fényel nyitható kation csatorna

CP: cortical plate, előagyi kérgi lemez

DMEM: Dulbecco modified minimum essential medium (sejttenyésztő médium)

DMSO: dimethyl sulfoxide

DNP: 2,4-dinitrophenol

EAAT: excitatory amino acid transporter, serkentő aminosav transzporter család

ECAR: extracellular acidification rate, külső tér savasodási rátája

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

epiESC: epiblast derived embryonic stem cell, epiblaszt eredetű embrionális őssejt

ESC: embryonic stem cell, embrionális őssejt

eYFP: enhanced yellow fluorescent protein, továbbfejlesztett sárgán fluoreszkáló fehérje

F12 HAM: Ham's Nutrient Mixture F12, tápanyag dús sejttenyésztő tápoldat

FACS: fluorescence-activated cell sorting, fluoreszcencia alapú sejtválogatás vagy áramlási citométer

FCCP: fluoro3-carbonil cyanide-methoxy-phenylhydrazone

FCS: fetal calf serum, magzati borjú szérum

FGF: fibroblast growth factor, fibroblaszt növekedési faktor

GABA: gamma-aminobutyric acid,  $\gamma$ -aminovajsav

GDP: giant depolarizing potential, nagy amplitúdójú tovaterjedő depolarizáló feszültség változás

GFAP: glial fibrillary acidic protein, gliális savas fibrilláris fehérje

GLAST: glutamát aszpartát transzporter (vagy EAAT1: Excitatory Amino Acid Transporter 1, új elnevezés SLC1A3: Solute carrier family 1 (glial high-affinity glutamate transporter), member 3)

GLS: glutamináz

GLT-1: gliális glutamát transzporter 1 (vagy EAAT2: Excitatory amino acid transporter 2, új elnevezés SLC1A2: solute carrier family 1 member 2)

GluR: glutamát receptor

*glut1*: glucose transporter 1-et (új elnevezés: Slc2a1: solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1), általános glükóz transzportert kódoló gén

*glut3*: glucose transporter 3-at (új elnevezés: Slc2a3: solute carrier family 3 (facilitated glucose transporter), member 3), neuron specifikus glükóz transzportert kódoló gén

GS: glutamin szintáz

hESC: human embryonic stem cell, emberi embrionális őssejt

HIF1 $\alpha$ : hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , hipoxiára indukálható faktor 1 $\alpha$

*hprt*: hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase, foszforibozil-transzferáz fehérjét kódoló gén

IGF: insulin-like growth factor, inzulinszerű növekedési faktor

INM: interkinetic nuclear migration, két sejtosztódás közötti sejtmagvándorlás

iPSC: induced pluripotent stem cell, indukált pluripotens őssejt

iSVZ: inner subventricular zone, a másodlagos germinatív zóna (SVZ) kamrafalhoz közeli rétegei

ITS: insulin, transzferin, selenin tartalmú tápoldat kiegészítő készítmény

IZ: intermedier zone, a ventrikuláris zóna felől a piális felszín felé vándorló sejtek rétege

LDH: laktát-dehidrogenáz

LTD: long-term depolarization, hosszú időn át fennmaradó depolarizáció

LTP: long-term potentiation, hosszú időn át fennmaradó ingerküszöb csökkenés

MAD: median absolute deviation, közepes abszolút eltérés, átlagos eltérés

MAP2: microtubule-associated protein 2, mikrotubulushoz asszociált fehérje 2

*math2*: (új elnevezés: *neurod6*: neurogenic differentiation 6) transzkripciós faktort kódoló neurális gén

MCT: monocarboxylic acid transporters; monokarboxilsav transzporter

MCT1: monocarboxylic acid transporter1 (új elnevezés: *Slc16a1*: solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 1)

MCT2: monocarboxylic acid transporter2 (új elnevezés: *Slc16a7*: solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 7)

MCT4: monocarboxylic acid transporter4 (új elnevezés: *Slc16a3*: solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3)

MEM: minimum essential medium sejttenyésztő tápoldat

mESC: mouse embryonic stem cell, egér embrionális őssejt

MiliQ víz: MiliQ ozmózisos szűrőn szűrt desztillált víz

Mowiol: polyvinyl alkohol, mikroszkópos beágyazó anyag

MST: mitotic somal translocation, mitotikus szoma áthelyeződés

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid

NAD<sup>+</sup>: nikotinamid-adenin-dinukleotid (oxidált alak)

NADH: NAD<sup>+</sup> redukált alakja

nbIP: neurogén bazális intermedier progeintor

NE-4C: p53<sup>-/-</sup> egérembrió elülső agyhólyagból izolált idegi őssejt vonal

NEC: neuroepitéliális sejt

NeuN: (új elnevezés Rbfox3: RNA binding protein, fox-1 homolog 3) neuronális sejtmagi marker

*ngn2*: neurogenin-2 proneurális transzkripció faktort kódoló gén (új rövidítés: neurog2)

NSC: neural stem cell, idegi őssejt

OCR: oxygen consumption rate, oxigénfogyasztási ráta

*oct4*: octamer-binding transcription factor 4 (új elnevezés: Pou5f1: POU domain, class 5, transcription factor 1) transzkripció faktort kódoló gén, őssejt marker

oSVZ: outer subventricular zone, másodlagos germinatív zóna (SVZ) külső rétege

pbIP: proliferatív bazális intermedier progenitor

PBS: phosphate buffered saline, foszfát pufferelt fiziológiás sóoldat

PDC: piruvát dehidrogenáz komplex

PDH: piruvát dehidrogenáz E1 enzim

PDK: piruvát dehidrogenáz kináz

*pdk4*: pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4, piruvát dehidrogenáz kináz 4-es izoforma fehérjét kódoló gén

PFK1: foszfofruktokináz 1

PLL: poly-L-lysine, poli-L-lizin

RA: *all-transz* retinoic acid, retinsav

RGl: radiális gliaszerű ősz/progenitor sejt

ROS: reactive oxygen species, reaktív oxigén szabadgyökök

SEM: standard error of the mean, középérték közepes hibája, átlag hibája

SGZ: szubgranuláris zóna, a hippocampus sejt generáló rétege

SHH: sonic hedgehog, morfogén fehérje

SP: subplate, a fejlődő agykérgi lemez kamrafal felőli oldala mentén húzódó réteg

SVZ: subventricular zone, a központi idegrendszer másodlagos germinatív rétege a kamrafalat határoló ependyma sejtek rétege fölött

*tfam*: mitokondriális transzkripció faktor A-t kódoló gén

TSPO 18kDa: 18 kDa-os transzlokátor fehérje (régiben PBR: perifériás benzodiazepin receptor)

VZ: ventricular zone, a fejlődő idegszövet kamrafalát adó, elsődleges germinatív zóna

*wnt*: a wingless *Drosophila* gén homológjait tartalmazó géncsalád; tagjai morfogén fehérjéket kódolnak



## Irodalmi áttekintés

### Bevezetés

Napjainkban sokkal többször szembesülünk idegrendszeri megbetegedésekkel, mint korábban. Ez nem meglepő, hiszen míg az őseink rövid ideig éltek, addig mostanra az orvostudomány és a magasabb életminőségnek köszönhetően jelentősen meghosszabbodott az élettartam. Így előtérbe kerültek olyan – elsősorban idegrendszeri degeneratív – betegségek, amelyek korábban nem voltak jellemzők. Ez jelenleg a fejlett és elöregedő társadalmakat (például Európát) érinti, így társadalmi szinten megjelent a fizetőképes igény a neurodegeneratív kutatások támogatására.

Az idegrendszer rendkívül bonyolult felépítése (amely sokféle neuron, különböző glia sejtek és más sejtípusok finoman szabályozott együttese) és működése (amelyben a hálózat szerkezete tárolja az információt is), valamint a koponya (és agyburkok) által biztosított védettsége nagyon nehezíti és korlátozza a vizsgálati és terápiás lehetőségeket az orvostudomány számára. Érthető, hogyha a rendszer bármely eleme rosszul működik vagy kiesik egy elem, az az egész rendszert befolyásolja. Sok idegrendszeri betegségnél nagy mennyiségű idegszöveti sejt pusztul el, amely működési zavart okoz, vagy hosszabb távon leépüléssel jár. Ezt előidézheti agyi érkatasztrófa (stroke) során kialakuló oxigén ellátási zavar, érfal repedés okozta vérzés, vagy más jellegű sérülés, de kialakul különböző - jelenleg nem gyógyítható - neurodegeneratív (idegrendszeri leépüléssel járó) betegségek során is. A Parkinson kór (ahol a substantia nigra dopaminerg sejtjei halnak el szelektíven), az Alzheimer kór (ahol a felhalmozódó amiloid plakkok hatására pusztulnak el a sejtek), az amiotrofiás laterális szklerózis (ahol a motor neuronok halnak el szelektíven) vagy a Huntington kór (ahol a striatum sejtjei halnak el) hosszantartó, folyamatosan romló szellemi állapotba hozzák a betegeket. Ilyenkor kézenfekvő lenne pótolni az elhalt idegsejteket, de ez az idegrendszer bonyolult szerkezete miatt ma még nem megoldható feladat. Bár széles fejlődési lehetőségekkel bíró, önmagukat megújító idegi őssejtek jelen vannak a felnőtt és elöregedő agyban is, számottevő fiziológiás idegsejt pótlás csak néhány agyi régióban (a szaglógumóban és a hippokampuszban) történik. Fiziológiás idegsejt képzés csak meghatározott neurogén zónákból indul: az oldal kamra szubventrikuláris zónájából (SVZ), ahol a szagló működéshez szükséges köztes neuronok állandóan keletkeznek, és a hippokampusz gyrus dentatus szubgranuláris zónájából (SGZ), ahol a gyrus dentatus glutamaterg granula sejtjei képződnek [1], [2]. Idegsejt képzésre képes őssejtek azonban jelen vannak a kamrarendszer

falában a központi idegrendszer minden területén és a működő idegi parenchimában is [3]. Ezekből a sejtekből, a környezeti hatásoktól függően, a központi idegszövet szinte bármely sejtje kialakulhat. Ma azonban még pontosan nem ismertek az egyes régiókban elhelyezkedő idegi őssejtek sajátosságai, fejlődési lehetőségei és azok a környezeti feltételek, amelyek a lehetséges szöveti sejtek „sorsát” a megfelelő idegsejt és idegi hálózatképzés felé irányítják. Az idegi őssejtkutatás egyaránt szolgálja az idegszövet képzés elméleti és klinikai kérdéseinek megoldását és az idegi őssejtek felhasználását gyógyszer molekulák fejlesztésében és tesztelésében, illetve jövőbeli sejt és szövetpótlás esetén [4].

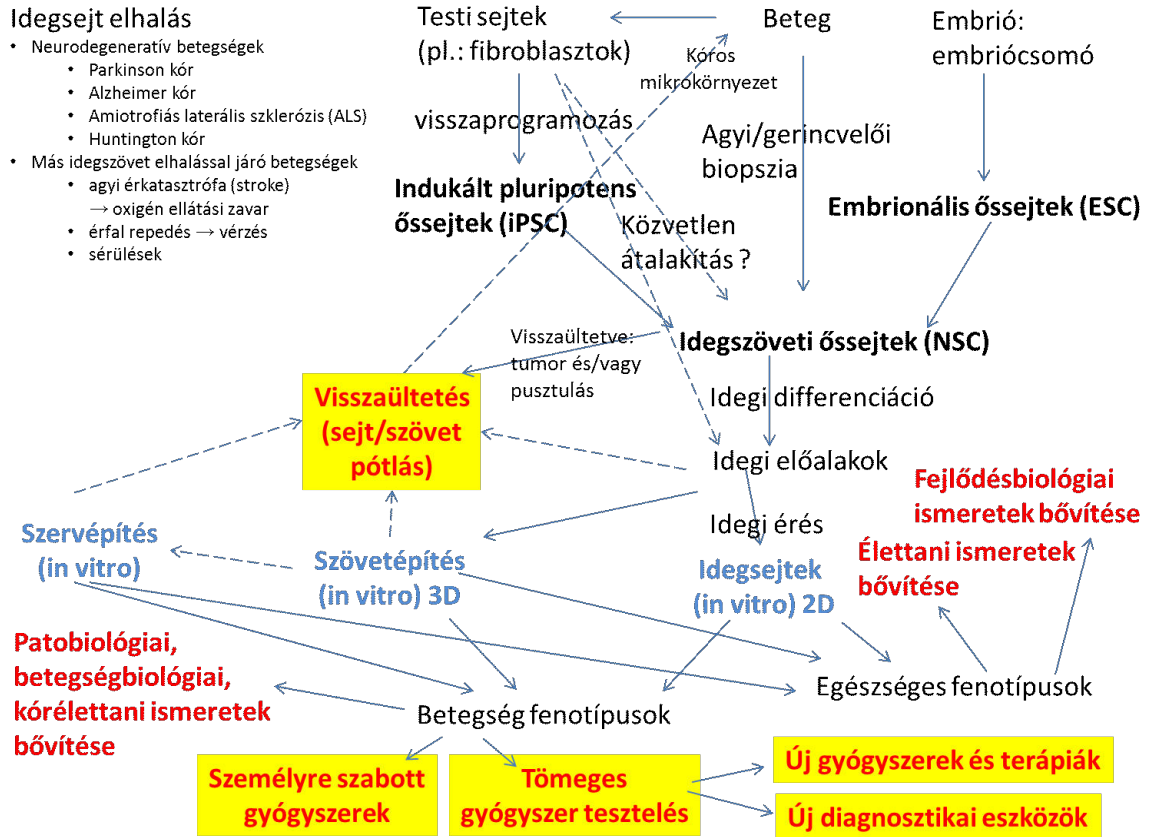
A központi idegszövetben sérülés vagy neurodegeneratív betegségek következtében elpusztult idegsejtek pótlása, a sérült neuron hálózatok működésének helyreállítása vagy alternatív hálózatok kialakítása a klinikai kutatások fontos területe, amelyhez azonban ma még sok alapvető kérdésre kell választ találni [4]–[7].

### **Kitekintés: Idegi őssejt és idegsejt képző technikák jelentősége**

Idegsejt képzésre sokféle őssejt képes: a hólyagsírából izolálható embrionális őssejtek (ESC), a különböző fejlettségű idegszöveti őssejtek [7], vagy a testi sejtekből visszaprogramozott indukált pluripotens őssejtek (iPSC). *In vitro* elődifferenciáltatás után, ezek elvileg mind képesek lehetnek elkötelezett idegi őssejtek, majd idegsejtek pótlására betegeken. A történetileg első lehetséges sejtforrást a human **embrionális őssejtek** (ESC) jelentették, de az emberi hólyagsíra embriók ilyen irányú felhasználása súlyos etikai problémákat vet fel és az elődifferenciáltatott embrionális őssejt tenyészetekben is fennmaradó elkötelezetlen őssejtek a tumor képzés kiindulópontjai lehetnek. Sok etikai problémát megoldott az **indukált pluripotens sejtek (iPSC)** kialakítása [8]–[10], [4], [11], amelyek a beteg saját testi sejtjeiből származnak (például minimális beavatkozást igénylő bőrbioopsziából könnyen kinyerhető fibroblasztok) és szinte korlátlan mennyiségű, az adott személy génállományát hordozó őssejt állítható elő. A transzgén mentes visszaprogramozás segítségével biztonságosabbá lehetne tenni a majdani klinikai alkalmazást [4]. Ezek felhasználhatók egészséges és beteg sejtek, majd a későbbiekben *in vitro* szövetek kialakítására, amelyen vizsgálhatók különböző élettani és kórélettani folyamatok. A beteg saját sejtjeiből felépített sejtszintű és később szövetszintű betegség modellek vizsgálatával pontosabb képet kaphatunk a betegség kialakulásáról, előrehaladásáról, azonosíthatók a célpontok, amelyekre gyógyszert lehet tervezni, új terápiák alakíthatók ki, és a rendszerben közvetlenül lehet tesztelni az

adott beteg számára hatásos terápiát (személyre szabott orvoslás). A gyógyszergyárak tömeges gyógyszerteresztelésre is felhasználhatják a humán sejt/szövet alapú modellt, ezáltal még a klinikai tesztek előtt kiderülhet, ha az állat modellben elért pozitív eredmények nem érvényesülnek emberben. Egy szövet létrehozása sejttenyészetből óriási lehetőséget jelent az idegrendszer fejlődésének megismeréséhez is. Az így létrehozott sejtek vagy szövetek a jövőben akár közvetlen sejt/ szövetpótlásra is felhasználhatók lehetnének [4]–[7]. (1. ábra)

Az újabb, ígéretes technikák, a szövetépítés (tissue engineering) lehetővé teheti valós 3D-s szövetek kialakítását, akár nagyobb méretekben, bioreaktor rendszerek alkalmazásával [4]–[6]. Nagy előnyük, hogy jobban utánozzák az *in vivo* körülményeket, ezáltal átmenetet képezhetnek az *in vitro* és az *in vivo* gyógyszer tesztelési modellek között. A számtalan gyakorlati felhasználás mellett, a 3D sejt/szövet modellek jelentősen szolgálják a fejlődés biológiai ismeretek kibővítését [4], [5]. Jelenleg még rengeteg kihívással kell megküzdeni a megfelelő szövet kialakító és fenntartó technikákhoz. A klinikai alkalmazhatóság érdekében a szövetépítés laboratóriumi szintjéről automatizáció és fejlett monitorozás révén el kell jutni az ipari szintig, ahol a folyamatok teljes mértékben megismételhetők az aktuális igényeknek megfelelően, automatikusan szabályozhatók, hatásosak és gazdaságilag is vállalhatók [6].



1. ábra: Regeneratív terápiás lehetőségek (saját ábra)

Idegsejt elhalás esetén kézenfekvőnek tűnik pótolni valamilyen módon a sejteket, ehhez az őssejtek biztosíthatnak megfelelő kiinduló anyagot. Az embrionális őssejtek (ESC) és az indukált pluripotens őssejtek (iPSC), illetve az idegszöveti őssejtek (NSC) közvetlenül nem ültethetők vissza az agyba, mert elpusztulnak vagy daganatot képeznek. Viszont alkalmasak *in vitro* 2 dimenziós (sejtenyészetek) vagy 3 dimenziós (szövetek) létrehozására. Az egészséges genotípusú sejtek, szövetek nagyban hozzájárulhatnak a fejlődésbiológia és élettani ismeretek bővítéséhez, de elméletileg fel lehetne használni sejt és szövet pótlásra is. A beteg genotípust hordozó sejtek, szövetek vizsgálatai esetén lehetőség van patobiológiai és kóréletti ismeretek szerzésre. Ugyanakkor lehetőséget ad tömeges gyógyszer tesztelésre is, amelynek felhasználásukkal új gyógyszereket és (személyre szabott) terápiákat, valamint új diagnosztikai eszközöket lehet létrehozni. Fekete félkövérrel betűvel jelölve az őssejt típusok, kékkel az *in vitro* technikák, pirossal a lehetséges felhasználás és sárga háttérrel a klinikai felhasználási lehetőségek. Szaggatott nyíllal szerepelnek a jelenleg még nagyon kérdéses folyamatok.

Mivel a fejlődő és a kifejlett emberi agy a folyamatok megzavarása nélkül nagyon nehezen vizsgálható [4], ezért a vizsgálatok elsősorban modell állatokon és petri csészékben létrehozott (*in vitro*) sejtenyészeteken folynak.

*In vitro*, ma már létrehozhatók idegsejtek és meghatározott idegsejt típusok, amelyek elsősorban az idegrendszerben elfoglalt helyükkel, jellegzetes sejtalakjukkal, kapcsolat rendszerükkel, neurotranszmitter fenotípusokkal, elektromos tüzelési profiljukkal jellemezhetők [4]. Léteznek *in vitro* protokollok, amelyek segítségével többé-kevésbé sikeresen létrehozhatók neuronális

progenitorok, radiális gliászzerű idegi őssejtek, gerincvelői motorneuronok, közepagyi és előagyi idegsejtek, előagyi vagy striatalis interneuronok, az idegléc multipotenciális progenitor sejtjei, vagy asztrocita és oligodendroglia sejtek. Petri csészében kialakíthatók glutamáterg, dopaminerg, szerotoninerger, kolinerg és GABAerg neuron fenotípusok [4].

Az *in vitro* környezet azonban távol áll a fejlődő vagy kifejlett agyban lévő környezettől, ahol komplex kapcsolattal rendelkező sejtípusok (pl.: neuronok, asztrocita, oligodendroglia, mikroglia, endothél sejtek) vannak jelen és tartanak kapcsolatot a sűrű ideghálózatokkal. A szövetképződés során a sejtek szabályozott mértékű osztódására, differenciálódására és funkcionális összerendezésére összehangolt lépések sorozata vezet. A funkcionális sejtminiatúrák kialakulását a sejtek változó belső működése, a különböző fejlődési állapotban lévő környező sejtekkel való kapcsolatok, a folyamatosan változó extracelluláris mátrix, a folyamatosan változó környezeti hatások jelmolekulák és ingerminiatúrák, valamint ezek által létrehozott térbeli és időbeli jelgradiensek bonyolult kölcsönhatásai szabályozzák. A klinikai sejt pótlás, szövetpótlás érdekében alapvető feladat a különböző ősz/progenitor sejtek túléléséhez és szöveti differenciálódásához szükséges feltételek ismerete. A mikrokörnyezet paramétereinek és az egyes beültetésre szánt sejtek „igényeinek” feltárása nélkülözhetetlen ahhoz, hogy a sejtek a számukra idegen (és kóros) környezetben is életben maradjanak, beilleszkedjenek és ellássák regeneratív szerepüket [5].

A hatalmas iramú fejlődés ellenére, még a sejt/szövet terápiára elvileg használható, *in vitro* tesztelt ősz/progenitor sejtek közül is csak azok klinikai felhasználása működik, amelyeket saját környezetükbe (pl. vérből sejtek a csontvelőbe) juttatnak vissza. A kifejlett agy sérült területére juttatott idegi őssejtek nagy része elpusztul, más részük glia sejté alakul és hegszövet kialakításában vesz részt. A beültetett idegi őssejtek töredék része betelepül és túlél a neurogén zónákban [12], [13]. Idegsejteket azonban, a felnőtt agyban gyakorlatilag nem képeznek. A kontrollálhatatlan szaporodás lehetősége, a daganatképzés veszélye azonban az idegi őssejtek bevitelekor is fennáll. A sejtherápiára alkalmazható őssejtek kialakítása mellett, alapvető fontosságú annak megértése, hogy milyen környezeti feltételek szükségesek ahhoz, hogy az őssejtfejlődés megfelelő irányt vegyen az *in vivo* környezetben. Ehhez ismerni kell az adott típusú őssejt populáció fejlődéssel is változó élettani/fejlődésbiológiai szükségleteit.

## Össejtek

Az **össejtek** önmaguk megújítására és egy differenciálódó utódsejt létrehozására képesek. Minden sejt/szövet fejlődési (például: hematopoetikus, csont-, izom-, idegszövetképzési) útvonalon többféle össejt létezik. A sokféleség eredményeképpen, nem létezik olyan egyedi biokémiai „marker”, amellyel „az össejt” jellemezhető lenne. Minden össejtre jellemző azonban az aszimmetrikus mitózis képessége. Az aszimmetrikus mitózis során számtartó DNS – azonos génállományt eredményező – osztódás történik, de a két utódsejtben eltérő szabályozó fehérjeeloszlás alakul ki. Az egyenlőtlen szabályozó faktorok miatt, a két utódsejtben más-más gének aktiválódnak: a két utódsejt fenotípusa nem lesz azonos. A szöveti differenciálódás során egyre szűkebb fejlődési potenciállal rendelkező össejt populációk fejlődnek, amelyek végül meghatározott végdifferenciált szöveti sejtek létrehozására képesek. A differenciáció, a sejtfejlődés előrehaladtával a létrehozható sejt típusok száma csökken.

A legtöbb szövet létrehozására a blasztomérák képesek, amelyek 4 és 8 sejtes embrió állapotból izolálhatók és totipotensek vagyis az embriót és az extraembrionális szöveteket is képesek felépíteni. A fejlődés későbbi lépésében (16-32 sejtes állapot) ezek a sejtek két populációra különülnek el, az egyik részük polarizálódik és az embrió felszínére vándorol (trofoectoderma), míg a többi sejt az embriócsomót (vagy belső sejtmassza) alkotja, ennek eredményeként kialakul a hólyagcsíra. A trofoectoderma sejtek a méhfalba való beágyazódásban játszanak szerepet, és a placenta alkotó részeivé fejlődnek. A méhfalba való beágyazódás után a belső sejtcsomó két részre különül, az egyik az epiblaszt (vagy primitív ectoderma), amelynek a sejtjeiből fog kifejlődni az embrió test legtöbb sejtje, míg a másik része, a hipoblaszt (vagy primitív endoderma), amelynek viszonylag kevés leszármazottja képezi az embriótest részét, a többségük az extraembrionális mezoderma és szikzacskó kialakításában vesz részt. Az **embrionális össejtek** (ESC: embryonic stem cell) az embriócsomóból izolálják, amelyek trofoblaszt sejteket már nem tudnak képezni, de az embrió test szöveteinek minden sejt típusát képesek létrehozni, tehát pluripotensek. Az embrionális össejtekben kifejeződnek az ún. össejt gének (stemness genes), legfontosabbakként az oct4 (újabbán pou5f1), sox2, klf4 és nanog, amelyek transzkripciós faktorokat kódolnak [10], [14]. A pluripotens össejteknek két, a naiv és a primed [15] állapota ismert. A naiv pluripotencia *in vivo* a beágyazódás előtti blasztociszta sejtekre jellemző, amely lehetőséget ad a sejt differenciáció késleltetésére *in vivo* és sorozatos önmegújításra *in vitro*. Ez az állapot még nem jelent elkötelezettséget semmilyen fejlődési irányba, a sejtek DNS metiláltsága (epigenetikus módosulása) minimális, ebből az állapotból könnyű differenciáltatni a sejteket. Ez a

naiv összeállapot jellemző egyes egér embrionális összejtvonalakra. A primed pluripotencia elsősorban a beágyazódás utáni embriócsomó sejtekre jellemző és ez már egy elkötelezettebb állapot [14]. Az emberi embrionális összejtvonalak többsége primed állapotú, és az egér epiblaszt eredetű összejtjeinek (epiESC) feleltethetők meg. Megfelelő indukciós hatásokra ezekből a sejtekből mind a három (ekto-, mezo- és endoderma) csíralemez sejtjei kialakulhatnak *in vitro*. *In vivo* szövetekbe injektálva azonban daganatokat képeznek, amelyben mind a három csíralemez sejtjei előfordulhatnak. A gyors osztódás, az egyelőre nem kontrollálható fejlődés és a gyakori tumor képződés következtében, az embrionális összejtek közvetlen sejttérápiára nem alkalmazhatóak. *In vitro* differenciáltatás után kialakuló szöveti összejt leszármazottjaik azonban kiválóan alkalmazhatók sejtfejlődési alaputatásokban, gyógyszerhatás vizsgálatokban és *in vitro* gyógyszerterjesztésekre [4].

Az *in vitro* szövetgyártásban, a személyre szabott gyógyszerterjesztésekben és kórok feltárásokban új lehetőséget nyitott az **indukált pluripotens sejtek** (iPSC: induced pluripotent stem cell) létrehozása, amely szöveti sejtekből különböző technikákkal [16] visszaprogramozott embrionális összejtszerű sejtek kialakítását eredményezte. Az indukált pluripotens összejtek, az embrionális összejtekhez hasonlóan, azonban közvetlen sejtbeültetésre nem használhatók. A sejttérápia céljaira az indukált pluripotens összejteket, először a megfelelő csíralemez irányába, majd innen a megfelelő szövet irányába kell differenciáltatni [4], [10]. Mivel ezeknek a folyamatoknak még nagyon rossz a hatékonysága és ugyanabból az egyénből származó összejtek is eredményezhetik különböző daganatok kialakulását, a klinikai felhasználásuk még várat magára.

A **szöveti összejtek** fejlődési lehetőségei már szűkebbek: a környező szövet sejt típusait tudják létrehozni. Aszimmetrikus osztódásuk révén létrehozzák önmagukat és egy olyan szöveti progenitor sejtet, amely megfelelő hatásokra gyors osztódásra képes és egy meghatározott sejtfejlődési sort képes beindítani. Önfenntartó képessége ugyanakkor korlátozott. Ezekből a sejtekből érhető el a legkönnyebben az adott szövet differenciáltatása, ezért sok kutatás indul ki ezekből a sejtekből. Az idegszöveti összejtek, szemben a naponta néhányszor  $10^{11}$  újonnan keletkező vérképző sejtrel vagy a bőrszöveti összejtekkel [10], a kifejlett egyedben csak néhány helyen aktiválódnak [3]. Ilyen felnőtt idegrendszerben is aktív neurogén helyek találhatóak az oldal kamra szubventrikuláris zónájában (SVZ) és a hippokampusz gyrus dentatus szubgranuláris zónájában (SGZ) [1], [2]. A továbbiakban csak az idegi összejtekkel foglalkozom, amelyek képesek létrehozni az idegszövetet alkotó neuroektodermális sejteket (neuronokat, asztrocita és oligodendrogliá sejteteket vagy a kamrafalat alkotó ependyma sejteteket).

## Embrionális idegi ősz és progenitor sejtek

Az idegszövet képződés kezdetén a **neuroepiteliális sejtek (NEC)** szimmetrikus osztódással képesek megsokszorozni magukat és létrehozni az idegi lemezt. Az idegi árok csővé zárulása után alakulnak ki az aszimmetrikus osztódásra képes elsődleges idegi őssejtek: a primer radiális glia sejtek. A sejtek az apikális vagy ventrikuláris (amely a velőcső lumenét zárja, amiből a későbbiekben agy-gerincvelői folyadékot tartalmazó gerinccsatorna, illetve az agykamrák alakulnak ki) és a bazális vagy piális (a később kialakuló lágy agyhártya által borított) oldallal is tartanak kapcsolatot, ennek megfelelően apikális-bazális polaritásúak. Az osztódásukra az interkinetikus magvándorlás (INM: interkinetic nuclear migration) jellemző. A mitózis az apikális oldalon megy végbe, majd a G1 fázisban a sejtmag az apikális felszínről bazálisabb pozícióba vándorol, míg a sejtciklus szintézis (S) fázisa már bazálisabban történik. A G2 fázisban a sejtmag a bazálisabb pozícióból visszavándorol az apikális felszínre [17], [18]. Így az egyetlen sejt sor vastagságú szövetben a sejtek sejtmagjai különböző magasságokban helyezkednek el. Ez adja a mikroszkópban megfigyelhető csíkozott vagy áltöbbsoros látványt [17], [18]. Ezzel a mozgással a sejtek maximálni tudják a mitózisok számát és több helyet hagyni az épp osztódó sejteknek. Mivel mind az apikális és mind a bazális környezet különböző, ezért ez a folyamat befolyásolja a sejtors választást, attól függően, hogy mikor melyik térrészben helyezkedik el a sejtmag és a proliferáló vagy a neurogén szignáloknak van-e jobban kitéve a sejt. A fejlődő idegi sejteket különböző szignálok érik az idegcső dorzális (BMP, Wnt), ventrális (Shh), anterior (FGF8) és posterior (retinoidok) felszínei felől. Ezek következtében, a fejlődő központi idegszövetben meghatározott génexpresszióval jellemezhető kis régiók alakulnak ki [19], amelyekben meghatározott a vándorló idegsejt előalakok letelepedésének helye, az idegi nyúlványok kinövésének iránya és az idegsejt fenotípusok kialakulása. A különböző fejlődési stádiumban lévő sejt típusok, neuronok, a később megjelenő asztrociták, oligodendroglia sejtek, valamint az idegszövetbe kívülről bevándorló endotél és mikroglia sejtek mind befolyásolják egymás fejlődését. A sejt-sejt kölcsönhatások nem csak szignál molekulák révén, hanem közvetlen mechanikus hatásokon át is érvényesülnek [18]. Ebben a folyamatban és a sejtek közötti szinkronizációban a rés kapcsolaton keresztül átáramló kalcium nagy szerepet játszik [18]. A neuroepiteliális sejtek ma még nem tisztázott folyamatok révén primer radiális glia sejtekké alakulnak. A radiális glia sejteket kezdetben a neuron migráció állványának gondolták, de mára bebizonyosodott, hogy a primer radiális glia sejtek maguk az elsődleges idegi őssejtek [17]. A leginkább tanulmányozott előagyi kéreg fejlődése során, a radiális glia sejtek szimmetrikus



osztódással képesek megújítani magukat vagy aszimmetrikus osztódással létrehozhatnak egy apikális radiális glia sejtet (aRGC) és egy további osztódásra képtelen, neuron előalakot, amely a kezdeti kéreglemez kialakításában vesz részt. A neuron előalakok kilépnek a ventrikuláris zónából és a bazális felszín felé vándorolva kialakítják a kérgi lemezt [17], [18] (2. ábra).

Az **apikális radiális glia sejt** (**aRGC**) rétege adja a központi idegszövet elsődleges idegsejt képző zónáját (primer germinatív zóna, ventrikuláris zóna, VZ). Az aRGC sejtek aszimmetrikus osztódása során keletkeznek a nagy sejttestű, ősi vetítő (Golgi-I) típusú idegsejtek, amelyek pl. az agykéreg VI., V. és IV. rétegének principális neuronjaivá fejlődnek. Az ősi, posztmitotikus elkötelezett idegsejt előalakokat generáló sejt képzés a korai idegszövetképzésre jellemző, és az egyedfejlődés korai szakaszán „kimerül”. Az aRGC sejtekből ependyma sejtek alakulnak, vagy olyan progenitor/őssejtek fejlődnek, amelyek további szimmetrikus osztódásokkal képesek megsokszorozni a sejtfejlődés különböző stádiumaiban lévő progenitor populációkat (1. táblázat). Így alakul ki a másodlagos neurogén réteg, a kamrafaltól ependyma sejtek által elhatárolt szubventrikuláris zóna (SVZ).

A másodlagos germinatív zónában már különféle idegi progenitor sejtek léteznek, amelyeket elhelyezkedésük és fejlődési potenciáljuk alapján lehet elkülöníteni egymástól (1. táblázat).

Az idegi őssejteknek sokféle csoportosítása és elnevezése létezik. A legfrissebb egységes nevezéktanra törekvő elnevezés [17], [20] a sejt mag mitózis (M) fázisban történő elhelyezkedésén alapul, ennek megfelelően apikális vagy bazális [20], a leszármazás alapján pedig elsődleges vagy másodlagos lehet [17] (1. táblázat).

1. táblázat: Az agykéreg szerveződésében szerepet játszó idegi és progenitor tulajdonságainak összefoglalása

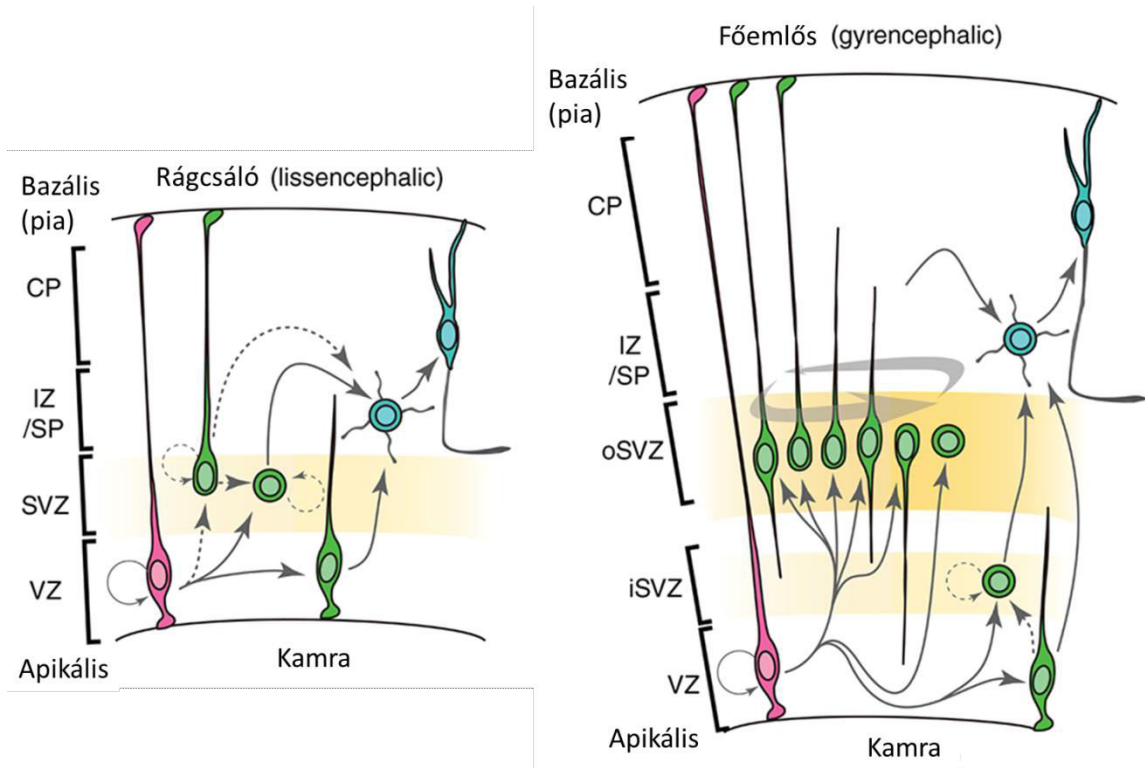
	Apikális progenitorok			Bazális progenitorok	
	Neuroepitélialis sejt (NEC)	Apikális radiális glia (aRGC)	Apikális intermedier progenitor (aIP)	Bazális intermedier progenitor (bIP)	Bazális radiális glia (bRGC)
<b>Elhelyezkedés</b>	VZ	VZ	VZ	SVZ, VZ	parenchyma
<b>Sejtmag helye az M fázisban</b>	apikális	apikális	apikális	nem apikális	nem apikális
<b>Össejttípus</b>	elsődleges	elsődleges	másodlagos	másodlagos	másodlagos
<b>Fejlődési szakasz</b>	agykéreg képződés kezdete	neurogén	neurogén	neurogén	neurogén
<b>Polaritás</b>	apikális-bazális	apikális-bazális	apikális-bazális	nincs	bazális
<b>Kapcsolatok</b>	apikális membrán, apikális kapcsolatok és bazális lamina kapcsolat	apikális membrán, apikális kapcsolatok és bazális lamina kapcsolat	apikális membrán és apikális kapcsolatok	nincs apikális és bazális kapcsolata	bazális lamina
<b>Osztódás típusa</b>	kezdetben szimmetrikus, aztán aszimmetrikus önmegújító	aszimmetrikus és szimmetrikus	szimmetrikus fogyasztó	szimmetrikus önmegújító pbIP és fogyasztó nbIP	?
<b>Differenciáltabb sejttípusok, amiket létrehoz</b>	NEC, preplate neuron, BP	BP (gyakrabban), aIP, neuron	neuron	bIP, neuron	bRGC, bIP, neuron
<b>Sejtmagmozgás</b>	INM	INM	INM	MST?	MST
<b>Markerek</b>	PAX6, nestin	PAX6, nestin, asztrocita markerek (BLBP, GLAST, vimentin, tenascin-C, GFAP*)	PAX6, TBR2	TBR2, NEUROG2, -PAX6*	PAX6, asztrocita markerek (BLBP, GLAST, vimentin, tenascin-C, GFAP*), TBR2

\* rágcslókban nem

Az emlősök előagyának kialakításában a táblázatban bemutatott minden progenitor típus szerepet játszik, de számuk fajoként jelentősen különbözik. A másodlagos germinatív zónából származó progenitor sejtek számának növekedésével elsősorban az agykéreg kapcsoló neuronjainak, valamint asztrocita és oligodendroglia sejtjeinek száma nő.

## **Agykéreg fejlődése**

Bár az idegsejtfejlődés alapfolyamatai azonosak, a rágcsálók és a főemlősök agyának kialakulása között jelentős különbségek vannak. Az egér agykérgéhez képest az emberi agykéreg több mint ezerszer több neuront és glia sejtet tartalmaz [17]. Ennek megfelelően a rágcsálók agyának felszíne nem barázdált (lissencephalic) szemben a főemlősök barázdált (gyrencephalic) agyával. Ennek valószínűleg a hosszabb neurogén időtartam és az egységnyi időre jutó nagyobb osztódási ráta az oka [17]. A főemlősökben jelentősen megnő az őssejtek száma a bazális radiális glia sejtek szimmetrikus proliferatív osztódása révén (2. ábra). Habár ezek a sejtípusok a rágcsálókban is megtalálhatók, az emlősöknél érik el az agykéreg kiterjeszkedéséhez szükséges sokaságot/tömeget [17].



2. ábra: Agykéreg képződés rágcáslóban (bal kép) és főemlősben (jobb kép) ([17] nyomán)

Az agykéreg fejlődése során megfigyelhetők szövet szerkezeti (citoarchitektúra) különbségek. Az egysejtű primer germinatív rétegből (VZ: ventricular zone) kivándorló elsődleges neuronok alkotják a kérgi lemezt (CP: cortical plate). A ventrikuláris zónából a kérgi lemez felé vándorló sejtek rétege a köztés zóna (IZ: intermedier zone) és a kéreg alatti lemez (SP: subplate). Később az őssejtek bazálisabb elhelyezkedésével létrejön a szubventrikuláris zóna (SVZ: subventricular zone), amely a barázdált agy fejlődése során elkülöníthető belső és külső szubventrikuláris zónára (iSVZ: inner subventricular zone, oSVZ: outer subventricular zone). Elsődleges progenitor sejtek piros, másodlagos progenitor sejtek zöld, neuronok kék színnel jelölve.

A neuron képződést neuron vándorlás, neuronális differenciáció, dendrit és axon képződés, szinaptogenezis és neuronális hálózat kialakítása követi. Miközben más folyamatok is végbe mennek, mint például glia képződés (asztrocita és oligodendroglia), mielinizáció, érzékszervi és a vér-agy gát kialakulása [18]. Ezek mindegyikével a disszertáció Bevezetője nem foglalkozhat. A következőkben röviden azokat a jelenségeket ismertetem, amelyek a kísérletes munkám szempontjából nélkülözhetetlenek.

## Progenitor sejtek és idegsejt előalakok vándorlása a fejlődő előagyban

A sejt vándorlást az idegszövet képződés alatt a sejtek képzésének üteme, a sejt felszínen hordozott adhéziós receptorok és a környezet által nyújtott adhéziós és adhéziót gátló molekulák eloszlása szigorúan szabályozza. Az ősi típusú neuron vándorlás az előagykéregben az inside-out típusú. A korábban kialakult neuronok telepsznek le a fejlődő kéreg kamrafalhoz legközelebbi (leendő 6. és 5.) rétegében, és a később kialakultak a helyezkednek el legtávolabb a ventrikuláris zónától. A radiális glia sejtek szolgálnak a vándorlás állványául, ezen „másznak fel” a neuron előalakok. A fejlődés egy későbbi lépésében a szubventrikuláris zónából származó progenitorok tangenciálisan vándorolnak a SVZ mentén, majd a radiális glia sejtek mentén vándorolnak be a fejlődő előagykéreg 2. és 3. rétegébe. A gerincvelőben a radiális vándorlás utáni sejt letelepedés fordított irányú. Az először létrejövő sejtek helyezkednek el legtávolabb a ventrikuláris zónától, a később keletkező sejtek a csatornához közelebb helyezkednek el (outside-in).

Az adhézió jelzésekre adott sejt válasz jelentősen változik az adott sejt aktivitásától és fejlettségi szintjétől függően.

A környezetben előforduló növekedési faktorok ionháztartást módosító hatásai, az extracelluláris tér ionfluktuációi és a réskapcsolatokon át a szomszéd sejtekből terjedő  $\text{Ca}^{2+}$  oszcillációk a neurogén zónákban is befolyásolják az őssejt osztódást [21]. A germinatív zónából kilépő progenitor sejtek motilitását, a sejt vándorlás útvonalát és sebességét jelentősen módosítják azok a környezeti hatások, amelyek az intracelluláris ioneloszlást, különösen a  $\text{Ca}^{2+}$  eloszlását befolyásolják [22]. Ilyen módon a vándorló sejtekben a szabadon hozzáférhető intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint finoman szabályozza a vezető él (lamellipódium) kialakulását és a kontraktilis erő képzését.

Az idegi őssejteket a sejtfejlődés kezdeti szakaszaitól kezdve érik bioelektromos ingerek. Az egyedfejlődés későbbi szakaszain, a másodlagos germinatív zónákban kialakuló ős/progenitor sejtek közelében már nagy amplitúdójú  $\text{Ca}^{2+}$  hullámokat (GDP: giant depolarizing potential) és csúcspotenciál sorozatokat is propagáló idegrostok húzódnak. A fejlődő agyban a nagy depolarizáló potenciálok (GDP-k) végig haladnak a növekvő idegi nyúlványokon a szinaptikusan kapcsolt hálózatok kialakulása előtt [23]. A GDP-k fontos szerepet játszanak egyes idegsejt csoportok adott célterülettel létesített kapcsolatainak kialakításában (topográfias vetülésében), de befolyásolják depolarizálódó nyúlványkötegek közelében lévő többi sejt bioelektromos állapotát is. A bioelektromos stimuláció fontos tényezője az őssejtek ciklusának és a progenitor sejtek

vándorlásának szabályozásában [24]–[27], valamint a nyúlványok kinövésének, meghosszabbodásának és útkeresésének a differenciáló neuron előalakokban [28], [29].

A fejlődő agyban az őssejtek, a progenitorok és a neuron előakok folyamatos ion stimulációnak vannak kitéve. A feszültségfüggő és a ligandum vezérelt ioncsatornákon keresztül áramló ionok jelentősen megváltoztathatják a sejtek ioneloszlását, de nem feltétlenül váltanak ki olyan mértékű választ, amely a fejlődő neuronokban akciós potenciálokat tudna létrehozni. Az átmeneti vagy tartósabb ioneloszlás változások azonban jelentősen befolyásolhatják a sejtek belső vagy más környezeti ingerekre adott válaszait és fejlődési folyamatait. Különösen fontos fejlődésbiológiai kérdés, hogy az agy szerkezetének kialakításában alapvető sejt vándorlási folyamatokat hogyan szabályozzák a progenitor sejteket érő bioelektromos ingerek.

Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint lokális megnövekedése a sejt kontraktilitás helyi fokozódásához, az adott sejtrész elmozdulásához, adhéziós mintázatának megváltozásához vezet. Mindez a sejt egészének helyváltoztató mozgását eredményezheti. Az ioneltolódások egy vándorló sejt esetében, az adhézív tényezők által kijelölt útvonal megtételét gyorsíthatják vagy lassíthatják. A finoman összerendezett idegi sejt mintázatok torzulnak, ha egyes sejtek nem a megfelelő időben „találkoznak” vagy érik el a végleges letelepedésükre megfelelő helyet.

A fejlődő idegszövet bonyolult sejtösszetétele [3] valamint a migráció irányát és sebességét szabályozó tényezők komplexitása miatt, a bioelektromos stimuláció sejt vándorlása gyakorolt hatásai *in vivo* nehezen vizsgálhatók. Egészen a közel múltig, az egyes progenitor populációk vándorlásának irányairól és a vándorlás sebességéről csak rögzített anatómiai preparátumok sorozatvizsgálatai tudtak adatokat adni. Az optogenetikai eljárások [30] ma azonban már lehetővé teszik, hogy genetikailag módosított sejtekben, fény hatásával olyan ionválaszokat váltsunk ki, amelyek jól utánozzák a bioelektromos ingerlés hatásait. Fényérzékeny, bakteriális eredetű kation csatornák (pl. channelrhodopsin-2) beépítésével a sejteket aktiválni vagy fényérzékeny  $\text{H}^+$  pumpák (pl. halorhodopsin) kifejeztetésével gátolni lehet ms időbeli precizitással elkerülve az elektrofiziológiai mérés során „kóborló” áram mellékhatásait. A fényérzékeny csatornák/pumpák sejt típus függő kifejeztetésével térben és időben finoman szabályozott, precíz ingerlés valósítható meg, akár szabadon mozgó állatban is. A fényérzékeny ioncsatornák vagy ionpumpák genetikai kifejeztetése után, ki-be kapcsolgathatunk sejteket megfelelő hullámhosszúságú fényrel való megvilágítással. Ez az eljárás módot adott arra, hogy idegszöveti őssejtek vándorlását vizsgáljam ingerelt és nyugvó állapotban, a sejtfejlődés különböző állapotaiban.

## Felnőtt kori idegi őssejtek

Sokáig úgy gondolták, hogy csak a neuronális fejlődés során vannak jelen idegi őssejtek, de mára bebizonyosodott, hogy a felnőtt központi idegrendszerben is találhatóak őssejtek [31]–[33]. Azokon az agyterületeken, ahol az ideghálózatok folyamatosan átrendeződnek (bulbus olfactorius, hippocampus), a teljes élettartam alatt épülnek be újonnan képződött idegsejtek a már működő hálózatokba. Az állandó idegsejt képzést a felnőttkori neurogén zónák biztosítják. Az egyik fő neurogén régió az **oldal kamra mentén húzódó szubventrikuláris zóna** (SVZ). Itt elsősorban a szaglógumó GABAerg helyi interneuronjai képződnek [1], [2], amelyek a rostrális migrációs ösvényen keresztül vándorolnak a szaglógumókba [34]. A másik fő neurogén régió a **hippokampusz gyrus dentatus szubgranuláris zónája** (SGZ), ahol glutamáterg szemcsesejtek képződnek [1], [2] és épülnek be a hippocampusz folyamatosan átrendeződő hálózataiba [35]. Sérülés esetén azonban a kamrafal mentén mindenütt indulhat sejtkepzés, és ezekből az újonnan képzett sejtekből *in vitro* idegsejtek is képződhetnek [36].

A felnőtt idegi őssejtek osztódása és vándorlása fokozható idegszöveti károsító hatásokkal, de nem képeznek az elhalt neuronok pótlására alkalmas sejteket. Annak ellenére, hogy a kifejlett agyban is jelen vannak az idegsejt képzésre képes őssejtek, progenitorok, a sérülés vagy neurodegeneratív betegségek hatására elpusztult idegsejteket a belső őssejt populációk nem tudják pótolni. Számos adat bizonyítja, hogy *in vitro* idegsejtképződésre képes őssejtek sem képesek beilleszkedni a felnőtt agyszövetbe [12], [13]. A kifejlett agy egyes kitüntetett, élettanilag újraépülő régiók kivételével nem biztosít feltételeket az ős/progenitor sejtek idegsejtté fejlődéséhez és működő neuronhálózatokba való beépüléséhez [37]. Bár ismert, hogy a progenitorok vándorláshoz és adott helyen való letelepedéséhez megfelelő extracelluláris mátrix környezetre, sejt-sejt kapcsolatokra, növekedési faktorokra (pl.: FGF2, IGF-1, BDNF), a hálózatba illeszkedésükhöz pedig megfelelő inger mintázatra és anyagcsere ellátottságra van szükség, sem az egyes őssejt populációk igényeit, sem a befogadó agyi mikrokörnyezet paramétereit nem ismerjük még kellő szinten.

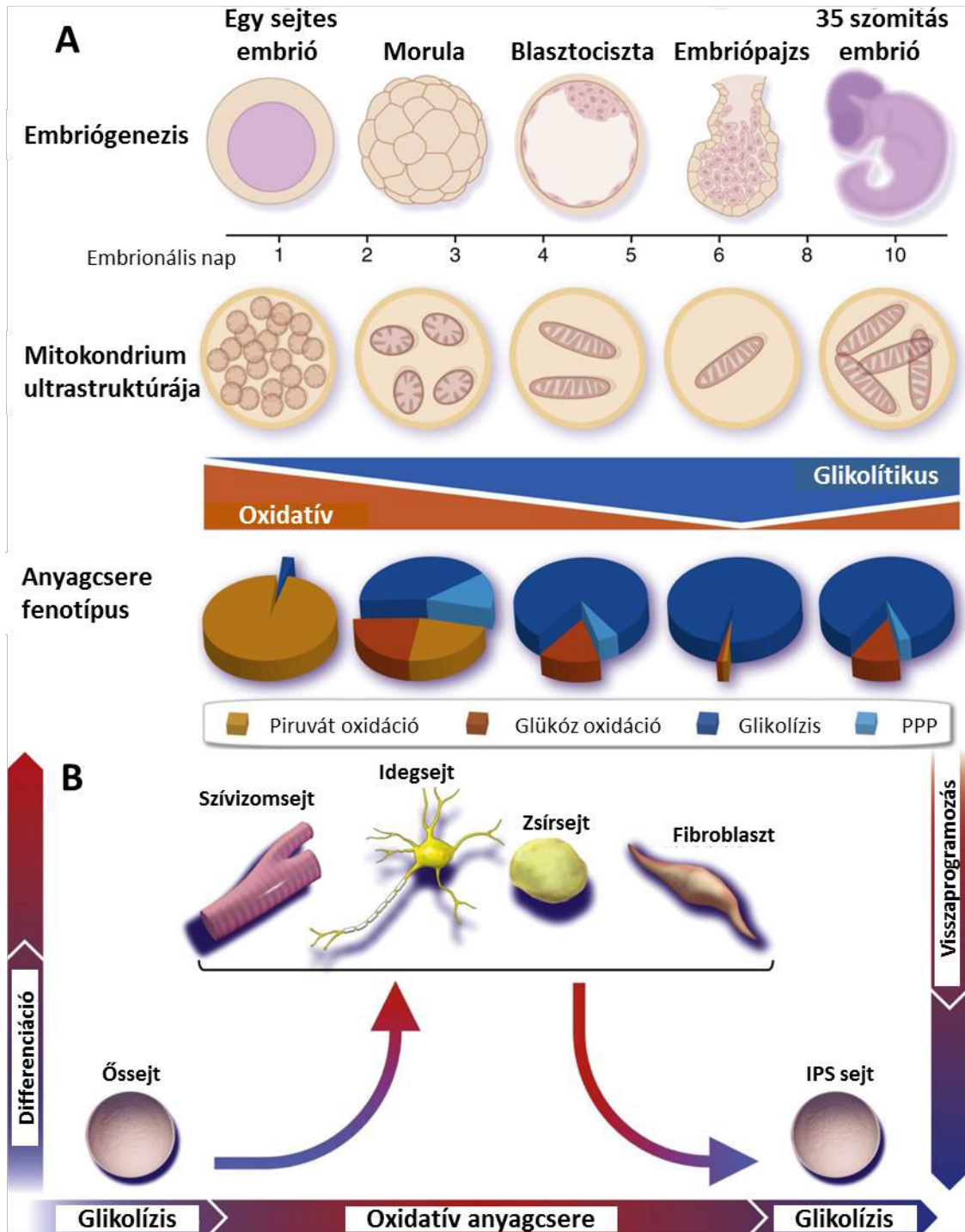
Az idegi ős- és progenitor sejtek és a belőlük származó neuronok jelentősen különböző környezetet igényelnek a túlélésükhöz és élettani funkcióik betöltéséhez, további differenciációjukhoz mind *in vivo* mind *in vitro* [38]. Az idegi őssejtek fejlődéséhez a növekedési faktorokon [39] kívül, megfelelő adhéziós felszínek [40] és sejt aktivitási mintázatok [27]

szükségesek. Az anyagcserének is nagy szerepe van a neuronális progenitor sors eldöntésében a fejlődés, a regeneráció vagy az élettani és mesterséges neuron helyettesítés során [13], [41], [42].

### **Anyagcsere az embrionális fejlődés és a differenciáció során**

Az embrionális fejlődés kezdetén a zigóta állapotban, elsősorban a sok anyai mitokondriumnak köszönhetően, jelentős mitokondriális piruvát oxidáció történik. A barázdálódás során az anyai mitokondriumok citoplazma térfogatra eső számának csökkenése és a hipoxiás (alacsonyabb oxigéntartalmú) környezet miatt, az anaerob glikolízis kerül előtérbe a mitokondriális oxidáció rovására. A blasztociszta állapotra a glikolízis átveszi a fő energiatermelő folyamat szerepét. A későbbi szakaszokban a beágyazódás után, a mitokondriális érés következtében nő a mitokondriális glükóz oxidáció aránya [41] (3. ábra). *In vitro* adatok is bizonyítják, hogy a naiv őssejtek (ESC és iPSC) glikolitikus aktivitása a legmagasabb, ennél alacsonyabb aktivitásúak az elkötelezettebb, primed őssejtek (epiESC), végül a belőlük differenciáltatott idegi őssejtek (NSC) glikolitikus aktivitása a legalacsonyabb [43]. A differenciáció során a sejtek folyamatosan térnek át a glikolízisről az oxidatív anyagcserére [7], [11], [41], [44] (3. ábra). Nem meglepő módon a sejtek visszaprogramozása során szintén visszatér a glikolízis alapú anyagcsere [11], [41] (3. ábra).





3. ábra: Az anyagcsere a fejlődés során ([41] nyomán)

(A) A mitokondrium nagy változásokon megy keresztül az embrionális fejlődés során (felső ábra). A megtermékenyített petesejt nagymértékben függ az oxidatív anyagcserétől. Az anyától örökölt mitokondriumok száma a sejtosztódások során lecsökken a leány sejtekben a barázdálódás során és el kezd nőni az anaerob glikolízis aránya. A hólyagsíra sejteiben főként anaerob glikolízis biztosítja az energia igényt. A mitokondriumok osztódása csak a beágyazódás után, a szövetképződés időszakában indul, és ér képződés előrehaladtával az oxidatív foszforiláció fokozatosan előtérbe kerül.

**(B) Az őssejtek differenciációja során nő az oxidatív anyagcsere aránya (alsó ábra). Az őssejtek alap állapotának fenntartásához elegendő a glikolízis, de a differenciációhoz és éréshez már nem. Az egyre specializáltabb sejtek nagy energia igényéhez mitokondrium képződésre, érésre és hálózatos szerkezet kialakítására van szükség, amely így támogatja a citrátciklus és az elektrontranszportlánc működését. Ezáltal elérve az evolúciósan optimalizált legjobb energia felhasználást. (A sejtek visszaprogramozása során ez a folyamat megfordul.) PPP: pentóz foszfát útvonal, morula: szedericsíra, blasztociszta: hólyagsíra**

Általánosságban a terminálisan differenciálódott sejtek glikolizálják a glükózt piruváttá, ami aztán belép a citrátciklusba és ATP-t termel az oxidatív foszforiláció segítségével (4. ábra). Azonban a daganatos és az osztódó sejtekben a piruvát laktáttá alakul és szekretálódik [7], [45]. Ez az aerob glikolízis vagy Warburg hatás [7], [45], [46]. Ez csökkenő oxigénfogyasztással és megnövekedett extracelluláris savasodással mérhető [47]. Ez előnyös lehet a sejteknek, hiszen a glükóz korlátlan mennyiségben rendelkezésre áll a környezetben (a keringés révén), így ez a nem hatékony glükóz felhasználási mód segíti a sejtek gyors osztódását a biomassza növekedésén keresztül, mivel a glükóz maradvány szénatomjainak nagy része felhasználható a felépítő folyamatokban (például a zsírsav és a lipid szintézisben). Emellett a mitokondriális oxidáció hiánya csökkenti a szabad gyökök (ROS: reactive oxygen species) keletkezésének a lehetőségét [45], [47], [7], ezzel is segítve a sejtek életben maradását.

Az idegi őssejtek és progenitorok nagy része viszonylag jól elkülönülő környezetben (niche) helyezkedik el általában az agy-gerincvelői folyadék tér határának közelében. Az embrionális neurogén zónákra általában jellemző, hogy alacsony oxigén tartalmúak (hipoxiások), amely így az őss- és progenitor sejtek túlélésének és osztódásának kedvez [13], [44], [48]. A hipoxiás környezet nem csak az embrionális fejlődés során a helyi keringési rendszer kialakulása előtt [48] jellemző az őssejtek környezetére, hanem a felnőtt kori neurogén zónákra is. A hipoxiás környezet egyben fenn is tartja az őssejtekre jellemző glikolitikus anyagcserét, például a hipoxiára érzékeny faktor HIF1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ) [49] expressziójának fenntartásával felül szabályozza a glikolízist [44]. Hipoxiás környezetben azonban az idegi őssejtek nem differenciálódnak idegsejttekké, differenciációhoz normál oxigén ellátottság kell [13], [44].

Az őssejtek [7], [11], [41], [44], [50], [51] glikolízis alapú anyagcserét folytatnak, amely az oxidatív anyagcsere felé tolódik el a differenciációval. Közben a mitokondriumok is nagy fejlődésen mennek keresztül [7], [11], [41]. Az őssejtek még fejletlen mitokondriummal, benne nem fejlett krisztákkal jellemezhetők. Az idegi őssejtek mitokondriális funkciójának elrontásával a sejtek anyagcseréje még inkább eltolódik a glikolízis irányába, ami megnövekedett osztódáshoz (így nagyobb tumor képzési rátához) és csökkenő differenciációs képességhez vezet [44]. Ezzel szemben a nagy energia igényű differenciált sejtekben sok érett tubuláris mitokondrium található

fejlett krisztákkal [7], [11], [41]. A differenciáció előrehaladtával nő a mitokondriális tömeg, az aktivitás és az oxidatív foszforiláció mértéke is [44]. Így érthető, hogy amíg a differenciált neuronok sokkal érzékenyebbek a hipoxiára, addig az őssejtek osztódni is képesek alacsony oxigén ellátottság mellett [13], [44]. A HIF1 $\alpha$ -n [48], [49], kívül sok anyagcserét szabályozó fehérje expressziója változik meg a differenciáció során [42], többek között a TSPO18 fehérje is [52], amely a mitokondriális permeabilitás pórushoz kapcsolódik [53].

A magasabb oxigén tartalmú (normoxia) környezetben a sejt átáll oxidatív foszforilációra. Az oxidatív foszforiláció következtében a megnövő szabadgyök termelés több differenciációs útvonal megindulását serkenti [7] és a szabadgyök termeléssel részben magyarázható a differenciáció elején bekövetkező nagy mértékű sejthalál (apoptózis) is [44]. A felnőtt agyban sérülés vagy helyi keringési zavar hatására helyileg csökken az oxigén tartalom. A lokális hipoxia hatására az idegsejtek elpusztulhatnak, míg az idegi ősz és progenitor sejtek összegyűlnek és szaporodnak ezeken a helyeken. Azonban mivel a progenitor sejtek csak normoxiás körülmények között differenciálódnak neuronokká, idegsejtek ezeken a területeken nem fejlődnek. Bár a helyreálló keringés megadja a lehetőséget a differenciációra, a sérült felnőtt agyi régiókban gyorsan kialakuló asztrocita dús (gliotikus) környezet is gátolja az idegsejt irányú sejtfejlődést [37].

A lipid anyagcsere is jelentősen befolyásolja az idegi őssejtek fennmaradását és sorsát. Egyes vélemények szerint az osztódáshoz a lipid szintézis fokozása, míg az őssejt állapot megtartásához a zsírsav oxidáció, lebontás fokozása szükséges [44]. A kezdeti differenciáció során a lipid szintézis mértéke csökken a zsírsav lebontás javára [44]. Ugyanakkor folyamatos magas aktivitású lipid szintézist igényel az idegsejtté érés folyamán a hatalmas kiterjedésű sejtmembrán felépítése és az állandó megújítása.

A differenciációval változó anyagcsere igények szükségszerű változást okoznak a tápmolekulák felhasználásában és az energiatermelő útvonalak megválasztásában.

Az őssejtek és a differenciálódott sejtek közötti jelentős anyagcsere különbségeket még összetettebbé teszi, hogy az idegszövetben speciális anyagcsere kapcsolatok alakulnak ki az idegsejtek és asztrociták között.

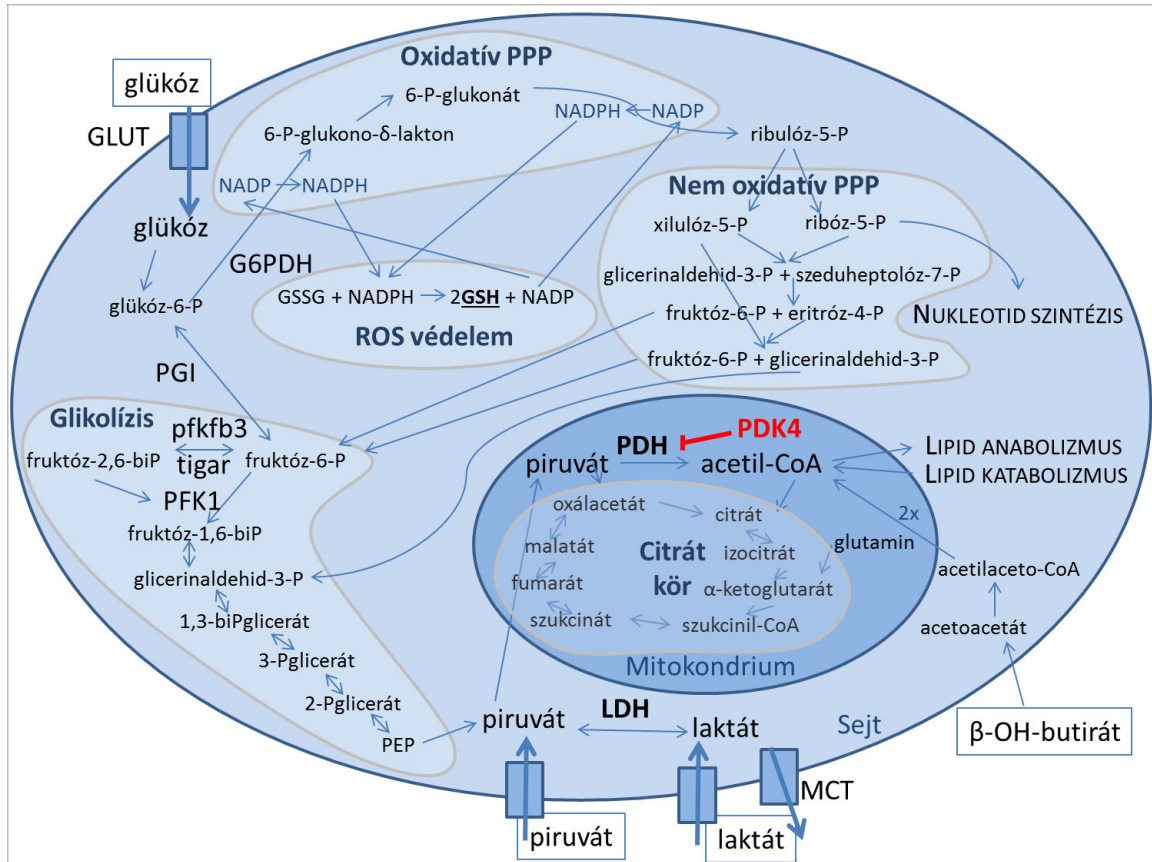
## Anyagcsere a kifejlett idegszövetben, neuronokban és asztrocitákban

Az emberi agy nagy mennyiségű glükózt (szőlőcukrot) (a teljes fogyasztás 25 %-a) és oxigént (20%) fogyaszt, annak ellenére, hogy kis tömeggel (a teljes testhez képest 2%) rendelkezik [54], [55]. Ennek az oka a speciális működésében van, hiszen az energia nagy részét három fő folyamathoz használja [54]. Az első az ion gradiensek kialakítása és fenntartása, amely állandó készenlétben tartja a sejtet és lehetővé teszi a hirtelen membrán potenciál változást. A második szintén nagy mennyiségű energiát igénylő folyamat a kiterjedt sejt felszíni membránok megújítása. Az idegsejtek mellett, hogy állandóan megújítják hatalmas membrán felületeiket, arra is képesek, hogy aktivitás függő módon növeljék (LTP: long-term potentiation) vagy csökkentsék (LTD: long-term depolarization) a szinaptikus felszíneiket, illetve új szinaptikus kapcsolatokat létesítsenek vagy nem használt kapcsolatot szüntessenek meg. Végül, harmadszor a neurotranszmitterek és szabályozó peptidek szintetizálásához is rengeteg energiára van szükség.

A központi idegrendszer **glükózt** használ fel elsődleges energiaforrásként. Ez nem helyettesíthető, hanem csak kiegészíthető laktáttal erőteljes fizikai aktivitás során vagy ketontesttel tartós éhezéskor, amikor a vérben megemelkedett ezek szintje és a vér-agy gát monokarboxilát transzferázok (MCT) szintje felül szabályozott. A vér-agy gátnál a szoros kapcsolat az endotél sejtek között és a transzporterek hiánya nem teszi lehetővé egyes zsírsavak és aminosavak közvetlen felvételét [55]. A vér-agy gáton az endotél sejtek membránján a GLUT1 általános glükóz transzporterrel jut át a glükóz, amit aztán szintén a GLUT1 transzporterrel vesznek fel a glia (asztrocita, oligodendroglia és mikroglia) sejtek az extracelluláris térből. A neuronok a neuron specifikus GLUT3 transzporterrel veszik fel a glükózt, amely nagyobb affinitással rendelkezik, ezáltal a glükóz szint változásaitól szinte függetlenül lehetővé teszi a neuronok állandó glükóz ellátottságát [55]. Mivel az agy oxigénfogyasztásának glükóz fogyasztásra eső hányadosa  $5,5 \pm 0,13$ , amely majdnem eléri az elméleti teljes glükóz lebontás ( $6 \text{ O}_2/\text{glükóz}$ ) értékét, feltételezték, hogy az agyban elsősorban mitokondriális oxidatív foszforiláció megy végbe [55], [56]. A különbség valószínűleg a szintetikus folyamatok és a laktát termelés miatt adódik [55]. Az agy oxigénfogyasztása az éppen fennálló helyi aktivitásnak megfelelően változik [54], [55]. Az oxidatív foszforilációt egyaránt táplálhatja glükóz vagy valamilyen más metabolit, mint például laktát (tejsav savmaradéka), piruvát (pirosszőlősav savmaradéka) és/vagy béta-hidroxi-butirát (egy ketontest) (4. ábra).

A **laktát** nagy mennyiségben fordul elő a központi idegszövet extracelluláris terében. Az agyi aktivitás során az aerob glikolízis mértéke megnő, amely nagy mennyiségű laktátot eredményez [54], [55]. Az asztrociták nagy mennyiségű glükózt vesznek fel és nagyon aktív glikolízist folytatnak, sőt a felvett glükózból glikogént is szintetizálnak és tárolnak. Azonban az asztrocitákban raktározott glikogén mennyisége minimális és az idegi aktivitásnak megfelelően változik [54], [55]. Nagyobb aktivitás során csökken a raktár mennyisége, míg alvás közben nő [54]. Míg a neuronok glükóz felvétele nem változik inzulin hatására, addig az asztrocitáké megnő [42].

Az agy extracelluláris terében a vérplazma szintjével összevethető laktát található. A működő agyi szövetben azonban ez az érték jelentősen megnőhet. Az hogy ezt a megnövekedett laktátot az idegsejtek vagy az asztrociták termelik, régóta kérdés. Hiszen nem áll rendelkezésre olyan technika amivel megfelelő idő és térbeli felbontással jellemezni lehetne egyedi sejtek anyagcsere aktivitását *in vivo* [55]. Ennek megfelelően két elmélet van, az első az asztrociták számára tulajdonítja a nagyobb laktát termelést. Ez az elmélet abból indul ki, hogy a neuron alacsonyabb glikolítikus aktivitással rendelkezik, mint az asztrociták [57], mert a glikolízis harmadik lépésért felelős kulcsenzim a foszfofruktokináz 1 (PFK1) aktivitása az idegsejtekben nagyon alacsony [57]. Ennek az az oka, hogy a PFK1 fő aktivátora, a fruktóz-2,6-biszfoszfát kis koncentrációban van jelen, mivel az ezt létrehozó enzim a PFKFB3 aktivitása alacsony a folyamatos proteozómális degradációja miatt [57]. (4. ábra) Ennél fogva a neuron glikolítikus aktivitása alacsony, de ennek ellenére a mitokondriális energiatermelése magas. Így az oxidatív foszforilációra a neuron valamilyen más szubsztrátot használhat fel.

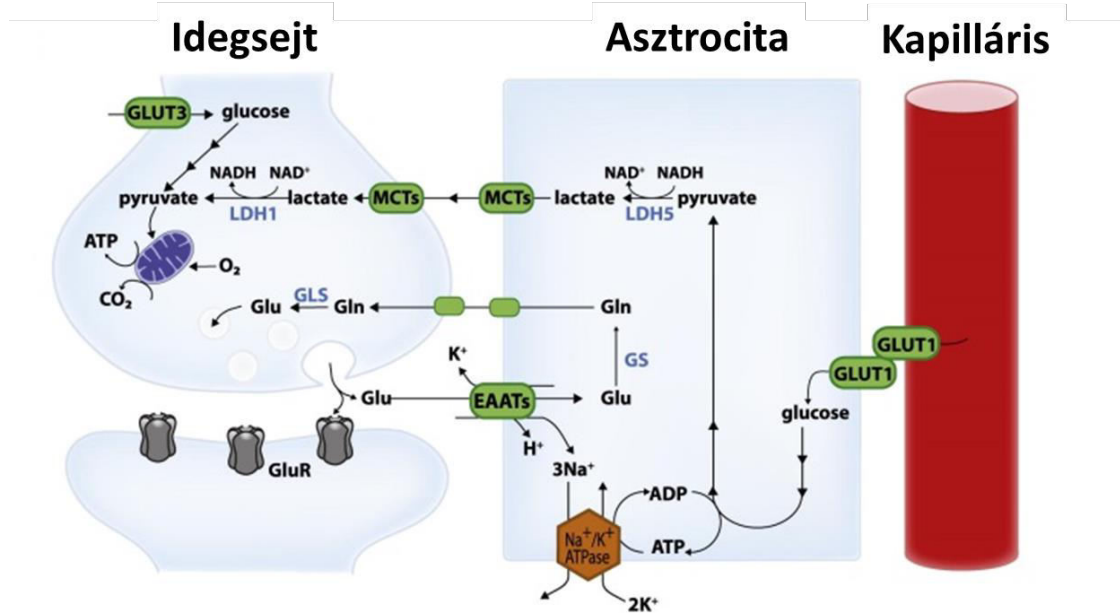


4. ábra: Anyagcsere a sejtekben (saját ábra)

A sejtek a glükóz transzporterekkel (GLUT) felvett glükózt első lépésben glükóz-6-fosztáttá foszforilálják, hogy ne áramolhasson ki a sejtől. A glükóz-6-fosztát többsége a glikolízisen keresztül piruváttá alakul. A piruvát aztán vagy laktáttá alakulva kijutatható a sejtől a monokarboxilát transzferázokon (MCT) keresztül vagy a mitokondriumba léphet, és ott acetyl-CoA-vá alakulva a citrátciklusban hasznosul tovább. A citrátciklusban keletkező  $\text{NAD}^+$  és  $\text{FAD}^+$  koenzimekből az elektrontranszportlánc segítségével nagy mennyiségű ATP termelhető. A glükóz-6-fosztát hasznosulhat a pentóz foszfát útvonalon (PPP) keresztül is, amelynek eredményeként képződő redukáló NADPH koenzimek védelmet nyújtanak az oxidatív szabad gyökök (ROS) ellen. Jelölések: PGI: foszfoglukóz-izomeráz, pfkfb3: 6-foszfofruktó-2-kináz/fruktóz-2,6-bifoszfátáz 3 enzim, tigar: TP53-indukált glikolízis és apoptózis szabályzó enzim, PFK1: foszfofruktokináz 1, PEP: foszfoenolpiruvát, LDH: laktát dehidrogenáz, PDH: piruvát dehidrogenáz komplex, PDK4: piruvát dehidrogenáz kináz 4, G6PDH: glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, NADP: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát, NADPH: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált formája, GSSG: glutation diszulfid, GSH: glutation, P: foszfo/foszfát

Az asztrociták a nagy mennyiségű glükóz felvétel és a nagyon aktív glikolízis során a glikolízis végtermékeként képződő laktátot az extracelluláris térbe bocsátják [54], ennek köszönhető a magas laktát tartalom. A laktát szint a helyi neuronális aktivitás hatására átmenetileg kicsit lecsökken, majd fokozatosan nő és még egy kicsit túl is ló a szükséges szint fölé. Eközben a NAD-NADH alapján a neuronokban jelentősen megnő a citrátciklus aktivitása, míg az asztrocitákban alig változik [54]. Ezek alapján megalkották az asztrocita és neuron közti laktát inga hipotézist [58], mely szerint az aktív neuronok, illetve azok nyúlványai az asztrociták által termelt laktátot használják fel energianyerésre.

Az asztrociták a neuronoktól származó szinaptikus glutaminsav vagy GABA felvétel hatására (pl.: glutamát-glutamin cikluson keresztül, amelynek eredményeként a glutamátot eltávolítják az idegvégződések környezetéből, majd glutaminná alakítják és a glutamint felvehetővé teszik a neuronok számára, (5. ábra) [59]) fokozzák a glükóz felvételüket és az energiafelhasználásukat glikolízissel fedezik. A keletkező piruvátot a laktát-dehidrogenáz (LDH) 5 enzim segítségével laktáttá alakítják, majd az MCT1 és az MCT4 (monocarboxylate transporter) segítségével kibocsátják az extracelluláris térbe. A glutamáterg neuronok végződésai az MCT2 segítségével felveszik a laktátot, majd a laktát-dehidrogenáz 1 (LDH1) enzimmel piruváttá alakítják, ami aztán hasznosul a lokális mitokondriális citrátciklusban és az oxidatív foszforiláció révén energiát biztosít a neuron végződésnek [54] (5. ábra). Az egyik legfőbb érv a fenti modell ellen, hogy a glutaminsav felvétel hatására fokozódó energia igényét az asztrocita akár a glutaminsav citrátciklusi eloxidálásából is nyerhetné [55].



5. ábra: A laktát inga hipotézis ([54] nyomán)

A hipotézis szerint a serkentő neuronok szinapszisában glutaminsav szabadul fel, amely aktiválja a posztzinaptikus glutamát (GluR) receptorokat. A szinaptikus résből „kicsurgó” glutaminsavat az asztrocita felveszi a serkentő aminosav transzporterek (EAAT: excitatory amino acid transporter, főként a GLT-1: glutamát transzporter 1 [EAAT2] és a GLAST: glutamát aszpartát transzporter [EAAT1]) segítségével. Az asztrocitában a glutamát a glutamin-szintáz (GS) enzim hatására glutaminná alakul. A glutamint az asztrocita az extracelluláris térbe bocsátja, ahonnan a neuron felveszi és a glutaminázzal (GLS) glutaminsavvá alakítja. Ez a serkentő szinapszisok esetén közvetlenül felhasználható a vezikulumok megtöltéséhez. A glutamát-glutamin ciklus (Bak et al., 2006) során az asztrocita minden felvett glutaminsavval 3 Na<sup>+</sup> iont is felvesz, amelyet az ion egyensúly fenntartására az asztrocita energia igényes folyamattal, a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-áz segítségével juttatja ki az extracelluláris térbe. Ennek következtében elhasznál ATP-t. Az ATP szint visszaállítása az asztrocita GLUT1 (glucose transzporter 1, újabban Slc2a1) segítségével felvett glükóz glikolízisből származó ATP-vel történik. A keletkező piruvátot a laktát-dehidrogenáz 5 (LDH5) enzim segítségével laktáttá alakítja, majd az MCT1 (monocarboxylate transporter) és az MCT4 segítségével kibocsátja az extracelluláris térbe. A neuron glutamáterg szinapszisa az MCT2 segítségével felveszi a laktátot, majd a laktát-dehidrogenáz 1-el (LDH1) piruváttá alakítja, ami aztán hasznosul a mitokondriális citrátciklusban és az oxidatív foszforiláció révén energiát biztosít az aktív szinapszishoz. A neuron a GLUT3 (újabban: Slc2a3) glükóz transzporterrel képes glükóz felvételére. Glu: glutaminsav, Gln: glutamin, glucose: glükóz/szőlőcukor, pyruvate: piruvát, lactate: laktát



A másik elmélet szerint a nagyobb glükóz felhasználók az aktivált idegsejtek, és az általuk termelt laktátot használják fel az asztrociták [55]. Mivel az agy elsősorban glükózt használ fel és a neuronok rendelkeznek glükóz transzporterrel [60], ezért alapvetően a neuronok glükózt használnak fel elsődleges energiaforrásként. Ez a neuron asztrocita laktát inga hipotézis. Ezt támasztja alá az is, hogy a neuronális glükóz fogyasztás arányosan változik a glutamát neurotranszmisszióval [55]. Az asztrociták felveszik a laktátot és a rés kapcsolattal rendelkező asztrocita hálózatában elosztják azt. Ez így kétszer vagy négyszer gyorsabb, mintha a neuronok vennék fel a laktátot vagy ha az asztrocita adja át a laktátot a neuronnak [55]. A többlet laktátot pedig az asztrocita végtalpakon keresztül a keringésbe juttatják. Azonban erőteljes fizikai aktivitás során, amikor a vér laktát szintje megemelkedik, az agy felveszi és hasznosítja a laktátot [55].

Az idegsejtek glükóz felhasználásának azonban más jelentősége is van, és ezzel felvetődött, hogy a neuronok a glükózt elsősorban nem energiatermelésre hasznosítják. A glükóz jelentős része a pentóz foszfát útvonalon hasznosul, ami a citoplazmatikus NADPH mennyiségét növeli. A citoplazmatikus NADPH szükséges az antioxidáns glutation létrehozásához [61] (4. ábra). Mivel az intenzív anyagcserét folytató neuronok nagymértékben használják a mitokondriális oxidatív foszforilációt energianyerésre, ezért különösen ki vannak téve a mitokondriális szabadgyökök károsító hatásának a hosszú élettartam folyamán. A hosszú élettartam számára létfontosságú a károsító oxidatív szabadgyökök alacsony szinten tartása, ezért a hosszú élettartamú idegsejtekben a pentóz foszfát útvonalon hasznosuló glükóz az oxidatív károsodások kivédését szolgálja.

A neuronok jelentős mértékben hasznosítanak zsírsavakat és ketontesteket intenzív oxidatív foszforilációs folyamataik számára különösen a fejlődés vagy az éhezés során [54]. De a ketontestek energia adó szerepe nagy jelentőségű egyes gyógyszerre nem reagáló (elsősorban gyerek és fiatalok) epilepsziás betegségeknél, mivel a ketogén (szénhidrát szegény és zsír dús) diéta segíti a visszatérő rohamokat mérsékelni [55], [62]. A **ketontestek** (elsősorban a  $\beta$ -hidroxybutirát és az acetoacetát, de ide sorolható spontán bomlástermékük az acetón is) alternatív energiaforrásként szerepelhetnek a neuron anyagcserében. A  $\beta$ -hidroxybutirát az acetoacetáton keresztül acetoacetyl-coA-vá alakulva két acetyl-coA-t képes létrehozni, amely a citrátciklusban hasznosulni képes [62] (4. ábra).

A felnőtt idegszöveti anyagcsere többé-kevésbé ismert, annak ellenére, hogy intenzív vita van az energia termelés és metabolitok asztrocita és neuronok közötti eloszlása körül [63], [64]. Más idegszöveti sejttípusok, köztük a különböző idegi őse és progenitor sejtek energia igényéről és anyagcsere jellegzetességeiről jóval kevesebbet. A jövőbeli idegi sejterápiák kidolgozása

érdekében, meg kellene ismernünk a sejtprólást igénylő agyi régiók és a terápiásan felhasználható őssejtek anyagcsere sajátosságait.

## Vizsgálati modellek

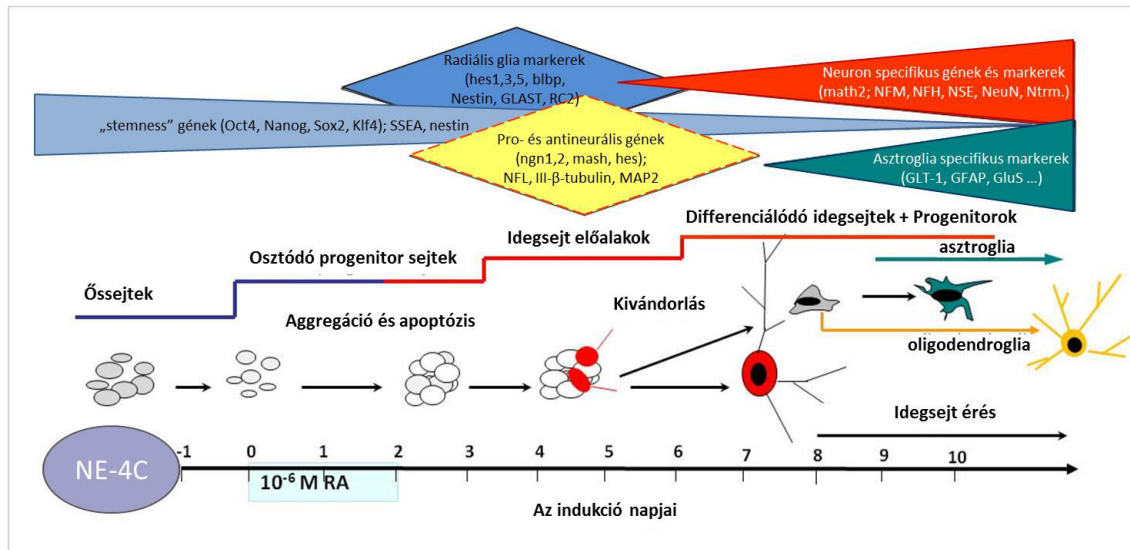
Mivel a fejlődő és kifejlett agyban nagyon nehéz a sejtfejlődést kísérő anyagcsere változásokat vagy az egyes progenitor populációk vándorlásának ingerfüggőségét vizsgálni, ezért *in vitro* idegsejt differenciációs modelleket használtam.

Tézismunkám során az *in vitro* idegsejt képzés modelljeit alkalmaztam. A korai embrionális NE-4C idegi őssejtek [65] neuronná alakulásának folyamán vizsgáltam, hogy az idegsejtekre jellemző egyes anyagcsere tulajdonságok hogyan változnak a sejt differenciáció egyes fázisaiban. A radiális glia jellegű (RGI) idegi progenitor sejtek [66] neurogenézise során a sejt vándorlás változásait elemeztem az ionos stimulációval hatására.

### Az NE-4C idegi őssejt vonal

Az idegi őssejtek differenciálódásának vizsgálatára rengeteg *in vitro* sejt modellt hoztak létre, köztük a kutatócsoportunk által létrehozott NE-4C (ATTC: CRL-2925) idegi őssejt vonalat. Az NE-4C egy embrionális neuroektoderma eredetű idegi őssejt vonal, amelyet p53-hiányos [28], 9 napos egér embriók elülső agyhólyagjaiból izoláltak [65]. Alapállapotban az NE-4C sejtek 16-20 órás osztódási ciklussal folytonosan szaporodnak. Az epitél morfológiájú sejtek *oct4* és *nanog* őssejt géneket expresszálnak, SSEA-1 és nestin immun pozitivitást mutatnak. *All-transz* retinsavval ( $10^{-6}$  M) történő 12-48 órás kezelés hatására a sejtek differenciálódni kezdenek, és jól reprodukálható lépések során neuronná, asztrocita és oligodendroglia sejtekké fejlődnek (6. ábra). Az indukció 3. napján a sejtek aggregátumokat képeznek és megjelennek az aggregátumokban az első neuron alakok [65], amelyek hosszú nyúlvánnyal, MAP2 és  $\beta$ -III-tubulin festéssel jellemezhetők. Az indukció 4-5. napján a csomókból sejtek vándorolnak ki, amelyek közül sok idegsejtté fejlődik. A 8. napra a tenyésztet sejtjeinek 40-50%-a synapsin és NeuN immunreaktivitással és  $\text{Na}^+$  alapú akciós potenciállal jellemezhető neuronná alakul [67]. A neuron képzés folyamatait részletesen elemezték a sejt morfológiai, immunocitokémiai markerek [68],

sejtkapcsolatok [69], elektrofiziológiai sajátágok [67] és ioncsatornák megjelenésének szintjén [70], [71] is. Az indukált NE-4C tenyészetekben az indukció 9. napjától jelennek meg a GFAP-val festhető asztrocita sejtek, amelyek száma a 3. hét végéig folyamatosan nő [72]. (6. ábra) Oligodendroglia képződés ez után figyelhető meg. A fejlődés minden állapotában tartalmaz a tenyészet SSEA-1 és oct4 pozitív összejt jellegű sejteket, ezek aránya a differenciáció előrehaladtával csökken.



6. ábra: NE-4C idegi össejtek neurális fejlődésének lépései ([3] nyomán)

Az NE-4C össejtek először aggregálódnak, majd az idegsejt előalakok kivándorolnak és idegsejtté (vagy asztrocitává és oligodendrocitává) differenciálódnak 48 órás retinsav (RA) kezelés hatására. A folyamat során az össejt markerek expressziója csökken, a neuron és az asztrocita markerek kifejeződése nő. További részletek a szövegben.

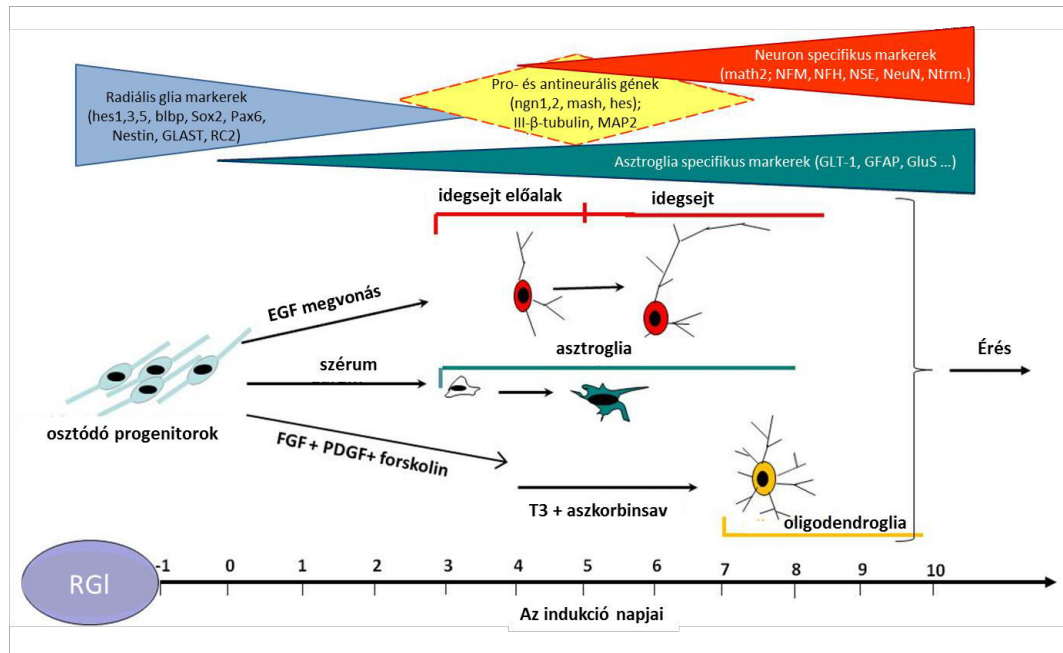
Az anyagcsere vizsgálatokat indukálatlan NE-4C össejteken és az indukció 2. hetén fejlődő NE-4C eredetű idegsejteken végeztem.

## A radiális glia jellegű ős/progenitor sejt vonal

Az agykéreg szerveződésében különösen fontos szerepet játszik a másodlagos germinatív zóna progenitor sejtjeinek bevándorlása. Ezek a sejtek az előagy ventrális részéről (a pallium/szubpallium határán alakuló ganglion dombokból) kamrafal menti (ún. transzverzális) vándorlással jutnak a fejlődő kéreg menti lemezbe, majd innen a primer radiális glia sejtek mentén, radiális migrációval „hatolnak be” a fejlődő kéregbe. Ezekből a sejtekből alakul a II. és III. kérgi réteg minden interneuronja. Radiális glia jellegű RGI sejtek az előagy fejlődésének későbbi stádiumaiban is jelen vannak, megtalálhatók a kifejlett egér agy minden régiójában is [3], [66].

A laboratóriumunk által izolált és jellemzett radiális glia jellegű sejtek nem az „ősi” primer germinatív zóna sejtjei, hanem a szubventrikuláris zónából származó későbbi radiális glia sejtekre hasonlítanak [66]. Embrionális (E 14-15, E17-18), újszülött (P0-3) és felnőtt (P50-75) agyban is jelen vannak, és az agy igen különböző régióiból izolálhatók [66]. Mint azt a laboratórium munkatársai igazolták [3], [66], a RGI sejtek agyi lokalizációjuknak és differenciációjuk fokának megfelelően, a radiális glia sajátságok mellett, sok egyedi, idegszöveti őssejt sajátságot hordoznak, és megfelelő indukciós hatásokra, idegsejteket, asztrocitákat és oligodendroglia sejteket képeznek *in vitro*.

Az RGI sejtek szelektív AK-c[RGDfC] adhézión felületen [73] szérumban mentes tápoldatban epidermális növekedési faktor (EGF) jelenléte mellett fenntarthatók és szaporíthatók. Megnyújtott epitél morfológiát mutatnak és függetlenül az izoláció helyétől hasonló molekuláris, morfológiai és fejlődési karakterisztikával jellemezhetők. Az RGI sejtek idegsejt képzése az EGF megvonásával indítható, és 5-7 napon belül idegsejtek megjelenését eredményezi. Megfelelő differenciációs protokoll alkalmazása esetén asztrocitává vagy oligodendrocitává fejlődnek (7. ábra) [66].



7. ábra: Radiális glia jellegű sejtek neurális fejlődésének lépései ([3] nyomán)

A radiális glia jellegű őssejtek EGF megvonás hatására idegsejtté differenciálódnak. Szérum hatására asztrocitává, különböző növekedés faktorok hatására oligodendroglivá differenciálódnak. A folyamat során az őssejt markerek kifejeződése csökken, a neuron és az asztrocita markerek expressziója nő. További részletek a szövegben.

Az 1 napos indukció az elkötelezett progenitor állapotnak, az 5 napos pedig az idegsejt előalak állapotnak felel meg. A csoport korábbi eredményei alapján az elkötelezett progenitor állapotban a radiális glia markerek expressziója csökken, nő a proneurális és anti-neuronális (glia sorsot meghatározó) gének expressziója. Az idegsejt előalak stádiumban megindul a neuron specifikus gének (pl.: math2) expressziója és az immuncitokémiai mintákon nyúlványos neuron morfológiájú  $\beta$ -III-tubulin festődést mutató sejtek láthatóak [3], [66]. Az elektrofiziológiai jellemzés alapján a kálium csatornák mellett megjelennek a neuron specifikus feszültség függő nátrium csatornák is [66].

## Célkitűzések

Kutatásom során olyan környezeti feltételek hatásait kívántam vizsgálni, amelyek jelentősen befolyásolhatják az idegi őssejtek idegszövetben való túlélését és idegsejt irányú fejlődését.

- I. Embrionális egér neuroektoderma eredetű idegi őssejtek és differenciált utódsejtjeik anyagcsere sajátosságait vizsgáltam az NE-4C sejtek *in vitro* neuron képzése során. Az idegi őssejtek és fejlődő idegsejt alakok O<sub>2</sub> fogyasztását, H<sup>+</sup> produkcióját mértem és elemeztem ezek változását különböző metabolitok hatására. Az NE-4C sejteken mért adatokat összehasonlítottam primer idegsejt és asztrocita tenyészeteken nyert adatokkal.

A következő kérdésekre kerestem a választ:

1. Hogyan változik meg az idegi őssejtek anyagcsereje a neuronális differenciáció során?
2. Milyen tápanyag molekulákat használnak a neuronális őssejtek és a belőlük fejlődő neuronok?
3. Milyen anyagcsere útvonalakon nyernek energiát a neuronális őssejtek és a neuronok?
4. NE-4C őssejt neuronális differenciációja során fejlődő neuronok hasonló anyagcsere tulajdonsággal rendelkeznek-e, mint az embrionális egér agyból származó primer neuronok?

- II. Képelemző és statisztikai módszerekkel elemeztem a radiális glia jellegű idegi ős/progenitor sejtek mozgásáról készült time-lapse felvételeket annak eldöntésére, hogy az indukált ioneloszlás változás milyen módon befolyásolja az őssejtek vándorlását.

A következő kérdésekre kerestem a választ:

1. Kimutatható-e statisztikailag szignifikáns változás a sejtek motilitásában a neuron képzés előrehaladtával?
2. Kimutatható-e statisztikailag szignifikáns motilitás változás az ion stimulált és nem stimulált, azonos fejlődési állapotú sejtek között?

## Anyagok és módszerek

### Sejtenyészetek

A sejtenyésztő felületeket a sejtek kiültetése előtt minden alkalommal poli-L-lizinnel (PLL; Sigma) fedtük. A sejteket 37 °C-os, vízgőz telített, 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó termosztátban tartottuk fenn.

#### NE-4C őssejtek fenntartása

Az NE-4C ([65]; ATTC-CRL-2595) neuronális őssejteket MEM (Minimum Essential Medium; Sigma), 5% hő inaktivált magzati borjú szérummal (FCS: foetal calf serum; PAA) kiegészített, 4 mM L-glutamine-t (Sigma), 40 µg/ml gentamicin-t (Chinoin) és 2,5 µg/ml amphotericin B-t (Sigma) is tartalmazó tápoldatban tenyésztettük. A sejteket  $5 * 10^4$  sejt/cm<sup>2</sup> sűrűségben ültettük ki a petri csészékbe és a 96 lyukú Seahore plate-be  $1,5-2,0 * 10^4$  sejt/lyuk sűrűséggel, majd másnap mértük le a sejtek anyagcseréjét. A petri csészékben hagytuk, hogy a sejtek semikonfluensre, ~85%-os lefedettségig nőjék be a tenyésztő edényt. A semikonfluens tenyészeteket tripsint tartalmazó PBS oldattal passzáltuk. A passzálás során a tenyészeteket PBS-sel (2,68 mM KCl; 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 136,89 mM NaCl; 8,00 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [Reanal]; pH=7,2) mostuk, majd 0,05% (w/v) -os tripsin-EDTA (Gibco) oldattal kezeltük 1-3 percen át. Az aljzatról leváló sejteket szérum tartalmú tápoldattal felmostuk az aljzatról (a szérum jelenlétével inaktiválta a tripsint is), majd egy új, tápoldatot tartalmazó tenyésztő edényben oszlattuk el egyenletesen a sejteket. A tápoldatot hetente háromszor cseréltük.

#### NE-4C őssejtek differenciálása neuronokká

A konfluens, a tenyésztőfelületet teljesen benőtt NE-4C őssejtek tenyészetéhez  $10^{-6}$  M végkoncentrációjú all-transz retinsavat (RA; Sigma) adtunk szérum mentes tápoldatban, melynek az összetétele 50% DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium; Sigma), 50% F12 nutrient

medium (Sigma), 4 mM L-glutamin, 1% (v/v) ITS (Insulin–Transferin–Selenium; Gibco) és 1% (v/v) B27 (Gibco) neuronális kiegészítő. Emellett 40 µg/ml gentamycinnel (Chinoin) and 2,5 µg/ml amphotericin B-vel (Sigma) egészítettük ki a tápoldatot. A RA hígítását és a sejtek RA kezelését sötétben, csökkentett fény mennyiség mellett végeztük. A 48 órás retinsavas neuronális indukció után a sejteket szérum mentes tápoldatban tartottuk. A differenciált NE-4C tenyészetek az indukció második hetén lettek felhasználva az anyagcsere méréshez, mint NE-4C neuronok.

### **Primer neuronális tenyészet izolálása és fenntartása**

A primer neuronális tenyészeteket embrionális (E 15- E 16) CD1-es egerek előagyából izoláltuk steril fülkében. (Az állatkísérletes engedély: "Idegi őssejtek izolálása és jellemzése egészséges és betegség-modellként szolgáló állatok agyszövetéből" engedélyszám: 22.1/354/3/2011.) A sejteket 10% hőinaktivált FCS-et tartalmazó MEM alapú (kiegészítve: 4 mM L-glutaminnal (Sigma), 40 µg/ml gentamycinnel (Chinoin) és 2,5 µg/ml amphotericin B-vel (Sigma)) tápoldatban szuszpendáltunk. A sejtszuspenziót 40-42 µm pórus átmérőjű hálón keresztül szűrtük át [74]. A sejteket  $10^5$  sejt/cm<sup>2</sup> sűrűségben ültettük ki PLL bevonatú 60-as petri csészébe a qPCR méréshez és PLL bevonatú Seahorse 96-os platekbe sejttanyagcsere méréshez. A tenyészeteket 10% FCS-et tartalmazó MEM tápoldatban tartottuk fenn. 24 órával a kiültetés után cseréltük először a tápoldatot majd azt követően hetente kétszer. A második héten a szérumos tápoldatot szérum mentes tápoldatra cseréltük. A kiültetés utáni 11-13. napos tenyészeteket használtunk az anyagcsere vizsgálatokhoz.

### **Primer asztrocita tenyészetek izolálása és fenntartása**

Az asztrocita tenyészetek késői magzati és perinatális CD1 egerek előagyából készültek [75]. A sejteket  $10^5$  sejt/cm<sup>2</sup> sűrűségben ültettük ki 10% FCS MEM tápoldatot tartalmazó PLL bevonatú tenyésztőedényekbe. A sejteket szérumos tápoldatban tartottuk fenn heti két tápcserével. A tenyészeteket maximum háromszor passzáltuk az anyagcsere mérések előtt.



## Anyagcsere vizsgálatok

A kísérletekhez mesterséges agy-gerincvelői oldatot, ACSF (artificial cerebrospinal fluid) alapoldatot (145 mM NaCl (Reanal), 3 mM KCl (Reanal), 2 mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma), 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma), 10 mM Hepes (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S; Sigma), pH=7,2) használtunk. Ezt egészítettük ki az alábbi metabolitok egyikével: 5 mM szőlőcukor (D-glükóz [Sigma]), 5 mM Na-laktát [Sigma], 5 mM piruvát [Sigma] vagy 5 mM D,L-β -hidroxi-butirát lítium sója [Sigma].

## MTT redukciós teszt, életképesség mérés

Az MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2-5-diphenyl-tetrazolium bromide; Sigma) redukciós tesztet [76] használtuk a sejtek életképességének megállapítására „éhező” (tápanyag mentes ACSF) és normál körülmények (tenyésztő tápoldat) között. PLL bevonatú 96 lyukú plate-be 2\*10<sup>4</sup> sejt/lyuk sűrűségbe ültettük a sejteket. Az NE-4C össejteket közvetlenül a stabil letapadás után (6-8 órával a kiültetés után), az NE-4C neuronokat a neuronális indukció 8-11. napján használtuk fel. A tenyészetek egy részén a tápoldatot 50 µl ACSF-re cseréltük, egy másik részén pedig 50 µl megfelelő tápoldatra. Minden platen legalább 5 mikrotenyészet részesült azonos kezelésben. 3 órán keresztül inkubáltuk a sejteket termosztátban (37°C, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú gázközeg), ezt követően 10 µl 1,25 mg/ml koncentrációjú MTT-t [Sigma] adtunk (így a végkoncentráció 0,208 mg/ml lett), majd addig inkubáltuk a termosztátban, amíg a formazán tükrisztályok meg nem jelentek (körülbelül 1,5 óra). Ezután 150 µl savas izopropil-alkohollal (600 µl cc. HCl / 100 ml 2-propanol [Reanal]) (0,08 M HCl) alapos szuszpendálás közben, feloldottuk a formazán kristályokat és Wellcome MR5000 Elisa Readerrel (570 nm-es mérő és 690 nm-es referencia hullámhosszon) megmértük oldatok optikai denzitását. Az azonos tenyésztő plateken a tápoldatban/ACSF-ben lévő sejttenyészetek átlagának optikai denzitását 100%-nak tekintve meghatároztuk minden egyes lyuk százalékos relatív optikai denzitását. Majd ezeket az értékeket hasonlítottuk össze a három független mérés során. A csoportok (tápoldat, ACSF) átlagát és szóródását (SEM) ábrázoltuk az R statisztikai programmal [77] és szignifikanciát a két mintás T-teszttel bizonyítottuk.

## Sejtanyagcsere mérés oxigénfogyasztás és savasodás alapján

A Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyzer-t (Seahorse Bioscience) használtuk az anyagcsere vizsgálatokhoz, amely a sejtek fölötti mindössze 2,28  $\mu\text{l}$  folyadékban képes mérni az oxigénszintet és a pH-t. Az oxigénfogyasztás változásából (OCR: oxygen consumption rate, pMol/perc) az oxidatív foszforilációra, a külső környezet savasodásából (ECAR: extracellular acidification rate, mpH/perc) pedig a glikolízis mértékére következtethetünk [47].

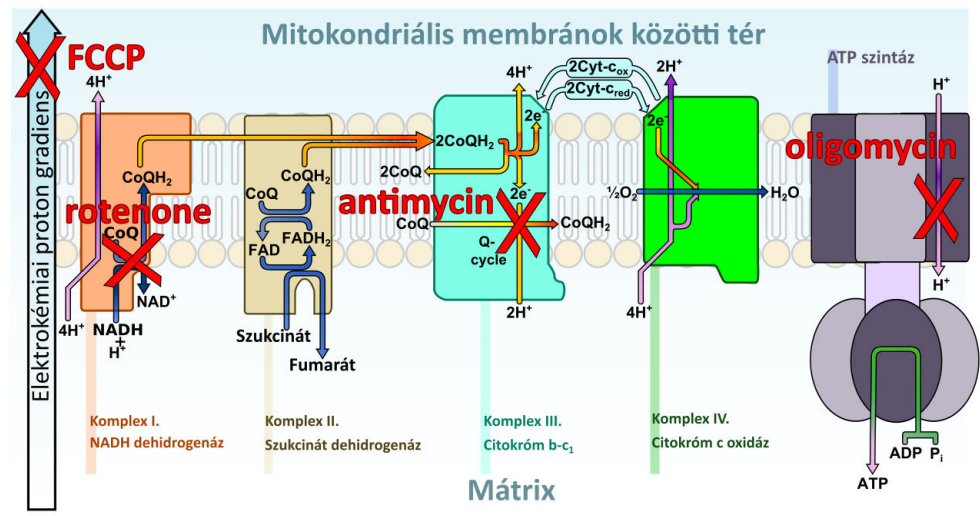
A méréseket a Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémiai Intézetének Neurobiokémia Csoportjának munkatársaival és laboratóriumában végeztük a Seahorse XF96 készülékkel. A méréshez a sejteket a MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Idegi Sejt- és Fejlődésbiológia Kutatócsoport Laboratóriumában növesztettük és ültettük ki a Seahorse berendezéshez speciálisan kialakított PLL-el bevont 96 lyukú plate-ekre, amelyek sejtek által benőhető felülete 11,3  $\text{mm}^2$  ([www.seahorsebio.com](http://www.seahorsebio.com)).

A sejttenyészeteket átmostuk ACSF-sel, hogy eltávolítsuk a tápoldatban maradt tápanyagokat. Majd 180  $\mu\text{l}$  ACSF hozzáadását követően másfél óráig inkubáltuk a Seahorse XF Prep Station (Seahorse Bioscience) (37°C-os  $\text{CO}_2$  mentes) inkubátorában, hogy a műanyaghoz kötődött  $\text{CO}_2$  kidiffundáljon és ne zavarja a pH mérést. A Seahorse sejttenyésztő platekbe merülő Cartridge plate tartalmazza a szenzorokat, ezért egy nappal a mérés előtt a XF Calibrant oldatba helyeztük a fluorokróm tartalmú szenzor felszínének aktiválására. A Cartridge 4 anyag adagoló mikrotartályát feltöltöttük ACSF-ben oldott metabolittal (glükóz, laktát, piruvát,  $\beta$ -OH-butirát, ACSF; A port) vagy anyagcsere gátlókkal (2  $\mu\text{M}$  oligomycin (Sigma; B port), 0,4  $\mu\text{M}$  FCCP (fluoro3-carbonil cyanide-methoxy-phenylhydrazone; Sigma; C port) vagy 100  $\mu\text{M}$  DNP (2,4-dinitrophenol; Sigma; C port), 1  $\mu\text{M}$  antimycin (Sigma; D port) és DNP esetében 1  $\mu\text{M}$  rotenon (Sigma; D port) kiegészítésével). A Cartridge-t a mérés megkezdése előtt fél órával  $\text{CO}_2$  mentes inkubátorban 37°C-ra melegítettük fel. A Cartridge szenzorainak kalibrálása után indult a mérés. A szenzor felszínbe épített két fluorokróm egyike az extracelluláris oxigén koncentrációt (excitációs hullámhossz: 532 nm, emissziós hullámhossz: 650 nm), a másik a pH-t méri (excitációs hullámhossz: 470 nm, emissziós hullámhossz: 530 nm) egyszerre a 96-lyukú Seahorse platen. A mérés során a mérőhenger légmentesen lezárja a sejtréteg fölött 200  $\mu\text{m}$ -rel a Seahorse sejttenyésztő platejét. Az  $\text{O}_2$  és  $\text{H}^+$  koncentráció értékeit a műszer 15 másodpercenként határozza meg és az általunk beállított időtartamon át folytatja. Az oxigéntartalom ez időn keresztül folyamatosan csökken a sejtek oxigénfogyasztásának megfelelően. Az egyes mérések időtartamát

a sejtek  $O_2$  fogyasztási sebességétől függően 2-3 perc hosszúságra állítottuk be. Minden mérés előtt egy 3 perces keverési lépést iktattunk be, amely a Cartridge fel-le mozgásával a műszer alaposan megkeverte folyadékteret, ezáltal segítve oxigénnel való dúsítását. Az egy mérési időszak alatt detektált koncentrációértékekre illesztett egyenesnek a meredekségéből a műszer automatikusan számolja az  $O_2$  és  $H^+$  koncentráció percenkénti változásait, az oxigénfogyasztási rátát (OCR), illetve az extracelluláris tér savasodásának rátáját (ECAR). Egy mérés sorozat során keveréseket és a méréseket általában ötször ismételtük. [47], [78]

Az első mérés sorozatban, a másfél órás inkubációt követő fél órában felvettük az ACSF-ben lévő, éhező sejtek oxigénfogyasztásának/savasodásának „alapvonalát”. Majd az A adagoló portból ACSF-ben oldott metabolitokat (5 mM végkoncentrációjú glükózt, laktátot, piruvátot,  $\beta$ -OH-butirátot), illetve üres ACSF-et adtunk a tenyészetekhez, a keverést követően folytatódott a mérés. Minden egyes kezelés esetén platenként 6-12 lyukat használtunk. Majd a második, fél órás méréssorozatban felvettük a kezelés hatására megváltozott OCR/ECAR alapvonalat (12. ábra, 11. ábra).

Ezt követően anyagcsere szétkapcsolókkal ellenőriztük a mitokondriális működés épségét. A harmadik mérés sorozat elején  $2 \mu\text{M}$  oligomycint adtunk a sejtekhez a B adagoló porton keresztül. Az oligomycin gátolja az ATP szintáz működését, ami így csökkenti a hidrogén ion transzportját a membránon keresztül és ennek eredményeként a hidrogénionok felhalmozódnak a mitokondrium két membránja között. A kritikus hidrogénion koncentráció felett az elektrontranszportlánc majdnem teljesen leáll és az oxigénfogyasztás lecsökken. (Az ekkor megfigyelhető kis mértékű oxigénfogyasztásért a mitokondriális protonszivárgás felelős.) A negyedik mérés sorozat elején  $0,4 \mu\text{M}$  FCCP-t vagy  $100 \mu\text{M}$  DNP-t a C adagoló porton keresztül. Ezek az anyagok mobilis ion transzporterek, amelyek átjutatják a hidrogén ionokat a mitokondrium belső membránjába (anélkül, hogy közben ATP-t tudna termelni az ATP szintáz) így felpörgetik az elektron transzport láncot és nagymértékben megnövelik az oxigénfogyasztást. Az utolsó, ötödik mérés sorozat elején  $1 \mu\text{M}$  antimycint a D adagoló porton. (DNP hozzáadás esetén ezt egészítettük ki további  $1 \mu\text{M}$  rotenonnal.) Az antimycin a mitokondriális elektrontranszportlánc III. komplexét, a rotenon pedig a mitokondriális elektrontranszportlánc I. komplexét gátolja. A légzési lánc leállításával teljesen megszünteti a mitokondriális oxigénfogyasztást (11. ábra, 12. ábra, 8. ábra).



8. ábra: A mitokondriális blokkok hatása

([https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AElectron\\_transport\\_chain.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AElectron_transport_chain.svg) nyomán)

A mitokondriumban lévő elektron transzport lánc az elektron átvitel hatására protont pumpál ki a membránok közötti térbe, így proton gradiens alakul ki a mitokondrium mátrixa és a mitokondriális membrán közti tér között. A mátrix negativitása miatt a beáramló protonok az ATP szintázon keresztül ATP-t termelnek. Az oligomycin az ATP szintázt gátolja, az FCCP egy mozgékony proton transzporter membrán két oldala között, ezáltal megszünteti a proton gradienst. A rotenone az elektron transzport lánc első komplexét, míg az antimycin a harmadik komplexét gátolja.

Ahhoz, hogy össze tudjuk hasonlítani az OCR és ECAR értékeket, mivel a tenyészetek nem pontosan ugyanannyi sejtet tartalmaztak, az összes mérési pontot ugyanazon sejtenyészet alap vonalának utolsó pontjához (100%) hasonlítottuk és relatív OCR% és ECAR% értéként adtuk meg. A csoportok átlagát és szóródását (SEM) ábrázoltuk. Legalább 3 független kísérlet sorozatot végeztünk sejtípusonként.

Az egyes metabolitok hatásánál az alapvonal utolsó pontját (100 % ± SEM) ábrázoltuk szaggatott vonallal és az adott metabolit hatására beállt új alapvonal utolsó pontját szürke oszloppal (átlag % ± SEM) mind az OCR% és ECAR% esetében. (12. ábra, 13. ábra, 14. ábra, 15. ábra, 18. ábra, 19. ábra, 21. ábra) A csoport párok között kétmintás T próbával határoztuk meg a szignifikanciát.

A maximális mitokondriális légzésnél a kezelés egész időtartama alatt csak ACSF-ben lévő sejtek FCCP kezelés hatására bekövetkező relatív oxigénfogyasztás értékéből levontuk a nem mitokondriális oxigénfogyasztást (a későbbi antimycin kezelés hatását) és ezek átlagát ± SEM

ábrázoltuk az NE-4C összejt és az NE-4C neuron esetében. Majd a két csoport között kétmintás T próbával bizonyítottuk a szignifikanciát.

A protonszivárgás esetében a kezelés egész időtartama alatt csak ACSF-ben lévő sejtek oligomycinnel gátolt ATP szintáz relatív oxigénfogyasztás értékéből levontuk a nem mitokondriális oxigénfogyasztást (a későbbi antimycin kezelés hatását) és ezek átlagát  $\pm$  SEM ábrázoltuk az NE-4C összejt, az NE-4C neuron, a primer neuron és asztrocita esetében. A csoportok közötti szignifikanciát ANOVA teszttel és az azt követő TukeyHSD poszthoc teszttel ellenőriztük.

Az adatokat MATLAB-bal dolgoztuk fel és a statisztikai elemzést az R statisztikai programozással [77] végeztük el.

## **Génexpresszió meghatározása qPCR-rel**

60-as petri csészében lévő konfluens tenyészetekből teljes RNS frakciót izoláltunk és tisztítottunk RNeasy Mini Kit (Qiagen) felhasználásával a gyártó útmutatása alapján. A DNS szennyeződést a RNase-Free DNase Set (Qiagen) használatával távolítottuk el. A reverz transzkripcióhoz a teljes RNS 2  $\mu$ g-ját használtuk High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) segítségével a gyártó útmutatása alapján kiegészítve 0,5  $\mu$ l RNase Inhibitor-ral. A 20  $\mu$ l reakció keveréket 10 percig 25°C-on inkubáltuk, hogy a véletlenszerű primerek párba álljanak (annealing) a megfelelő RNS szakaszokkal, 10 percig történt 37°C-on a cDNS transzkripció és 3 percig tartott 72°C-on enzimek inaktiválása a TC-512 (Techne) PCR készülékkel. A reakciótermék cDNS-t azonos mennyiségű vízzel hígítottuk, és ennek az elegynek a 2  $\mu$ l-ét adtuk hozzá a 8  $\mu$ l Master mix keverékhez (Roche R480 LightCycler probes master lc480), amely tartalmazta az 1  $\mu$ l 5 pM végkoncentrációjú primer párt (2. táblázat) és 0,5  $\mu$ l vízzel 20x hígított EvaGreen (Biotium) festéket. A qPCR reakciósorozat 10 perc 95°C-os inkubációval kezdődött, majd 40-szer ismétlődött 15 másodperc 95°C-on, 30 másodperc 60°C-on majd a fluoreszcens mérés. A reakció a StepOnePlus (Applied Biosystems) Real-Time PCR gépben történt. A primer hatékonyságot 5 pontos standard hígítási görbe segítségével határoztuk meg, minden egyes cDNS esetében 2 párhuzamos mérési adatból (2. táblázat). Az eredményeket a  $\Delta\Delta$ CT módszer alapján [79] a StepOne v2.3 (Applied Biosystems) szoftver segítségével határoztuk meg. Minden primer esetében az azonos sejtípusból származó HPRT volt a belső kontroll, az értékeket erre

normalizáltunk. A különböző mintákban a felszorzódott termék HPRT-re viszonyított arányát az NE-4C neuronokon kapott arányhoz (=1) hasonlítottuk. Az adatokat medián  $\pm$  MAD értéként ábrázoltuk ( $n \geq 3$ ). A statisztikai szignifikanciát a Kruskal-Wallis próbával és az azt követő Dunn's teszttel támasztottuk alá. Az adatok ábrázolása és statisztikai számítása az R statisztikai programozással [77] történt.

## 2. táblázat: Felhasznált primerek

Gén	Forward	Reverse	Hatékonyság (%)
<i>hprt</i>	CACAGGACTAGAACACCTGC	GCTGGTGAAAAGGACCTCT	106,298
<i>glut1</i> ( <i>slc2a1</i> )	TGCCCAGGTGTTTGGCTTAG	TCCCTCGAAGCTTCTTCAGC	94,470
<i>glut3</i> ( <i>slc2a3</i> )	AACACTTGCTGCCGAGAACA	GATGGGGTCACCTTCGTTGTC	97,303
<i>pdk4</i>	CCAACCCTACGGATCCTAACC	GGCATTCTGAACCAAAGTCC	88,043
<i>atg12</i>	TGGCCTCGGAACAGTTGTTTAT	GGAAGGGGCAAAGGACTGAT	94,727
<i>tfam</i>	TCCCCTCGTCTATCAGTCTTGT	CCACAGGGCTGCAATTTTCC	102,946
<i>oct4</i> ( <i>pou5f1</i> )	GAGGCTACAGGGACACCTTTC	GTGCCAAAGTGGGGACCT	86,627
<i>ngn2</i> ( <i>neurog2</i> )	ACATCTGGAGCCGCGTAG	CAGCAGCATCAGTACCTCCTC	93,215
<i>math2</i> ( <i>neurod6</i> )	CGACACTCAGCCTGAAAAGA	CAAACCTTCTGCACATCTGGG	96,756
<i>mct2</i> ( <i>slc16a7</i> )	CTGACAACAGCCAAGAGAAACA	AAGGACGCACAGACTACGAC	

## Immunitokémia

Az NE-4C őssejteket 24-lyukú plate (tenyésztő tálca) lyukaiban elhelyezett 12 mm átmérőjű mikroszkópos fedőlemezekre  $2-4 \cdot 10^5$  sejt/cm<sup>2</sup> sűrűségben ültettük ki, 5% FCS MEM tápoldatban, poli-L-lizines borítás kialakítása után. A neuronális irányba differenciáltatott tenyészeteket 6-12 nappal az indukció megkezdése után használtuk fel NE-4C neuronként. Az NE-4C őssejteken és az NE-4C neuronokon tápoldatot cseréltünk. A tenyészetek fele friss tápoldatot kapott, a másik fele ACSF-et és a tenyészeteket 3 és fél órán keresztül inkubáltuk termosztátban. Majd a sejteket rajtuk lévő oldattal azonos térfogatú, 8% -os (w/v; PBS-ben) paraformaldehid (TAAB) oldat hozzáadásával 20 percig fixáltuk szobahőmérsékleten. Kétszeres PBS-s mosást követően, 5 perces 0,1%-os (v/v; PBS-ben) Triton-X100 [Reanal] kezeléssel tettük

átjárhatóvá a sejtmembránokat, majd 30-60 percen át 2%-os BSA (2 g BSA, 0,1 g Na-azid, 100 ml PBS-ben) oldattal blokkoltuk a nem specifikus fehérje kötőhelyeket. Az első réteg ellenanyagot anti  $\beta$ -III-tubulin egér IgG [Sigma] az NE-4C neuronok esetében, anti-nestin egér IgG (Chemicon) az NE-4C őssejtek esetén a blokkoló oldattal (BSA-PBS) 1:1000 arányban hígítottuk, és ezzel egy éjszakán keresztül inkubáltuk a tenyészeteket 4 °C-on. Háromszoros PBS mosást követően blokkoló oldatban 1:1000 arányban hígított anti-egér IgG-Alexa488 [Invitrogen] második réteg ellenanyaggal 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, fénytől védve inkubáltuk a preparátumokat. Ismételt háromszori PBS mosás és desztillált vizes öblítés után a lemezeket kiemeltük a plate-ből, és 10  $\mu$ g/ml Hoechst 33258 [Sigma] DNS-festékkel kiegészített Mowiol [Calbiochem] műgyanta segítségével mikroszkópos tárgylemezre rögzítettük. Az immunfestett preparátumokat Zeiss Axiovert 200M fluoreszcens mikroszkóppal és AxioVision 4.8 (Carl Zeiss) szoftverrel vizsgáltuk.

## Sejtmotilitás vizsgálat elemzése

A nem invazív optogenetikus stimulálás érdekében, Kőhidi Tímea RGl sejteket izolált a channelrhodopsin(ChR2)-gént feltételesen kifejező (floxolt konstrukció), B6;129S-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm32(CAG-COP4\*H134R/EYFP)Hze/J</sup> transzgenikus [80] egér embriókból [81]. Az izolált sejtekből sejtvonalakat alapított, majd pTurbo-Cre rekombinááz plazmid [82] transzfektálás segítségével megindította a ChR2 és az azzal kapcsolt fluoreszcens fehérje (eYFP) expressziót. A sejtvonal ChR2<sup>+</sup> és ChR2<sup>-</sup> sejtjeit eYFP fluoreszcencia alapú áramlási citométeres (FACS) sejtválogatással elkülönítette, és egymás kontrolljaként használta a migrációs vizsgálatokban. A radiális gliászterű (RGl) idegi őssejtek [66], azok channelrhodopsin-t expresszáló és nem expresszáló populációit Kőhidi Tímea tenyésztette és jellemezte [81]. A sejtek ideg irányú differenciáltatását, fénnel stimulált és nem stimulált mozgásáról készült élősejtes time-lapse felvételeket elsősorban ugyancsak Kőhidi Tímea készítette. A felvételek Zeiss Axiovert M200 mikroszkóppal 10x fluoreszcens és/vagy fázis kontraszt objektívvel készültek az AxioVision 4.8 (Carl Zeiss) szoftverrel. A sejtek a vizsgálat időtartama alatt sötétben, 37°C-os állandó hőmérsékletű, 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó mikroszkóp asztalra helyezhető inkubátor kamrában voltak. Az én feladatom volt a sejtmozgásról készült adatok elemzésére alkalmas számolási módszer kialakítása és az adatok statisztikai feldolgozása.

A ChR2<sup>+</sup> sejtek a membránjukban fénnel ( $\lambda$ = 470-490 nm) nyitható channelrhodopsin 2 kation csatornákat hordoznak, ezzel a sejtek intracelluláris ioneloszlása megvilágítással módosítható

[83]. A  $\text{ChR2}^+$  és  $\text{ChR2}^-$  sejtek megvilágításra adott mozgási válaszait élő sejt video mikroszkópos felvételeken követtük indukátlan ősz/progenitor, elkötelezett progenitor (indukció 1. napja) és idegsejt előalak (indukció 5. napja) fejlődési stádiumokban. A sejtek 12 órán keresztül 5 percenként 300 ms-ig  $0,13 \text{ mW/mm}^2$  intenzitású 488 nm hullámhosszú kék fényvel voltak megvilágítva, majd ezek után készült egy mikroszkópos kép a tenyészetéről. A kontroll csoport nem tartalmazta  $\text{ChR2}$  fényérzékeny ioncsatornát. Az elkészült képeken kísérletenként 20-20 sejtet követtünk végig manuálisan bejelölve a sejtek középpontját a CellTrack programmal. A kapott x, y koordináták értékeit egy-egy nem mozgó referenciaponttal korrigáltuk az esetleges mozgási műtermékek elkerülése végett. Az értéket  $\mu\text{m}$ -re alakítottuk a mikroszkóp nagyításának megfelelően (1 pixel  $0,645 \mu\text{m}$ -nek adódott).

A képek közötti elmozdulás távolságát a két dimenziós Euklideszi távolság alapján határoztuk meg, majd összeadva ezeket az értékeket megkaptuk a 12 óra alatt megtett teljes távolságot. A teljes távolságokat dobozdiagramként (box-plot) ábráztuk, majd a szignifikanciát a Wilcoxon–Mann–Whitney teszt segítségével állapítottuk meg. (Az 5 napos indukció során egy másik kontroll is volt a  $\text{ChR2}$ -öt tartalmazó, de nem megvilágított sejtek, így ebben az esetben a szignifikanciát a Kruskal-Wallis próbával és az azt követő Dunn's tesztekkel támasztottuk alá.) A teljes távolságok eloszlását (Kernel sűrűség becslésen alapuló) sűrűség függvény ábrázolásával mutattuk be.

A teljes távolságok alapján kategorizáltuk is a sejteket az alapján, hogy  $200 \mu\text{m}$ -nél kisebb, vagy  $200$  és  $400 \mu\text{m}$  közötti vagy  $400 \mu\text{m}$ -nél nagyobb távolságot tettek-e meg. Az így kapott adatokat halmozott oszlop diagramon ábráztunk, az adatokon a Pearson-féle khí-négyzet ( $\chi^2$ ) próbát végeztük el minden egyes kontingencia táblában és a  $\text{ChR2}$ -öt tartalmazó, illetve nem tartalmazó párok között a Fisher posthoc teszttel, Bonferroni p érték korrekció után állapítottuk meg a szignifikanciát. Az elemzést, az adatok ábrázolását (a ggplot2 csomag felhasználásával) és a statisztikai értékelését is minden esetben az R statisztikai programozással (R Core Team, 2015) végeztük el.



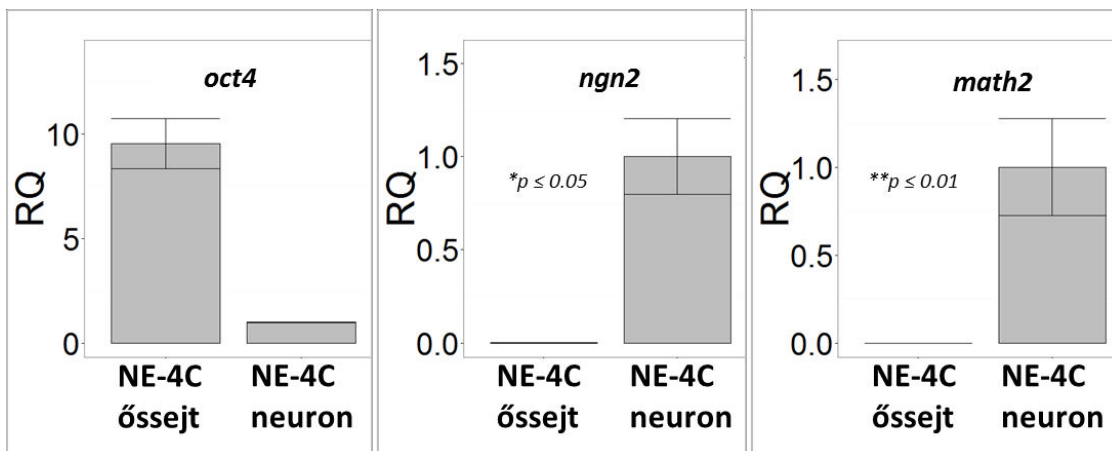
## Statisztika

Az adatok ábrázolását és statisztikai értékelését minden esetben az R statisztikai programozással [77] végeztük. Az ábrázoláshoz felhasználtuk a ggplot2 csomagot. A T-tesztek és az ANOVA tesztek esetében a normalitást a q-q plot segítségével és variancia homogenitását a Bartlett teszttel ellenőriztük. Az egyes módszereknél feltüntetettük a pontos statisztikai teszteket, amelyeket elvégeztünk. Minden esetben a  $p < 0,05$  (\*), a  $p < 0,01$  (\*\*) és a  $p < 0,001$  (\*\*\*) jelezte a statisztikai szignifikanciát.

## Eredmények

### Anyagcsere sajátságok változása az NE-4C embrionális idegi őssejtek neuron képzése során

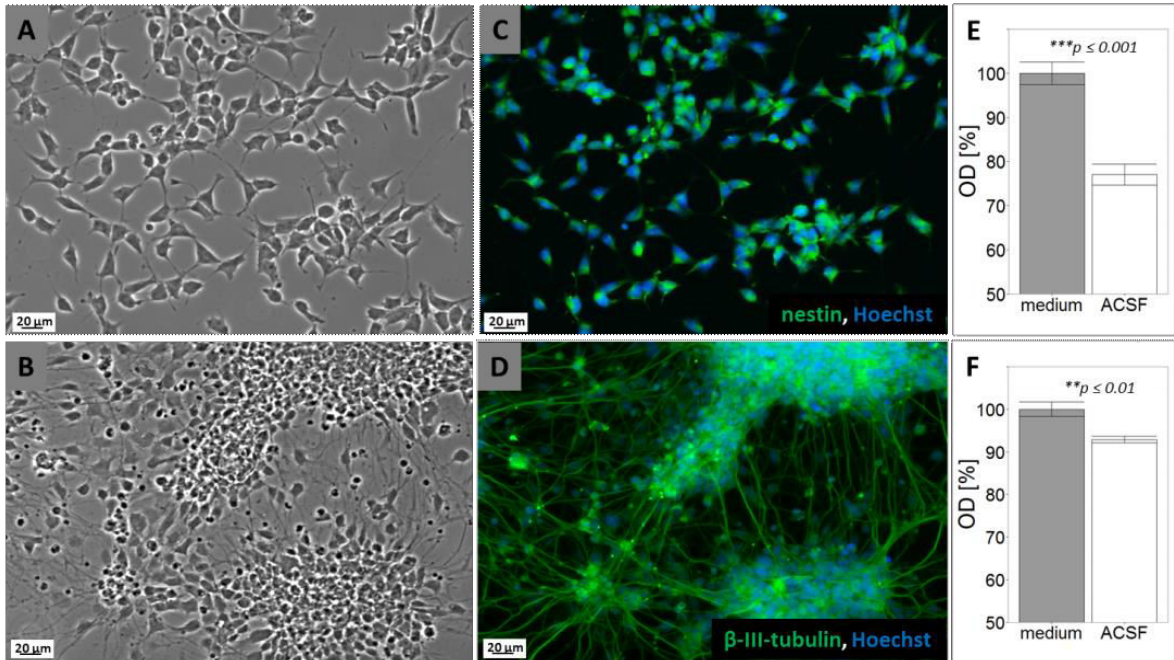
Ahhoz, hogy összehasonlíthassuk az idegi őssejtek és a belőlük differenciált neuronok anyagcseréjét, molekuláris módszerekkel ellenőriztük, hogy az adott populációban megtörtént-e az idegsejt irányú fejlődés. Az NE-4C neuron tenyészetekben megnőtt a proneurális *ngn2* (újabbban *neurog2*) és neurális *math2* (újabbban *neurod6*) gén expressziója, míg az őssejt specifikus *oct4* (újabbban *Pou5f1*) gén expressziója lecsökkent (9. ábra).



9. ábra: Az őssejt specifikus (*oct4*), a proneurális (*ngn2*) és a neurális (*math2*) gének expressziójának változása neurális differenciáció hatására NE-4C őssejteken és belőlük differenciálódott (10 napos) NE-4C neuron tenyészetekben (n=3).

Az idegsejt irányú differenciációt, valamint a tápanyagmentes fenntartás következményeit morfológiai, immunhisztokémiai és életképességet tesztelő (MTT-redukció) módszerekkel is ellenőriztük. Az anyagcsere vizsgálatok alapdataként ACSF-t (mesterséges agy-gerincvelői folyadékot) használtunk, amely nem tartalmazott semmiféle sejtek által hasznosítható tápanyagot. Az előkísérletek során, a 3 és fél órán át tartó tápanyagmentes inkubáció nem okozott morfológiai változást a tenyészetekben (10/A-D. ábra). Az őssejtek 3 óra „éhezés” után is normális epitél

morfológiát mutattak, jól elkülöníthető kontúrral jellemezhetőek voltak (10/A. ábra). A retinsavas (RA) neurális indukció hatására kialakuló, nyúlványos idegsejtek alakjában és immunreaktivitásában sem okozott eltérést az éheztetés (10/B. ábra). Az őssejtek nestin festődést (10/C. ábra, zöld), míg a neuronná differenciálódó sejtek  $\beta$ -III-tubulin (10/D. ábra, zöld) festődést mutattak.



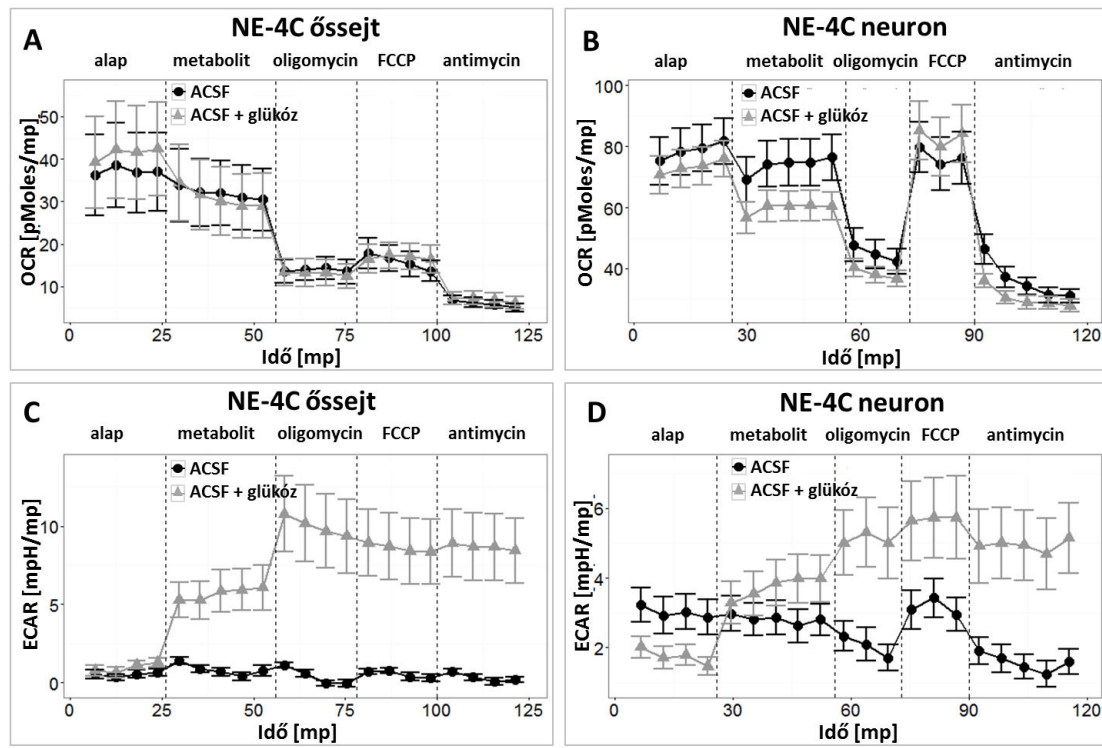
**10. ábra:** NE-4C őssejtek (A, C, E) és a belőlük differenciálódott neuron tenyészetek (B, D, F) fénymikroszkópos (A, B) és fluoreszcens (C, D) mikroszkópos képe 3 és fél órás éhezés után (kék: a sejtmag, zöld: őssejtek (C) esetén nestin és neuronok (D) esetén a  $\beta$ -III-tubulin festődés). Relatív életképesség (MTT reakció) (E, F) normál tápoldatban (100%) (szürke oszlop) és tápanyagmentes ACSF-ben (fehér oszlop) átlag  $\pm$  SEM ( $n \geq 10$ )

Az éhezés után elvégzett MTT-redukciós, életképességi teszt [76] az őssejteknel körülbelül 20-25%-os életképesség csökkenést mutatott, míg a differenciált tenyészeteknél kevesebb mint 10%-ot. Ez alapján az őssejtek túlélnek a tápanyagok néhány órás megvonását, de érzékenyebbek az éhezésre, mint a differenciálódott neuronok.

A sejtek anyagcseréjét a Seahorse Cell Analyser XF96 [47] sejttanyagszere mérőkészülékével mértük. Az NE-4C idegi őssejtek és a belőlük differenciálódott neuronok mellett mértük az

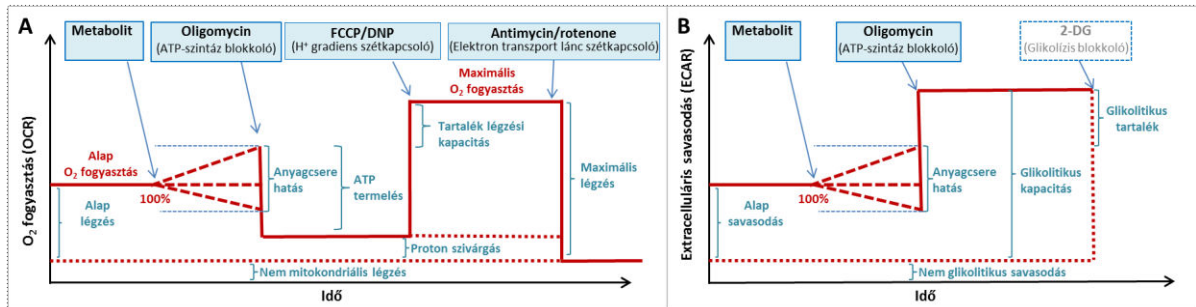
embrionális (E15-16) egér agyból izolált primer neuronális [74] és asztrocita [75] tenyészetek anyagcsere jellemzőit is.

Az anyagcseremérések előtt a tápoldatot lecseréltük ACSF-re. Először ACSF-el mostuk a tenyészeteket, hogy a sejtek környezetéből kihíguljanak a tápanyagok és lehetőséget adtunk arra, hogy a másfél órás inkubáció során a sejtek könnyen mobilizálható tápanyagraktáiraikat elfogyassák. A mérés körülbelül két és fél óráig tartott, miközben az eszköz folyamatosan mérte a sejtek oxigénfogyasztását és az extracelluláris tér savasodását. Az első fél órában felvettünk egy alapvonalat az (éheztető) ACSF-ben, majd egyenként adtuk hozzá az egyes metabolitokat (glükózt, laktátot, piruvátot és  $\beta$ -OH-butirátot) az egyes csoportokhoz, illetve egy csoportot tovább hagyunk éhezni ACSF-ben. (Egy-egy csoport legalább 7 mikrotenyészetet tartalmazott.) A metabolitokkal történt mérés után, mitokondriális funkciót gátló hatóanyagok adásával ellenőriztük a mitokondriális funkció épségét, a sejtek „egészségét” (11. ábra, 12. ábra).



11. ábra: Reprezentatív ábra az NE-4C őssejtek (A, C) és a belőlük differenciálódó neuronok (B, D) abszolút oxigénfogyasztásáról (OCR; A, B) és pH változásáról (ECAR; C, D) a kezdeti éhezés (ACSF) hatására (fekete), glükóz (szürke) hozzáadására, illetve további éheztetés hatására, oligomycin, FCCP és antimycin hozzáadására. Átlag  $\pm$  SEM,  $n \geq 7$

A sejtek az elvártan megfelelően viselkedtek. Az oligomycin gátolta a mitokondriális ATP szintáz működését, így csökkentette az oxigénfogyasztást, az FCCP tönkretette a proton gradienst, ezáltal felpörgette a mitokondriumok oxigénfogyasztását. Az antimycin az elektron transzport lánc III. komplexének gátlásával megszüntette a mitokondriális foszforiláció lehetőségét, ezért az oxigénfogyasztás leesett (12. ábra).



12. ábra: A mitokondriális gátlók hatásának sematikus rajza (A) Oxigénfogyasztás (B) Savasodás (saját ábra)

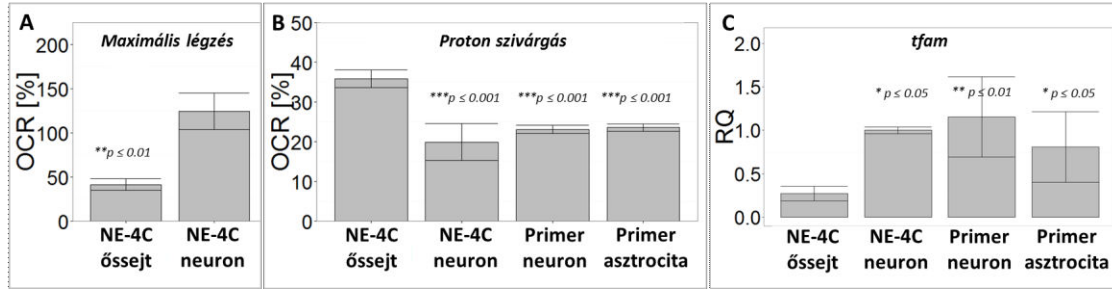
(A) Az alap oxigénfogyasztási ráta (OCR) a hozzáadott metabolit hatására változhat. Oligomycin hozzáadására, amely az ATP szintáz gátolja, az oxigénfogyasztás leesik, mert a protonfogyasztó lépés hiányában a felhalmozódó proton leállítja az elektrontranszportláncot. FCCP hatására, amely egy mozgékony proton transzporter, kiegyenlítődik a proton gradiens, ezáltal az elektrontranszportlánc felpörög és megnő az oxigénfogyasztás. Az antimycin vagy rotenone az elektrontranszportlánc komplexének gátlásával megszünteti a mitokondriális oxigénfogyasztást. A nem mitokondriális oxigénfogyasztást levonva az alap oxigénfogyasztásból megkapjuk az alap légzést, amely az ATP termelésből és a protonszivárgásra bontható fel. A maximális oxigénfogyasztásból levonva a nem mitokondriális légzést pedig megkapjuk a maximális mitokondriális légzést, amely jelzi a tartalék légzési kapacitást.

(B) A külső környezet savasodási rátája (ECAR) a hozzáadott metabolit hatására változhat. Az oligomycin hatására a sejtben az anyagcsere eltolódik a glikolízis felé, a keletkező piruvát pedig laktátként kibocsátva növeli a környezet savasodását. A 2-deoxi-D-glükóz (2-DG) a glikolízist gátolja, ezáltal megszüntetve a glikolízis okozta savasodást, meghatározható a nem glikolitikus savasodás. A maximális savasodásból levonva a nem glikolitikus savasodást megkapjuk a glikolitikus kapacitást, amely a glikolitikus tartalék savasodásból és a glikolitikus alap savasodásból áll.

Az alap oxigénfogyasztás az NE-4C őssejt tenyészetekben volt a legkisebb ( $48,17 \pm 3,02$  pmol/perc/15 000 sejt; n=28), a belőlük differenciálódott neuronok oxigénfogyasztása jelentősen magasabb volt ( $101,49 \pm 10,1$  pmol/perc; n=23), de még így sem érték el a neuron dúsított primer tenyészetben mért oxigénfogyasztást ( $204,67 \pm 9,79$  pmol/perc; n=46). Az asztrociták oxigénfogyasztása ( $113,61 \pm 3,62$  pmol/perc; n=39) a primer neuronokon mért érték alatt maradt, ami megfelel a nagy glikolitikus aktivitásuknak [54].

Habár az abszolút oxigénfogyasztási ráta adatok is mutatták az oxigénfogyasztás növekedését a differenciáció hatására, a különböző tenyészetekben nehezen összevethető sejtszámok miatt, ezek az adatok közvetlen összehasonlításra nem használhatók. Ezért a továbbiakban relatív változásokat vizsgáltunk: minden mikrotenyészetben mért értéket az azonos tenyészet kezdeti, a mérés első 30 perce alatt mért alap oxigénfogyasztásának százalékaként adtuk meg.

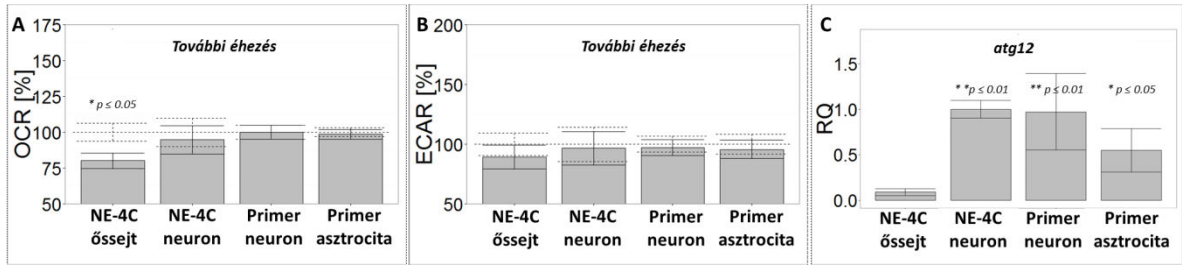
A relatív maximális mitokondriális oxigénfogyasztás (12. ábra) egyértelműen mutatja, hogy a differenciáció hatására szignifikánsan nő mitokondriális aktivitás (13/A. ábra). A maximális mitokondriális oxigénfogyasztás minden egyes mikrotenyészetben külön-külön meghatároztuk az FCCP (mitokondriális proton gradiens szétkapcsoló) értékéből kivonva a nem mitokondriális oxigénfogyasztást (antimycin, mitokondriális légzési lánc III. komplexének gátlása utáni oxigénfogyasztását) [84]. A mitokondriális érést ugyancsak mutatja a differenciálódás hatására csökkenő protonszivárgás (13/B. ábra) [50], [51], [84]. A protonszivárgás az ATP szintáz gátlása (oligomycin) után mért oxigénfogyasztásból levont nem mitokondriális oxigénfogyasztás (antimycin, 12. ábra). Az oxigénfogyasztás adatoknak megfelelően a mitokondriális transzkripció egy kulcs aktivátora, a mitokondriális transzkripciós A faktor (TFAM) [85] génexpressziós szintje is szignifikánsan alacsonyabb volt az NE-4C idegi őssejtben, mint a differenciáltabb sejtekben (13/C. ábra). Ami szintén jelzi a mitokondriális aktivitás növekedését neuronális differenciáció hatására.



13. ábra: Mitokondriális érés differenciáció hatására. (A) Maximális oxigénfogyasztás (mitokondriális proton gradiens szétkapcsolásakor) NE-4C őssejtekben és a belőlük származó neuronokban az alap éhezéshöz (100%) képest, átlag $\pm$ SEM (n $\geq$ 8) (B) Protonszivárgás (mitokondriális ATP szintézis gátlása oligomycinnel majd levonva a nem mitokondriális oxigénfogyasztást antimycin hozzáadása után) NE-4C őssejtekben, a belőlük differenciálódott neuronokban, primer neuronokban és primer asztrocita tenyészetekben az alap éhezéshöz képest, átlag $\pm$ SEM (n $\geq$ 23) (C) A mitokondriális transzkripciós A faktor (TFAM) relatív génexpresszió változása (a HPRT belső kontrollal és az NE-4C neuron (n=1) referenciához viszonyítva), medián  $\pm$  MAD (n=3)

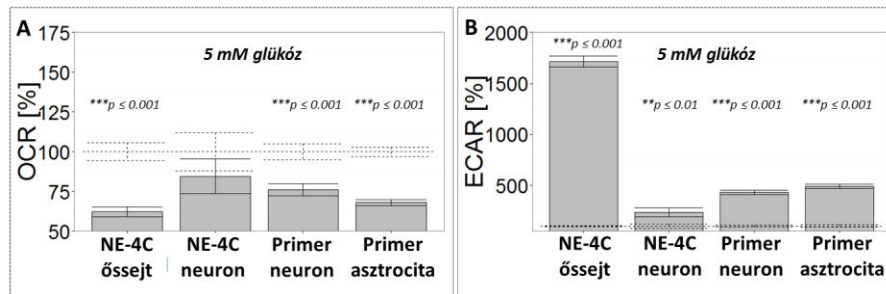
Miután meghatároztuk az alap oxigénfogyasztás rátáját (OCR), amiből az oxidatív foszforiláció mértékére lehet következtetni és a külső környezet savasodási rátáját (ECAR), amely a glikolízis során kibocsátott laktát mennyiségre enged következtetni, különböző metabolitokat adtunk a sejtekhez: 5 mM végkoncentrációjú glükózt, laktátot, piruvátot vagy  $\beta$ -OH-butirátot. Egy csoportnál ugyanazt az metabolitot nem tartalmazó ACSF-et adagoltunk, így ebben az esetben további fél órát éheztek a sejtek.

A tovább éhező NE-4C őssejtek esetén az oxigénfogyasztás csökkent, míg a differenciált sejtek (NE-4C neuron, primer neuron és primer asztrocita) esetén nem változott (14/A. ábra). Az extracelluláris protontermelés, azaz a glikolízis mértéke nem változott (14/B. ábra). Az éheztetett differenciált NE-4C neuronok igen kismértékű életképesség csökkenése (10/F. ábra), a nem változó oxigénfogyasztása és glikolitikus aktivitása arra utal, hogy a differenciált sejtek éhezés során saját anyagaik felhasználásából nyernek energiát. Ezt megerősíti az autofág aktivitást jelző ATG12 gén (ATG12: autophagy-related protein 12) [86] megnövekedett génexpressziója a differenciált sejtekben (NE-4C neuronban, primer neuronban és primer asztrocitában) jelezve, hogy ezekben a sejtekben nagyobb szerepe lehet az autofágiának az anyagcsere fenntartásában éhezéskor (14/C. ábra).



14. ábra: További éhezés hatása (A) Oxigénfogyasztás változás és a (B) külső környezet savasodása a tenyészetekben az alap éhezéshez (100%) képest, átlag $\pm$ SEM (n $\geq$ 23) (C) autofágiához kapcsolódó 12. fehérje génjének (ATG12) relatív génexpresszió változása (a HPRT belső kontrollal és az NE-4C neuron (=1) referenciához viszonyítva), medián  $\pm$  MAD (n=3)

Glükóz hozzáadásra az oxigénfogyasztás lecsökkent és a proton termelés drasztikusan megnőtt minden sejt esetében (15/A-B. ábra). A legnagyobb oxigénfogyasztás csökkenés és savasodás növekedés az NE-4C őssejt esetében volt megfigyelhető, amely arra utal, hogy ezek a sejtek nagymértékben hasznosítják a glükózt aerob glikolízisre.

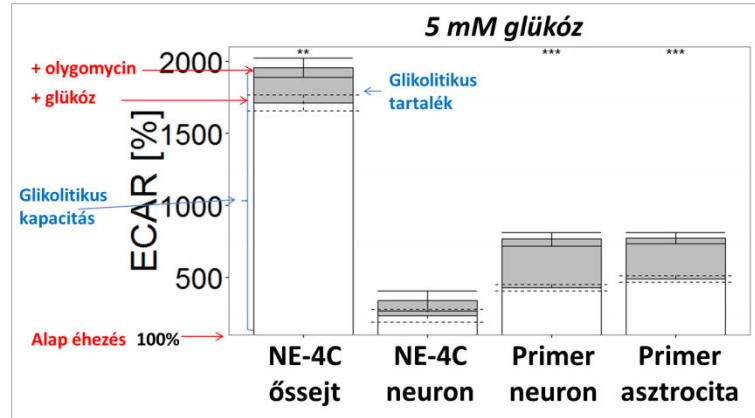


15. ábra: Glükóz hozzáadás hatása (A) Oxigénfogyasztás változás és a (B) külső környezet savasodása a tenyészetekben az alap éhezéshez (100%) képest, átlag $\pm$ SEM (n $\geq$ 23)

A glikolízist alátámasztotta, hogy glükóz hozzáadása megnövekedett környezeti savasodást okozott, amit az oligomycin (ATP szintáz) gátló hatása még tovább növelt.

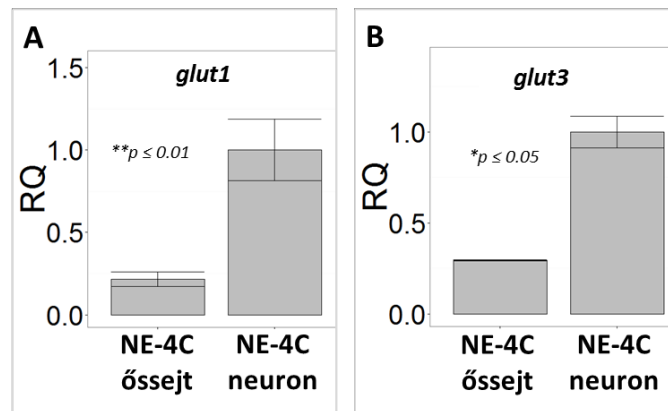
Látszik, hogy a glükóz hozzáadására az őssejtek tudták a legnagyobb mértékben megnövelni a glikolízisüket, vagyis ezek a sejtek rendelkeznek a legnagyobb glikolítikus kapacitással. A differenciáltabb sejtek éhezés utáni glükóz hozzáadás esetén sem tudják ilyen mértékben fokozni glikolítikus aktivitásukat. (16. ábra)





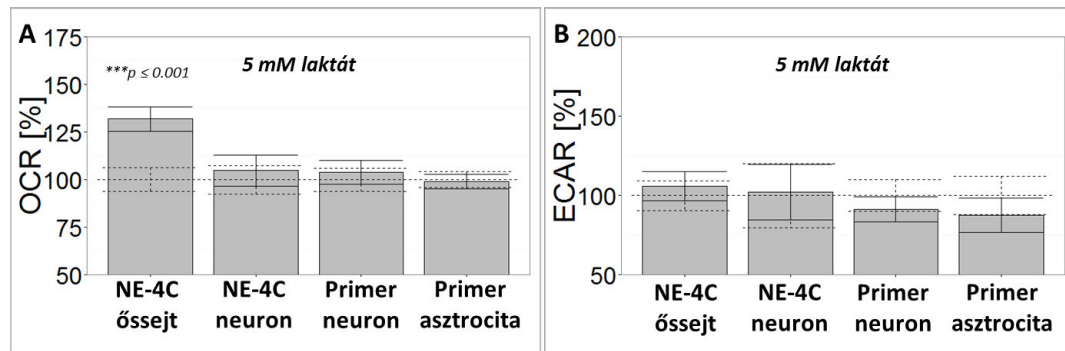
16. ábra: A glikolitikus kapacitás, átlag $\pm$ SEM (n $\geq$ 23)

Az NE-4C neuronokban glükóz adására mérhető kisebb mértékű oxigénfogyasztás visszaesés és savasodás növekedés felveti azt a kérdést, hogy vajon a glükóz mennyire hozzáférhető ezen sejtek számára. Ennek ellenőrzésére az általános glut1 (újabbán Slc2a1) és a neuron specifikus, glut3 (újabbán Slc2a3) glükóz transzporter [60] génexpresszióját vizsgáltuk qPCR-rel. Mindkét transzporter mRNS szintje megnőtt a neuronális differenciáció során (17/A-B ábra). Habár fehérje szinten nem ellenőriztük a transzporterek jelenlétét, a megnövekedett génexpressziója arra utal, hogy az NE-4C neuronok számára a glükóz elérhető.



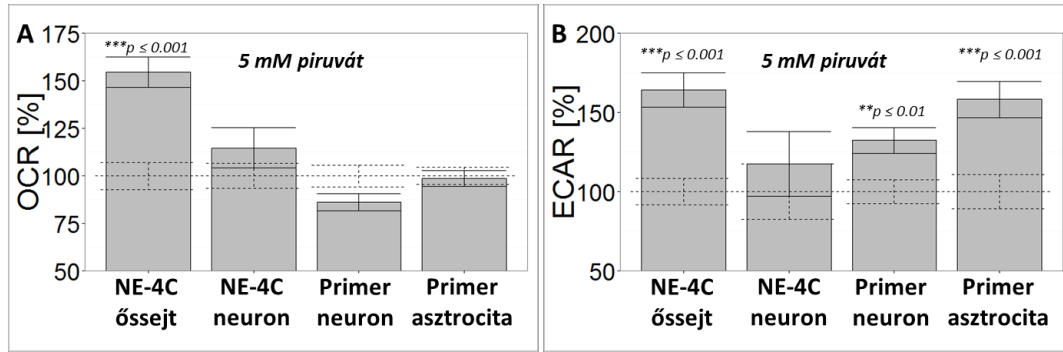
17. ábra: Az általános, glut1 (A) és a neuron specifikus, glut3 (B) glükóz transzporterek génexpressziójának változása a neuronális differenciációval. Relatív génexpresszió változás (a HPRT belső kontrollal és az NE-4C neuron (=1) referenciához viszonyítva), medián  $\pm$  MAD (n=3)

Következő lépésként a glikolízis végtermékeinek (laktát, piruvát) hatását vizsgáltuk az oxigénfogyasztás alakulására (18/A-B. és 19/A-B. ábra). Az NE-4C neuronális őssejtben mindkét metabolit szignifikánsan növelte az oxigénfogyasztást. A várakozással ellentétben a laktát sem az NE-4C eredetű, sem a primer neuronokban nem növelte az oxigénfogyasztást (18/A. ábra).



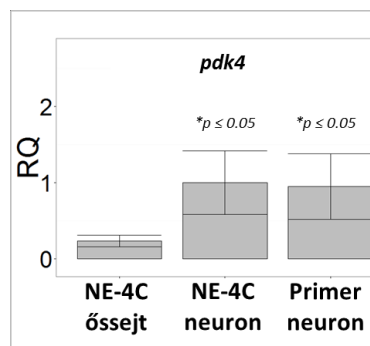
**18. ábra:** Laktát hozzáadás hatása (A) Oxigénfogyasztás változás és a (B) külső környezet savasodása a tenyészetekben az alap éhezéshez (100%) képest, átlag $\pm$ SEM (n $\geq$ 23)

A piruvát (19/A. ábra) jelentős oxigénfogyasztás változást csak az NE-4C őssejtben okozott. Ugyanakkor, szignifikánsan hozzájárult a külső környezet savasodásához (19/B. ábra), valószínűleg a piruvát-dehidrogenáz CO<sub>2</sub> termelésén keresztül. Az NE-4C neuron esetében a piruvát nem növelte az oxigénfogyasztást és külső környezet savasodását sem. A laktát és piruvát membránon át történő transzportjáért – legalábbis glutamáterg idegvégződésekben [87] – felelős MCT2 (újabbán: Slc16a7) transzporter mRNS-ét a neuronális tenyészetekben nem tudtuk kimutatni qPCR módszerrel.



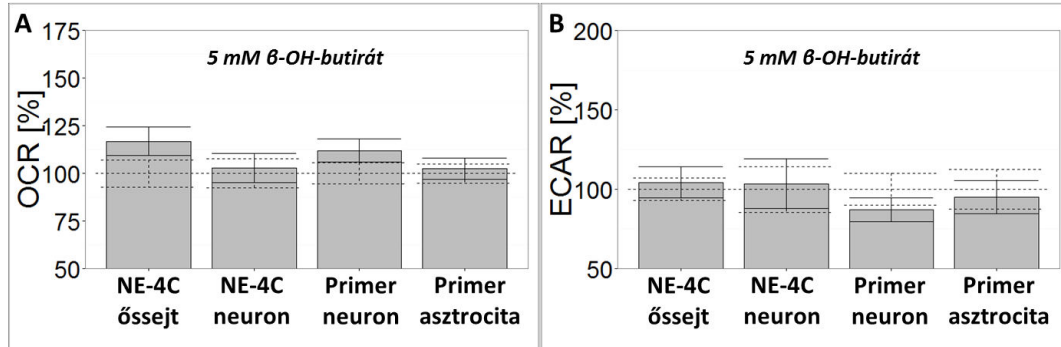
19. ábra: Piruvát hozzáadás hatása (A) Oxigénfogyasztás változás és a (B) külső környezet savasodása a tenyészetekben az alap éhezéshez (100%) képest, átlag±SEM (n≥23)

Miközben az NE-4C őssejtek felhasználják a glikolitikus végtermékeket mitokondriális energiatermelésre, addig a neuronok esetén úgy tűnik, hogy a glükóz – legalábbis éhezés alatt – más útvonalon hasznosul. Piruvát dehidrogenáz komplex (PDC) az a kulcsenzim komplexum, amely a piruvátot a citrátciklusba beviszi és így táplálja a mitokondriális oxidatív foszforilációt [88], [89]. A PDC E1 piruvát dehidrogenáz enzimét (PDH) a piruvát dehidrogenáz kinázok (PDK-k) foszforilációval inaktíválni tudják. (4. ábra) A piruvát dehidrogenáz kinázok közül a PDK4 jelen van a rágsálók agyában [90]. qPCR méréseink alapján a PDK4 expressziója magasabb az NE-4C eredetű és primer neuron tenyészetekben, mint az NE-4C őssejtekben (20. ábra). A megfigyelés azt jelezi, hogy a differenciáció előrehaladtával nő a PDC szabályozottsága, ezáltal csökkenhet a piruvát belépése a citrátciklusba.



20. ábra: A pdk4, piruvát dehidrogenáz kináz 4 génexpressziójának változása a neuronális differenciáció során. Relatív génexpresszió változás (a HPRT belső kontrollal és az NE-4C neuron (=1) referenciához viszonyítva), medián ± MAD (n=3)

Ha nem a glikolízis adja a fő mitokondriális energiatermelő útvonal fő tápmolekuláit az éhező neuronokban, akkor milyen metabolit lehet felelős a magas neuronális oxigénfogyasztásért? Lehetséges tápanyag molekulaként megvizsgáltuk a  $\beta$ -OH-butirát (egy ketontest) hatását. Az NE-4C őssejtek a  $\beta$ -OH-butirátot (21. ábra) felhasználták mitokondriális oxidációra, a differenciáltabb sejtekben azonban ilyen hatását nem tudtuk kimutatni.



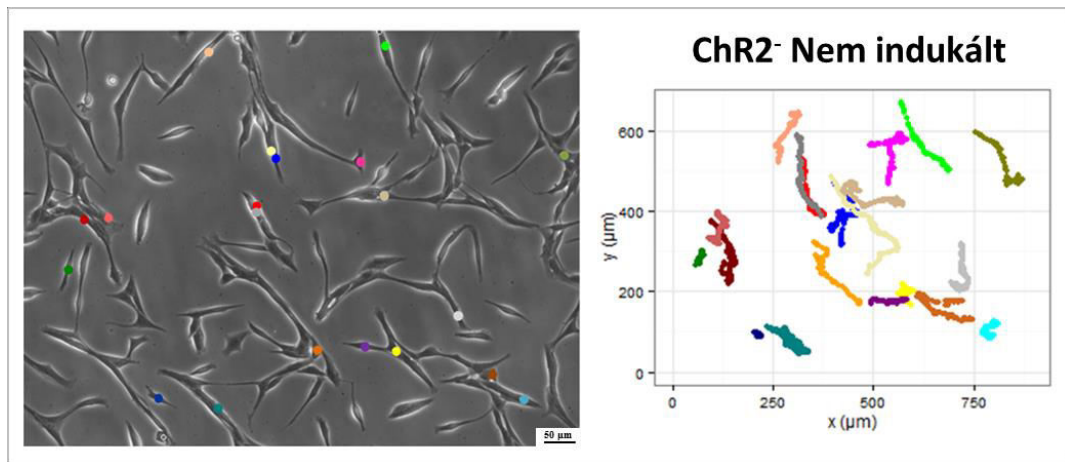
21. ábra:  $\beta$ -OH-butirát hozzáadás hatása (A) Oxigénfogyasztás változás és a (B) külső környezet savasodása a tenyészetekben az alap éhezéshez (100%) képest, átlag $\pm$ SEM (n $\geq$ 23)

Összefoglalva az NE-4C neuronális őssejtek és a belőlük differenciálódó NE-4C neuronok különböző tápanyagokat hasznosítanak az éhezés alatti energianyerésre. Az őssejtek alacsony mitokondriális aktivitással és alacsony oxigén igénnyel rendelkeznek, de sokféle tápanyag (laktát, piruvát,  $\beta$ -OH-butirát) hozzáadásra megnövelik a mitokondriális energiatermelésüket. Az glükózt sem az éhező őssejtek, sem a neuronok és asztrociták nem használják mitokondriális ATP termelésre: a nagymértékű savasodás jelzi, hogy az éhező sejtekben a glükóz a glikolítikus útvonalon hasznosul. Az éhező neuronok saját anyagaik lebontásából nyerik az energiájukat, és sem a glükóz, sem a glikolízis végtermék molekulái (laktát, piruvát), és a  $\beta$ -OH-butirát nem fokozzák az oxidatív foszforilációjukat. További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy milyen metabolit molekulák játszhatnak szerepet az idegsejtek magas szintű mitokondriális aktivitásának biztosításában.

## Az ioneloszlás változásának hatása radiális glia jellegű sejtek mozgására

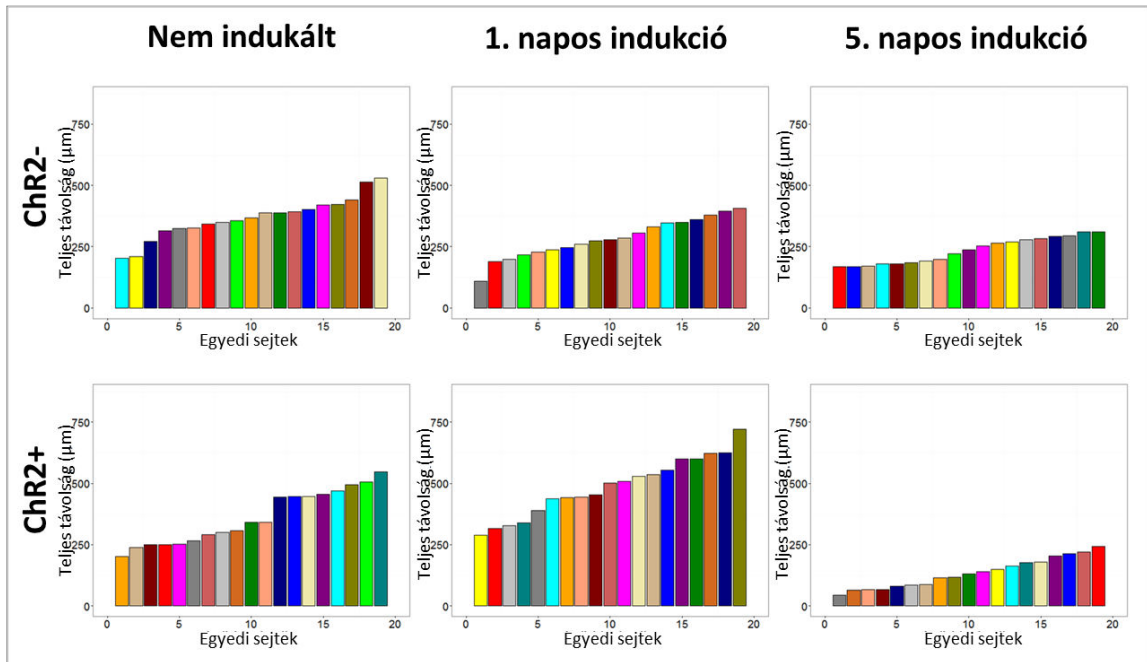
Miután Kőhidi Tímea izolálta és jellemezte a  $B6;129S-Gt(ROSA)26Sor^{tm32(CAG-COP4^*H134R/EYFP)Hze/J}$  egér magzatokból (E 17,5) nyert radiális glia jellegű (RGI) sejteket, megállapíthattuk, hogy a  $ChR2^+$  és  $ChR2^-$  testvér populációk molekuláris biológiai, elektrofiziológiai és immuncitokémiai módszerekkel igazolható eltéréseket nem mutatnak [81], a mozgás vizsgálatok során a  $ChR2^+$  és a  $ChR2^-$  testvér populációkat egymás kontrolljaiként használtuk. Emellett, megvizsgáltuk a  $ChR2^+$  sejtek mozgását megvilágítás nélkül is.

Minden kísérletsorozatban 20-20 nem indukált, illetve 1 és 5 napja indukált,  $ChR2^+$  és  $ChR2^-$  RGI sejt mozgását követtük 12 órán át, az 5 percenként ismételt, 300 ms hosszú  $0,13 \text{ mW/mm}^2$  intenzitású 488 nm hullámhosszú kék fényvel stimulált megvilágítási periódusok végén készült felvételeken. A sejtek elmozdulásait, a trajektóriáit pontdiagramon tettük láthatóvá (22. ábra).



22. ábra: Nem indukált  $ChR2^-$  sejtek, és a 12 óra alatti elmozdulásuk trajektóriái pontdiagramon egy reprezentatív kísérlethől

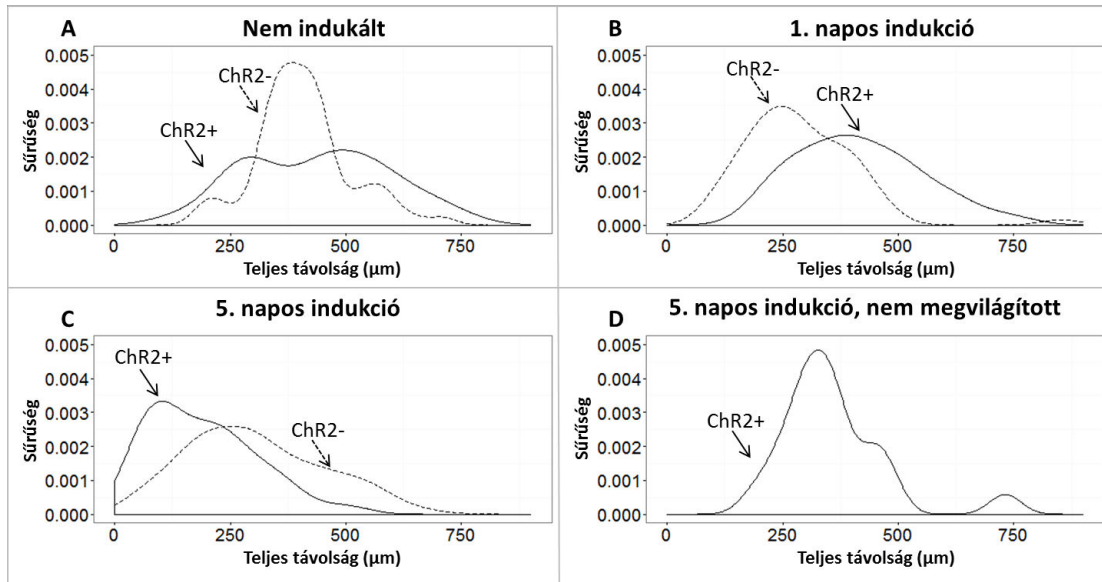
A különböző fejlődési állapotú sejtek elmozdulásainak mértékét minden egyes kísérletben összevettük (23. ábra), majd három egymástól független kísérlet adatait összegezve eloszlás diagramokat készítettünk (24. ábra).



23. ábra: A 12 óra alatt megtett távolság szerint sorba rendezett sejt elmozdulások oszlopdiagramja egy reprezentatív kísérlet sorozatból

Az egyes kísérlet sorozatok ( $n=20$  minden sejtfeleségből) eredményei azt mutatták, hogy a megvilágításra érzéketlen ( $\text{Chr2}^-$ ) sejtek motilitása az indukció előrehaladtával fokozatosan csökken. A fény okozta ioncsatorna megnyitás ( $\text{Chr2}^+$ ) ugyanakkor 1 nappal az indukció megindítása után jelentős motilitás növekedést okozott, 5 nappal az indukció után viszont erőteljesen csökkentette a sejt vándorlást.

Az összes adat elemzése után megállapíthatjuk, hogy a csatornanyitás hatására már az indukálatlan sejtek populációjában is megjelenik egy, a kontroll sejtekhez képest mozgékonyabb sejt populáció (24. ábra A). Az 1 nap alatt elköteleződő sejtek motilitása jelentősen nő (24. ábra B), míg az 5. napra kialakuló neuron előalakok vándorlási aktivitása jelentősen csökken (24. ábra C).



24. ábra: A sejtek (n=60) által megtett úthosszak eloszlása sűrűség függvénnyel ábrázolva fény okozta kation beáramlás hatására a sejtfajlás különböző állapotaiban

Az elemzés azt is megmutatta, hogy a membránban kifejeződő fényérzékeny kation csatorna direkt megvilágítás nélkül is képes csökkenteni a motilitást a neuron előalakok (24. ábra D) egy részében.

Ezeket az eredményeket a Pearson-féle khí-négyzet ( $\chi^2$ ) próbát követő páronkénti ( $\text{ChR2}^-/\text{ChR2}^+$ ) Fisher posthoc tesztek statisztikailag megerősítették (3. táblázat, 4. táblázat).

3. táblázat: A fénystimulált sejtek által megtett távolság kategorizálása és szignifikanciája

Teljes távolság ( $\mu\text{m}$ )	Nem indukált		1 napos indukció		5 napos indukció	
	ChR2 <sup>-</sup>	ChR2 <sup>+</sup>	ChR2 <sup>-</sup>	ChR2 <sup>+</sup>	ChR2 <sup>-</sup>	ChR2 <sup>+</sup>
<200	1	2	13	1	19	34
200-400	30	22	37	28	24	23
>400	29	36	10	31	17	3
Szignifikancia	ns, $p > 0,05$		***, $p < 0,001$		***, $p < 0,001$	

**4. táblázat: A fénytstimulált sejtek által megtett távolság szignifikanciája az indukció előrehaladtával**

		Szignifikancia
ChR2 <sup>-</sup>	0. ↔ 1. nap	***, p<0,001
	0. ↔ 5. nap	***, p<0,001
	1. ↔ 5. nap	ns, p>0,05
ChR2 <sup>+</sup>	0. ↔ 1. nap	ns, p>0,05
	0. ↔ 5. nap	***, p<0,001
	1. ↔ 5. nap	***, p<0,001

Adataink jelzik, hogy a fejlődő progenitor sejtek vándorlását, majd az érő idegsejt előalakok letelepedését jelentősen befolyásolja az inward kation áramok okozta intracelluláris ioneltolódás.



## Megbeszélés

Munkám során az őssejt populáció fejlődéssel is változó élettani/fejlődésbiológiai szükségleteivel kapcsolatos kérdésekre kerestem a választ:

- I) Hogyan változik meg az alapvető sejtanyagcsere a neuronális differenciáció hatására, illetve az anyagcserét tápláló molekulák jelenléte milyen módon befolyásolja a sejtanyagcserét a fejlődés különböző állapotában lévő sejtekben?
- II) Hogyan befolyásolja az ionos stimulálás a fejlődő idegi ős/progenitor sejtek vándorlását, letelepedését?

A vizsgálatokat NE-4C embrionális neuroektodermális és magzati radiális glia jellegű (RGI) sejtek sejttenyészetein végeztem.

## Az anyagcsere változás

Az embrionális neuroektoderma eredetű NE-4C [65] sejteken biokémiai mérésekkel vizsgáltam, hogy a korábban leírt [11], [13], [41], [50], [51] nagy különbség az őssejtek és a neuronok oxigén igénye között magyarázható-e a tápanyag hasznosítás automatikus megváltozásával az idegi sejt differenciáció során. Az NE-4C sejtek *in vitro* neuron képzése jó modellnek bizonyult, mert az őssejtek és a belőlük differenciálódó, azonos genetikai állományú neuronok anyagcsere folyamatainak közvetlen összehasonlítására nyújtott lehetőséget.

Az anyagcsere vizsgálatok azt mutatták, hogy az NE-4C őssejtekből fejlődő neuronok hasonló anyagcsere tulajdonságokkal rendelkeznek, mint az embrionális eger agyból izolált primer neuronok. Embrionális (E15-16) előagyból származó neuronok és NE-4C neuronok számos közös szerkezeti, citokémiai és funkcionális hasonlóságot mutatnak. Mindkét esetben a neuronok hosszú elágazó nyúlványokkal, MAP2 és  $\beta$ -III-tubulin, synaptophysin és synapsin immunreaktivitással rendelkeznek. Az NE-4C kultúrákban a neuronális indukciótól számított 7. napon az összes sejt 40-50%-a mutat idegsejt sajátosságokat. Köztük GABAerg és glutamáterg neuronokat találunk, de monoaminerg sejtek nem alakulnak ki. Mind az NE-4C eredetű, mind a primer neuron tenyészetek tartalmaznak egy nem neuronális aljzat sejtréteget, az idegsejtek ezen aljzat réteg tetején fejlődnek [65], [74]. Ez az alapréteg a primer neuronok esetén GFAP (glial fibrillary acidic protein) pozitív

asztrocita sejtekből áll, míg az NE-4C sejtek alatt GFAP negatív sejtek találhatóak, és csak a differenciáció 10. napjától jelennek meg a GFAP pozitív asztrocita sejtek [72]. Végül, mindkét tenyészetben jelen vannak különböző elkötelezettségű, nem végdifferenciált ősz/progenitor sejtek. Ezek aránya az indukált NE-4C tenyészetekben nagyobb, mint a primer neuron preparátumokban. Az NE-4C kultúrákban a neuronális indukciótól számított 7. napon a neuronális markerekkel azonosítható sejtekben kiválthatók idegi csúcspotenciál sorozatok [67].

Azokban ennek a modellnek is van néhány hátránya:

- 1.) Az NE-4C neurális őssejt vonal p53 deficiens egér embriókból (E 9) származik [65], és valószínűleg a p53 hiánya tette „halhatatlanná”, azaz végtelenül növeszthetővé. A p53 hiányos egér azonban normálisan fejlődik és magasabb tumor előfordulás is csak az öregebb egerekben fordul elő [28]. A p53 tumor szupresszor gén azon túl, hogy szabályozza a sejtciklust, a DNS hibajavítását és az apoptózist [91], kölcsönhat azzal a molekuláris hálózattal, amely érzékeli és szabályozza a sejt energiatermelését [92]. A p53 csökkenti a glikolízist és növeli az oxidatív foszforiláció mértékét, szabályozza a pentóz foszfát útvonalat, serkenti a zsírsav szintézist és zsírsav lebontást is. Védi a sejteket hipoxia esetén (HIF1a expressziót fokozza), serkenti a DNS javítást, nem javítható károsodások esetén stimulálja az apoptózist. Az autofágia aktiválásával segít eltávolítani az előregedett vagy nem működő sejtalkotókat. A p53 anyagcsere szabályzó hatásainak megítélésére vad típusú, primer neuron és primer asztrocita tenyészeteket is alkalmaztunk az anyagcseremérésekben. Az NE-4C neuronok és a primer neuronok hasonlóan viselkedtek az anyagcsere vizsgálataink során éhezésnél és az egyes metabolitok hozzáadásakor is. Az adataink alapján az idegsejtek reakciói jelentősen különböznek az őssejtektől a p53 hiánya, illetve jelenléte esetén is. Mindezek alapján azt mondhatjuk, hogy a detektált változások az idegsejtté érés következményei.
- 2.) Miközben az NE-4C őssejtek fenotípusosan azonos sejtekből állnak, a retinsavval indukált tenyészetek mindig tartalmaznak megmaradó őssejteket és a neuronális differenciáció különböző fokán álló progenitorokat. Ez a heterogenitás megmutatkozott a mérési eredmények nagy szóródásában. Ilyen fajta heterogenitást számba kell venni a primer neuronális tenyészetek esetében is: a primer neuronok, még neuron dúsítás esetén is mindig tartalmaznak glia sejteket, és elkötelezetlen progenitor sejteket. Ezt a celluláris heterogenitást nem szabad figyelmen kívül hagyni, ha tenyésztett neuronok anyagcsere jellemzőit vizsgáljuk.
- 3.) Ahhoz, hogy az egyes tápmolekulák hasznosítását (hozzáadásukra történő anyagcsere változást) mérhessük, a sejteket tápmolekulákat nem tartalmazó oldatban kellett tartanunk. Ez

az „éhező” állapot szolgált alapvonalul a tápmolekulák hatásának méréséhez. A levont következtetések tehát az átmeneti éheztetett állapot után adott reakciókat vehetik figyelembe. Az éheztetés minden sejttípusnál azonos időtartamú volt, és sejtkárosító hatásait mértük.

A sejtes heterogenitás és éheztetés ellenére, az adatok egyértelműen bizonyították, hogy az idegi őssejtek és a belőlük fejlődő idegsejtek anyagcsere sajátosságai jelentősen különböznek. Más laboratóriumok eredményeivel [11], [41], [50], [51] megegyezően, az NE-4C őssejtek is kevesebb oxigént fogyasztanak és kevesebb mitokondriális ATP-t termelnek, mint a neuronok. Az NE-4C őssejthez képest a belőle differenciálódott NE-4C neuron maximális mitokondriális légzése szignifikánsan magasabb, és a protonszivárgás (a nem mitokondriális ATP szintézisre fordítódó, szivárgó protonok mennyisége) jelentősen alacsonyabb, ezáltal az anyagcsere hatásfoka jobb. Ez nem meglepő, hiszen korábban kimutatta a laboratóriumunk, hogy differenciációval többek között a TSPO18 fehérje is változik, amely a mitokondriális permeabilitás pórusához kapcsolódik [53]. Bár jelen van a korai neuron progenitorokban, a belőlük fejlődő idegsejtekben már nem lehet kimutatni [52]. A mitokondriális transzkripció A faktor mennyiségének növekedése is alátámasztja, hogy az idegsejt fejlődés során a mitokondriumok változnak, a differenciáció során nő a mitokondriális aktivitás és az oxigénfogyasztás.

Mi is megerősítettük, hogy az NE-4C őssejtek elsősorban glikolízisből nyernek energiát. A két és fél órás éhezés alatt mutatott életképesség csökkenés azonban jelezte, hogy az őssejtek energiatermelő (glikolitikus) folyamatait külső tápanyag molekulák táplálják. Hozzáadott tápmolekulák széles skálája ( $\beta$ -OH-butirát, laktát, piruvát) megnöveli az oxigénfogyasztásukat és a mitokondriális ATP termelésüket, ezáltal jelezve a gyors anyagcsere alkalmazkodó képességüket az elérhető forrásokhoz. Ezzel szemben az NE-4C és primer neuronok és asztrociták kevésbé reagálnak az éhezésre, és külső tápanyagforrások nélkül is fenntartják a magas oxidatív foszforilációjukat. Ez azt mutatja, hogy a differenciált sejtek belső molekuláik felhasználásával egy ideig fenn tudják tartani az energia állapotukat. A belső anyagok energiatermelésre való „feláldozását” támasztja alá az autofágiához kapcsolódó (*atg12*) gén magasabb expressziója is.

Glükóz hozzáadására minden sejttípusban csökkent az oxigénfogyasztás és a mitokondriális ATP termelés, az éhező sejtekben glükóz hatására aerob glikolízis indul. Ezt mutatja a környezet nagymértékű savasodása, amely elsősorban a sejtek laktát (glikolízis végtermék) termelése okozott. Az NE-4C őssejteknél volt a legnagyobb mértékű a savasodás, míg kisebb mértékű, de szignifikáns, savasodás a differenciált sejteknél is megfigyelhető volt. Ez jelzi, hogy az őssejtek a

többlet glükóz hatására jobban fel tudják pörgetni a glikolízisüket, mint a többi sejtípus. Ez összhangban van a magas aerob glikolízissel osztódó sejtek esetén.

Meglepő módon az éhező neuronok nem reagálnak jelentős oxigénfogyasztás növekedéssel laktát és piruvát hozzáadására. A megfigyelés azt mutatja, hogy ezek a glikolitikus végtermékek nem terelődnek a citrátciklus útvonalra és nem használódnak fel mitokondriális ATP termelésre. Ezek az adatok látszólag ellentmondanak az asztrocita neuron laktát útvonalnak (ANLS: astrocyte-neuron lactate shuttle”) [54]. Az ANLS útvonalat elsősorban az aktív szinapszisok asztrocita által támogatott anyagcseréjében tartják fontosnak. A monokarboxil sav transzporterek (MCT: monocarboxylic acid transporters) felelősek a membránon keresztüli laktát és piruvát transzportjáért. Az MCT-k eloszlása sejtípus specifikus: az asztrociták sejtmembránjában mindenütt jelen van az MCT4-et (újabbán: Slc16a3); a neuronokban nagy affinitású, de kis kapacitású MCT2 (újabbán: Slc16a7) transzporter a teljesen differenciálódott glutamáterg neuronok posztszinapszisain fordul elő [87]. Nem meglepő, hogy a *mct2* génexpressziót nem tudtunk kimutatni sem az embrionális (*in vitro* 11-13 napos) primer neuronális tenyészetben, sem pedig az NE-4C őssejtből differenciáltatott neuronokban. A primer és NE-4C eredetű idegsejtek tenyészetében a glutamáterg neuronok előfordulása és szinapszis gyakoriság is sokkal alacsonyabb, mint az *in vivo* szövetben, így az *in vitro* mért adatok leginkább a gyakoribb GABAerg ideg sejttestek anyagcsere folyamatait mutatják. Az éhező, „alul-aktivált” és agyszövethez képest más fenotípus eloszlású neuronokon mért adataink nem cáfolják a ma többé kevésbé elfogadott laktát sönt elméletet, de mindenképpen felhívják a figyelmet annak korlátaira [93].

Az idegi őssejtek azonban energiát tudnak nyerni mind a laktátból mind a piruvátból. Így valószínűleg expresszálják az MTC1-et (újabbán: Slc16a1) és/vagy MTC4-et, hasonlóan számos daganat őssejthez [94].

A neuronok glükóz adására jelentkező aerob glikolízise, azaz az a tény, hogy a glikolízis végtermék piruvát nem lép be a mitokondriális oxidációba, fontos kérdéseket vetett fel.

- i) Ismert, hogy a piruvát dehidrogenáz kináz 4 (PDK4) enzim képes foszforilációval gátolni a piruvát dehidrogenáz komplex (PDC) működését, azaz a piruvát belépését a citrátciklusba [45]. A PDK4 expressziója nő éhezés hatására [90]. A piruvát dehidrogenáz kinázok fontos szabályozói a glükóz lebontó folyamatainak [95]. Kvantitatív PCR vizsgálataink azt mutatták, hogy a *pdk4* gén magas szinten átíródik mind a primer, mind az NE-4C neuronokban, ugyanakkor az mRNS szintje igen alacsony volt az NE-4C őssejtekben. A

megnövekedett PDK mRNS szint még nem bizonyítja szükségszerűen a piruvát dehidrogenáz komplex (PDC) gátlását az idegsejtekben. Ehhez ismernünk kéne a PDK4 fehérjeszintű kifejeződést és mérnünk kéne a PDC enzimkomplexum aktivitási szintjét. Az adatok alapján azonban feltételezhetjük, hogy a megnövekedett PDK4 expresszió eredményezheti a glikolízis és a citrátciklus szétkapcsolódását és felelős lehet a megnövekedett aerob glikolízisért.

- ii) Ha a glükózból az idegsejtek nem nyerik ki a mitokondriális oxidáció révén elérhető energiamennyiséget, miért létfontosságú a neuronok számára a glükóz? A glükóz pentóz foszfát cikluson át történő felhasználása minden sejtben működő anyagcsere útvonal. A pentóz foszfát útvonal (4. ábra) szolgáltathat nukleotidokat a DNS szintetizáló/javító mechanizmusok számára, és a megnövekedett NADPH termelés révén redukciós kapacitást biztosít a sejtet felépítő vagy szekretált makromolekulák szintéziséhez, valamint a sejt oxidatív stresszel szembeni védekezéséhez [61]. Mindhárom mechanizmus fontos szerepet játszhat a hosszú élettartamú idegsejtekben. A nukleotid felhasználás a posztmitotikus idegsejtekben elsősorban a folyamatosan zajló DNS javításokat, és az állandó fehérje szükséglet kielégítéséhez az aktív mRNS szintézist szolgálja. A makromolekula szintézishez szükséges reduktív kapacitás nélkül elképzelhetetlen a neuronokra jellemző magas fehérje szintetikus aktivitás. A neuronokban zajló igen intenzív mitokondriális oxidáció jelentős mennyiségű reaktív oxigéngyököt termel. Ezek károsító hatásainak kivédését a glutation redukción át a citoplazmatikus NADPH+ biztosítja [45]. Ez utóbbi mechanizmus segítheti a neuronok túlélését extrém hosszú élettartalmuk alatt. Ezt az elméletet támasztja alá az is, hogy a differenciálódott idegi őssejt védettebb a szabad gyökök ellen [50]. A pentóz foszfát útvonal fontosságát jelzi az is, hogy az útvonal gátlása idegsejtekben apoptózishoz vezet [55].

Az eredmények azonban nem adtak választ arra a kérdésre, hogy milyen tápmolekula szolgálja a neuronok energiatermelését. Ismert, hogy a lipid oxidáció, a ketontestek felhasználása és a telítetlen zsírsavak szerepet játszanak a neuronális működésben [62]. A ketontestek és szabad zsírsavak szerepe egyelőre vitatott [96] a neuronok energiatermelésében. Kísérleteinkben a hozzáadott  $\beta$ -OH-butirát hatására sem az NE-4C eredetű, sem a primer neuronok nem mutattak azonnali mérhető oxigénfogyasztás változást. További vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy megtaláljuk a neuron számára az(oka)t metabolito(ka)t, amely(ek) éhezés vagy egyéb stressz helyzetekben a fenntartott mitokondriális foszforilációt táplálni képesek.

## A stimuláció okozta motilitás változása

Fényérzékeny ioncsatornák nem invazív megnyitása befelé irányuló kation áramot okoz a sejtmembránon át, és ezzel a depolarizálja a sejteket [30]. A fejlődő agyban az őssejtek, a progenitorok és a neuron előakok folyamatos ion stimulációnak vannak kitéve a feszültség és a ligand függő ioncsatornáton keresztül. A nagy depolarizáló hullámok (GDP) a nyúlvány növekedést, szinapszis képzést és az idegek együtt huzalozódását segítik, és a fejlődő idegszövetben meghatározott fókusz pontokból indulnak. Ezek a nagy amplitúdójú, kis frekvenciájú (percenként körülbelül 0,1) és hosszú időtartamú (100-1000 ms) stimulusok a fejlődő idegszövetben elsősorban intracelluláris  $Ca^{2+}$  választ és GABA kibocsájtást váltanak ki [23]. Ezért olyan hosszú időtartamú, ritkán ismétlődő, ion eltolódást kiváltó stimulus mintázatot kerestünk, amely legalább bizonyos paramétereiben imitálja a fejlődő sejtek környezetében gyakran előforduló depolarizáló hatásokat. A kis frekvenciát 5 percenkénti ismétléssel, a hosszú impulzus időtartamot pedig 300 ms-os fényingerléssel értük el, amellyel 100-250 pA-es befelé áramló (inward) kation áramot lehetett kiváltani. Az előkísérletek során a 300 ms hosszú 0,13 mW/mm<sup>2</sup> intenzitású kék lézer fény impulzusok kiváltottak megfigyelhető változást, ugyanakkor nem okoztak 12 óra alatt sem jelentősebb sejtpusztulást [81].

Az optogenetikus modellel azt vizsgáltuk, hogy a vándorló idegsejt progenitorok és a letelepedő idegsejt előalakok mozgékonyága hogyan változik az ismételt csatornanyitások hatására. Miután a depolarizáció okozta vándorlás változás elsősorban a másodlagos germinatív zónából származó progenitor sejteket érinti a normál idegszövet képződés során, a vizsgálatokban az NE-4C korai embrionális eredetű őssejtek helyett, a magzati és felnőtt agyból egyaránt izolálható radiális glia jellegű (RGl) ős/progenitor sejteket [3] használtunk. Az RGl sejteket a laboratóriumban kidolgozott eljárással [66] munkatársam, Kőhidi Tímea izolálta fényérzékeny kation csatornát kifejezni tudó transzgenikus egér magzatokból. Megállapíthattuk, hogy a  $ChR2^{+}$  és  $ChR2^{-}$  testvér populációk molekuláris biológiai és immunitokémiai módszerekkel igazolható eltéréseket nem mutatnak és elektrofiziológiai mérések alapján a  $ChR2$  csatornák megvilágítás hatására kation ionokat jutattak a sejtekbe [81]. Az élő sejtekről megvilágítás mellett vagy anélkül készült time-lapse video mikroszkópos felvételek elemzése és értékelése volt az én feladatomban.

A sejt mozgás válaszok elemzésénél több paramétert [97] vettünk figyelembe, de végül elsősorban a teljes megtett távolságot használtuk adatként. A teljes megtett távolságot elosztva az idővel megkaptuk a sebességet, ami hasonló eloszlást mutatott. Az átlagos elmozdulás is hasonló képet

mutatott. Megvizsgáltuk a nettó elmozdulást a kezdő és végpont között is, de ez nem adott kellő információt, mivel a sejtek nem egyenes vonalú mozgást végeztek. Egy a kutatócsoport által [98] korábban használt, a sejtmobilitás irányítottságát elemző, átlagos négyzetes elmozdulás függvény elemzés módszere, ezeknél az egymáson elcsúszó sejteknél nem volt értelmezhető. A mi esetünkben a sejtmagvándorlás és a sejtvándorlás elkülönítése volt a fontos. Az RGI sejtek megnyúlt alakja arra kényszerített minket, hogy sejtek középpontját a legmagasabb és a legszélesebb részével azonosítsuk, ami szükségszerűen a sejtmag helyzetének feleltethető meg (ezt megerősítette egyébként a Hoechst festődés is). A sejten belüli sejtmagvándorlás egy jól ismert jelenség [17], [18], ami értelemszerű a vándorló sejteknél, de a megnyúlt sejteknél nem feltétlenül jelent tényleges elmozdulást [99]. Mivel a radiális glia jellegű sejtekre jellemző a sejtmagvándorlás [100], és mi a sejtmag által kidudorított sejt közép elmozdulását vizsgáltuk, el kellett különítenünk az intracelluláris sejtmagvándorlást a sejt vándorlástól. Ezért önkényesen azt fogadtuk el vándorló sejteknél, amelynek a sejtmagja 12 óra alatt a sejt leghosszabb átmérőjénél legalább kétszer nagyobb távolságot tett meg. Mivel az átlagos sejt leghosszabb mérete nem haladja meg a 100  $\mu\text{m}$ -ert, ezért választottuk a 200  $\mu\text{m}$ -es határt.

Az adatok bizonyították, hogy az ionos stimulálás az indukálatlan RGI progenitor sejtek motilitását jelentősen nem befolyásolta. Az egy napos indukció hatására kialakuló elkötelezett progenitor sejtek megnyújt alakot vesznek fel, finom nyúlvány rendszer nélkül és kötegszerűen rendeződnek el egymás mellett. Már expresszálnak proneurális géneket (például *ngn2* és *mash1*), de nem mutatnak neuron jellemzőket [66]. A már elkötelezett progenitor sejtek stimulációja szignifikáns motilitás növekedést eredményezett. Az indukció ötödik napjára a sejtekben megjelennek az idegsejt jellemzők, azonban ez még nem a teljesen érett idegsejt állapot, csak az idegsejt előalak állapot. Ebben a fejlődési szakaszban a sejtek vándorlási aktivitás csökken, az ionos stimulációtól függetlenül is. Az idegsejt előalakok migrációs aktivitása, ugyanakkor, a megvilágítás hatására jelentősen tovább csökkent.

Annak igazolására, hogy a motilitás változást a fény által kinyitott kation csatornákon át beáramló ionok, és nem valamilyen genetikai módosulás (Cre expresszió) által kiváltott hatás okozta, igen nehéz lenne megfelelő „mock” kontrollt találni. Olyan YFP konstrukcióra lenne szükség, amely a sejtmembránban expresszálnodik, a membrán komponensek működését nem befolyásolja, emellett expressziós mértéke összevethető a ChR2-eYFP konstrukcióéval. A génexpresszió által okozott közvetlen hatást azzal tudtuk kizárni, hogy egyrészt, a ChR2<sup>+</sup> és ChR2<sup>-</sup> sejtek egyes tenyészeiben a ChR2<sup>+</sup> és ChR2<sup>-</sup> sejtek hasonló neuronális differenciációt mutattak, másrészt az indukálatlan sejtek motilitásában szignifikáns eltérést nem találtunk [81]. Legjobb kontrollként,

összehasonlítottuk a ChR2-t expresszálo sejtek motilitását megvilágítás mellett és anélkül. A ChR2-expresszálo megvilágított és nem megvilágított sejtek mozgása kis mértékben, de szignifikánsan különbözött. A viszonylag kis különbség annak tudható be, hogy nem lehetett teljesen fénymentes környezetet létrehozni (például kizárni a szórt fényt) és habár a nem megvilágított sejteknél kihagytuk a 488 nm-es megvilágítást, ezekről a sejtekről is ismételt készületek fénymikroszkópos felvételek, ami valamilyen szinten aktiválta a csatornákat.

Az *in vitro* adatok alapján feltételezhetjük, hogy a fejlődés progenitor szakaszában zajló sejt-vándorlást fokozhatják a migráló sejtek környezetében ható bioelektromos szignálok. A neuroná alakulás következő lépésénél, a fejlődő idegsejt előalakok letelepedésénél azonban a stimuláció a sejtek mozgékonyságának csökkenését okozta. Ismert, hogy *in vivo* az idegsejt előalakok letelepednek a szöveti helyükön, és csak vándorlás beszüntetése után kis késéssel növesztenek neuronális nyúlványokat: az érett neuron már nem vándorol. Ez utóbbi jelenség azt mutatja, hogy az előalakok fejlődésének letelepedési folyamatait a stimulációval siettetni lehet: az ioneltolódás, feltételezéseink szerint az idegsejt érés folyamait serkenti.

Adataink tovább hangsúlyozzák a környezeti feltételek fontosságát az ősz/progenitor sejtekből történő idegsejtképzés folyamataiban. Ezeket a feltételeket mindenféleképpen érdemes figyelembe venni a jövőben várható idegsejtpótlás és szövetépítő technikai protokollok elkészítésénél.



## Összefoglalás

Bár idegsejtek képzésére alkalmas idegi ősz/progenitor sejtek a teljes élettartam alatt jelen vannak az agyban, és sokféle módszerrel *in vitro* is előállíthatók idegsejtekkel alakuló ősz/progenitor sejtek, a sérülések vagy neurodegeneratív betegségek során elpusztult idegsejtek pótlása ma még nem megoldható. A természetes vagy mesterségesen létrehozott idegi őssejtek klinikai alkalmazásához az idegi mikrokörnyezet megismerése és az idegi őssejtek tanulmányozása nyújt segítséget. Az idegszövet kialakulása során az őssejtek egészen más környezetben fejlődnek, mint ami a kifejlett idegrendszerre jellemző. Mára egyértelművé vált, hogy az idegi őssejtek neuronná alakulásához és idegi hálózatokba való integrációjához felnőttől eltérő extracelluláris mátrix összetevőkre, növekedési faktorokra, ingerintázatra, oxigén és energia ellátottságra van szükség. Ugyanakkor, az idegi őssejtek speciális anyagcsereigényeiről és a környezetükben ható bioelektromos ingerekre adott válaszaikról még nagyon hiányos a tudásunk.

Kutatásom során a kutatócsoport által korábban izolált embrionális egér NE-4C idegi őssejtek és a belőlük differenciálódó idegsejtek egyes anyagcsere sajátosságait hasonlítottam össze az oxigénfogyasztás és a sejteken kívüli környezet savasodásának műszeres mérésével és az alapanyagcserében fontos enzimek expressziójának elemzésével.

Az anyagcsere vizsgálatok során nyert eredmények megerősítették, hogy az idegi őssejt differenciáció során megnő az oxidatív foszforiláció szerepe a sejtek energiatermelésében. Az őssejtek gyors alkalmazkodó képességüknek köszönhetően, rövid éheztetés után, minden kívülről adott metabolitot (laktátot, piruvátot és  $\beta$ -hidroxibutirátot) képesek oxidatív energiatermelésre hasznosítani. Az idegsejtek, ezzel szemben, éhező állapotban is fenntartják magas oxidatív foszforilációs aktivitásukat: éhezés során saját anyagaik oxidatív lebontásából nyerik az energiát. Az éhező sejtekhez adott glükóz mind az őssejtek, mind az idegsejtek esetén aerob glikolízis révén hasznosul. Nem várt eredményként, az idegsejtek sem laktátot sem piruvátot nem hasznosítottak mitokondriális energiatermelésük fokozására. Az adatok szerint, a neuronok számára létfontosságú glükóz – legalábbis tenyészetben fenntartott, éhező idegsejtekben – nem az energiatermelés útvonalán hasznosul. A lehetséges hasznosítási útvonalakat és az idegsejtek energiatermelését fokozó tápmolekulák természetét a Megbeszélés fejezetben tárgyalom. A glükóz valószínűleg a pentóz foszfát útvonalon hasznosul, amely így nukleotidokat szolgáltat a DNS szintetizáló/javító mechanizmusok számára, és a megnövekedett NADPH termelés révén a

sejtet felépítő vagy szekretált makromolekulák szintéziséhez és a sejt oxidatív stresszel szembeni védekezéséhez az idegsejtek hosszú élettartalma alatt.

A kutatócsoportban channelrhodopsin fényel nyitható kation csatornát hordozó egér magzatokból izolált radiális glia jellegű idegi ősz/progenitor sejteken és az ezekből fejlődő idegsejt előalakokon elemeztem a sejtmozgás változásait ionos stimuláció hatására.

A fényérzékeny ioncsatornákat kifejező és „vad típusú” magzati radiális glia jellegű sejtek mozgásváltozásait élősejtes time-lapse felvételeken elemeztem. Számítások és statisztikai analízis alapján az ionos stimuláció eltérően befolyásolja az ősz/progenitor, az elkötelezett progenitor és a fejlődő idegsejt előalak sejtek migrációs aktivitását. Stimulálással az elkötelezett progenitorok vándorlása szignifikánsan megnövelhető, míg a neuron előalakok mozgása lassítható. Miután az idegsejt érés természetes velejárója a progenitorok vándorlása és az idegsejtté alakuló előalak sejtek „letelepedése”, az adatok jelzik, hogy a bioelektromos ingerek az idegi sejtfejlődés mindkét szakaszában segítik a sejt differenciációt.

## Summary

Although neural stem/progenitor cells are present in the brain during the entire life of mammals, neurons destroyed by injuries or by neurodegenerative diseases are not replaced by inherent newborn neurons and can not be substituted by implanted neural stem/progenitor cells, which *in vitro* generate a wide variety of functional nerve cells. In order to understanding the conditions for successful clinical applications, both, the biological requirements of neural stem cells and the environment provided by the host brain tissue should be explored. During neuronal tissue formation, stem cells develop in an entirely different environment from that of the fully developed nervous system. It is now evident that neuron formation and the integration of novel neurons into functional neuronal circuits require specific extracellular matrix components, growth factor combinations, stimulus patterns, oxygen and metabolite supply that are different from those provided by the adult nervous tissue. For the time being, our knowledge on the specific metabolic needs of neural stem cells and the motility responses of neural progenitors to bioelectric stimuli are far from complete.

During my thesis work, the metabolic characteristics of NE-4C embryonic mouse neural stem cells were compared to those of NE-4C-derived neurons obtained by *in vitro* neurogenesis of stem cells. Studies on cell metabolism included the instrumental measurement of oxygen consumption and proton production (extracellular acidification), the monitoring of cell viability under different metabolite supplies, and the gene expression analyses of some key factors (enzymes, transporters and regulatory proteins) of the basic cell metabolism.

The results of metabolic studies confirmed that oxidative phosphorylation gains increasing importance in the energy production of the cells with the advancement of neuronal differentiation. While stem cells obtain energy mainly from glycolytic processes, they can utilise every external metabolite (lactate, pyruvate and  $\beta$ -hydroxibutirate) for oxidative energy production indicating a fast metabolic accommodation ability. Neurons, on the other hand, maintain their high oxidative phosphorylation activity even in starvation: they gain energy from oxidative catabolism of their own cellular material. In case of starvation, however, glucose is utilised through aerobic glycolysis by both stem cells and neurons. As a rather unexpected result, neurons did not utilise neither lactate nor pyruvate for mitochondrial energy production. According to the data, glucose which is known to be vital for the survival of neurons seems not to be utilised primarily for energy production by starving neurons maintained in culture. The possible pathways of glucose utilisation

and the possible metabolites fuelling the energy production of neurons are discussed. We suggest that glucose is utilized through the pentose phosphate pathway, and serves to produce reductive substances to defend the neurons against the reactive oxidative substances and to provide nucleotides for the DNA repair mechanism during the extreme long life period of neurons.

Using radial glia-like neural stem/progenitor cells carrying light gated cation (channelrhodopsin) channels we analyzed the changes in cell motility in response to ionic stimulation.

Mathematical calculations and statistical analyses of the motility changes of fetal radial glia-like neural stem/progenitor cells verified that ionic stimulation influences differently the migration of stem/progenitor cells, committed progenitors and developing neuronal precursor cells. The stimulation increases the migration of committed progenitors significantly, while the movement of neuronal precursors slows down in response to stimulation. Since the migration of progenitors and the anchorage of maturing neuronal precursor cells are known events of neuronal differentiation, we concluded that bioelectric stimuli modify neuronal cell development in a differentiation stage-dependent way.

## Hivatkozások

- [1] G. Lepousez, M. T. Valley, and P.-M. Lledo, “The Impact of Adult Neurogenesis on Olfactory Bulb Circuits and Computations,” *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 75, no. 1, pp. 339–363, Feb. 2013.
- [2] G. Lepousez, A. Nissant, and P.-M. Lledo, “Adult Neurogenesis and the Future of the Rejuvenating Brain Circuits,” *Neuron*, vol. 86, no. 2, pp. 387–401, Apr. 2015.
- [3] E. Madarász, “Diversity of Neural Stem/Progenitor Populations: Varieties by Age, Regional Origin and Environment,” in *Neural Stem Cells - New Perspectives*, L. Bonfanti, Ed. InTech, 2013.
- [4] J. Mertens, M. C. Marchetto, C. Bardy, and F. H. Gage, “Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 17, no. 7, pp. 424–437, May 2016.
- [5] G. Vunjak-Novakovic *et al.*, “Challenges in cardiac tissue engineering,” *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 16, no. 2, pp. 169–187, 2009.
- [6] I. Martin, D. Wendt, and M. Heberer, “The role of bioreactors in tissue engineering,” *Trends Biotechnol.*, vol. 22, no. 2, pp. 80–86, Feb. 2004.
- [7] B. Mlody, C. Lorenz, G. Inak, and A. Prigione, “Energy metabolism in neuronal/glial induction and iPSC-based modeling of brain disorders,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, Feb. 2016.
- [8] K. Takahashi and S. Yamanaka, “Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors,” *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 663–676, Aug. 2006.
- [9] Y. Shi, H. Inoue, J. C. Wu, and S. Yamanaka, “Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 16, no. 2, pp. 115–130, Dec. 2016.
- [10] Uher Ferenc, *Óssejt-biológia*. Budapest: Medicina, 2017.
- [11] J. Zhang, E. Nuebel, G. Q. Daley, C. M. Koehler, and M. A. Teitell, “Metabolic Regulation in Pluripotent Stem Cells during Reprogramming and Self-Renewal,” *Cell Stem Cell*, vol. 11, no. 5, pp. 589–595, Nov. 2012.
- [12] K. Demeter *et al.*, “Fate of cloned embryonic neuroectodermal cells implanted into the adult, newborn and embryonic forebrain,” *Exp. Neurol.*, vol. 188, no. 2, pp. 254–267, Aug. 2004.
- [13] A. Zádori *et al.*, “Survival and differentiation of neuroectodermal cells with stem cell properties at different oxygen levels,” *Exp. Neurol.*, vol. 227, no. 1, pp. 136–148, Jan. 2011.
- [14] T. Boroviak and J. Nichols, “The birth of embryonic pluripotency,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 369, no. 1657, pp. 20130541–20130541, Oct. 2014.
- [15] A. Romito and G. Cobellis, “Pluripotent Stem Cells: Current Understanding and Future Directions,” *Stem Cells Int.*, vol. 2016, pp. 1–20, 2016.
- [16] S. Yamanaka and H. M. Blau, “Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches,” *Nature*, vol. 465, no. 7299, pp. 704–712, Jun. 2010.
- [17] T. Namba and W. B. Huttner, “Neural progenitor cells and their role in the development and evolutionary expansion of the neocortex: Neural progenitor cells’ role in the development and evolutionary expansion of the neocortex,” *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, vol. 6, no. 1, p. e256, Jan. 2017.
- [18] E. Taverna, M. Götz, and W. B. Huttner, “The Cell Biology of Neurogenesis: Toward an Understanding of the Development and Evolution of the Neocortex,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 30, no. 1, pp. 465–502, Oct. 2014.
- [19] J. L. Rubenstein, K. Shimamura, S. Martinez, and L. Puelles, “Regionalization of the prosencephalic neural plate,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 21, no. 1, pp. 445–477, 1998.

- [20] V. Martínez-Cerdeño and S. C. Noctor, “Cortical evolution 2015: Discussion of neural progenitor cell nomenclature: Neural Progenitor Cell Nomenclature,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 524, no. 3, pp. 704–709, Feb. 2016.
- [21] J. J. LoTurco, D. F. Owens, M. J. Heath, M. B. Davis, and A. R. Kriegstein, “GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis.,” *Neuron*, vol. 15, no. 6, pp. 1287–1298, Dec. 1995.
- [22] M. J. O’Donovan, “The origin of spontaneous activity in developing networks of the vertebrate nervous system,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 9, no. 1, pp. 94–104, 1999.
- [23] Y. Ben-Ari, “Developing networks play a similar melody,” *Trends Neurosci.*, vol. 24, no. 6, pp. 353–360, 2001.
- [24] S. W. Flavell and M. E. Greenberg, “Signaling Mechanisms Linking Neuronal Activity to Gene Expression and Plasticity of the Nervous System,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 31, no. 1, pp. 563–590, Jul. 2008.
- [25] H. J. Luhmann *et al.*, “Spontaneous Neuronal Activity in Developing Neocortical Networks: From Single Cells to Large-Scale Interactions,” *Front. Neural Circuits*, vol. 10, May 2016.
- [26] J. Song *et al.*, “Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision,” *Nature*, vol. 489, no. 7414, pp. 150–154, Jul. 2012.
- [27] N. C. Spitzer, “Electrical activity in early neuronal development,” *Nature*, vol. 444, no. 7120, pp. 707–712, Dec. 2006.
- [28] L. A. Donehower *et al.*, “Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours.,” *Nature*, vol. 356, no. 6366, pp. 215–221, Mar. 1992.
- [29] J. Henley and M. Poo, “Guiding neuronal growth cones using Ca<sup>2+</sup> signals,” *Trends Cell Biol.*, vol. 14, no. 6, pp. 320–330, Jun. 2004.
- [30] F. Zhang, A. M. Aravanis, A. Adamantidis, L. de Lecea, and K. Deisseroth, “Circuit-breakers: optical technologies for probing neural signals and systems,” *Nat Rev Neurosci.*, vol. 8, no. 8, pp. 577–581, 2007.
- [31] J. Altman and G. D. Das, “Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 124, no. 3, pp. 319–335, Jun. 1965.
- [32] J. Paton and F. Nottebohm, “Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits,” *Science*, vol. 225, no. 4666, pp. 1046–1048, Sep. 1984.
- [33] B. A. Reynolds and S. Weiss, “Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system.,” *Science*, vol. 255, no. 5052, pp. 1707–1710, Mar. 1992.
- [34] A. Alvarez-Buylla and S. Temple, “Stem cells in the developing and adult nervous system.,” *J. Neurobiol.*, vol. 36, no. 2, pp. 105–110, Aug. 1998.
- [35] F. H. Gage, “Mammalian Neural Stem Cells,” *Science*, vol. 287, no. 5457, pp. 1433–1438, Feb. 2000.
- [36] K. Ohira, “Injury-induced neurogenesis in the mammalian forebrain,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 68, no. 10, pp. 1645–1656, May 2011.
- [37] M. Götz, M. Nakafuku, and D. Petrik, “Neurogenesis in the Developing and Adult Brain—Similarities and Key Differences,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 8, no. 7, p. a018853, Jul. 2016.
- [38] F. H. Gage and S. Temple, “Neural Stem Cells: Generating and Regenerating the Brain,” *Neuron*, vol. 80, no. 3, pp. 588–601, Oct. 2013.
- [39] S. Ramasamy, G. Narayanan, S. Sankaran, Y. H. Yu, and S. Ahmed, “Neural stem cell survival factors,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 534, no. 1–2, pp. 71–87, Jun. 2013.
- [40] A. Faissner and J. Reinhard, “The extracellular matrix compartment of neural stem and glial progenitor cells: Extracellular Matrix of Stem/Progenitor Cells,” *Glia*, vol. 63, no. 8, pp. 1330–1349, Aug. 2015.

- [41] C. D. L. Folmes, P. P. Dzeja, T. J. Nelson, and A. Terzic, “Metabolic Plasticity in Stem Cell Homeostasis and Differentiation,” *Cell Stem Cell*, vol. 11, no. 5, pp. 596–606, Nov. 2012.
- [42] V. A. Rafalski and A. Brunet, “Energy metabolism in adult neural stem cell fate,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 93, no. 2, pp. 182–203, Feb. 2011.
- [43] H. W. Choi *et al.*, “Mitochondrial and Metabolic Remodeling During Reprogramming and Differentiation of the Reprogrammed Cells,” *Stem Cells Dev.*, vol. 24, no. 11, pp. 1366–1373, Jun. 2015.
- [44] M. Knobloch and S. Jessberger, “Metabolism and neurogenesis,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 42, pp. 45–52, Feb. 2017.
- [45] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, and C. B. Thompson, “Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation,” *science*, vol. 324, no. 5930, pp. 1029–1033, 2009.
- [46] D. C. Ngo, K. Ververis, S. M. Tortorella, and T. C. Karagiannis, “Introduction to the molecular basis of cancer metabolism and the Warburg effect,” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 42, no. 4, pp. 819–823, Apr. 2015.
- [47] M. Wu *et al.*, “Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells,” *AJP Cell Physiol.*, vol. 292, no. 1, pp. C125–C136, Sep. 2006.
- [48] C. Lange *et al.*, “Relief of hypoxia by angiogenesis promotes neural stem cell differentiation by targeting glycolysis,” *EMBO J.*, Feb. 2016.
- [49] D. M. Panchision, “The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 220, no. 3, pp. 562–568, Sep. 2009.
- [50] L. Schneider *et al.*, “Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, no. 11, pp. 2007–2017, Dec. 2011.
- [51] Z. Xun *et al.*, “Retinoic acid-induced differentiation increases the rate of oxygen consumption and enhances the spare respiratory capacity of mitochondria in SH-SY5Y cells,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. 133, no. 4, pp. 176–185, Apr. 2012.
- [52] B. Varga *et al.*, “Translocator protein (TSPO 18kDa) is expressed by neural stem and neuronal precursor cells,” *Neurosci. Lett.*, vol. 462, no. 3, pp. 257–262, Sep. 2009.
- [53] L. Veenman, Y. Shandalov, and M. Gavish, “VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis,” *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 40, no. 3, pp. 199–205, Jun. 2008.
- [54] M. Bélanger, I. Allaman, and P. J. Magistretti, “Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation,” *Cell Metab.*, vol. 14, no. 6, pp. 724–738, Dec. 2011.
- [55] P. Mergenthaler, U. Lindauer, G. A. Dienel, and A. Meisel, “Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function,” *Trends Neurosci.*, vol. 36, no. 10, pp. 587–597, Oct. 2013.
- [56] Kety, S. S, “The general metabolism of the brain in vivo,” in *The metabolism of the nervous system*, D. Richter, Ed. London: Pergamon Press, 1957, pp. 221–237.
- [57] A. Herrero-Mendez, A. Almeida, E. Fernández, C. Maestre, S. Moncada, and J. P. Bolaños, “The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C–Cdh1,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 6, pp. 747–752, Jun. 2009.
- [58] L. Pellerin and P. J. Magistretti, “Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 91, no. 22, pp. 10625–10629, 1994.

- [59] L. K. Bak, A. Schousboe, and H. S. Waagepetersen, "The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer," *J. Neurochem.*, vol. 98, no. 3, pp. 641–653, Aug. 2006.
- [60] R. Duelli and W. Kuschinsky, "Brain glucose transporters: relationship to local energy demand," *Physiology*, vol. 16, no. 2, pp. 71–76, 2001.
- [61] A.-K. Bouzier-Sore and J. P. Bolaños, "Uncertainties in pentose-phosphate pathway flux assessment underestimate its contribution to neuronal glucose consumption: relevance for neurodegeneration and aging," *Front. Aging Neurosci.*, vol. 7, May 2015.
- [62] John Freeman, Pierangelo Veggiotti, Giovanni Lanzi, Anna Tagliabue, and Emilio Perucca, "The Ketogenic diet: from molecular mechanisms to clinical effects," *Epilepsy Res.*, vol. 68, no. 2, pp. 145–180, Feb. 2006.
- [63] G. A. Dienel, "Brain lactate metabolism: the discoveries and the controversies," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 32, no. 7, pp. 1107–1138, 2012.
- [64] L. Hertz, L. Peng, and G. A. Dienel, "Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 27, no. 2, pp. 219–249, 2007.
- [65] K. Schlett and E. Madarász, "Retinoic acid induced neural differentiation in a neuroectodermal cell line immortalized by p53 deficiency," *J. Neurosci. Res.*, vol. 47, no. 4, pp. 405–415, 1997.
- [66] K. Markó, T. Kőhidi, N. Hádinger, M. Jelitai, G. Mező, and E. Madarász, "Isolation of Radial Glia-Like Neural Stem Cells from Fetal and Adult Mouse Forebrain via Selective Adhesion to a Novel Adhesive Peptide-Conjugate," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 12, p. e28538, Dec. 2011.
- [67] M. Jelitai, M. Anderová, A. Chvátal, and E. Madarász, "Electrophysiological characterization of neural stem/progenitor cells during in vitro differentiation: Study with an immortalized neuroectodermal cell line," *J. Neurosci. Res.*, vol. 85, no. 8, pp. 1606–1617, Jun. 2007.
- [68] K. Schlett, B. Herberth, and E. Madarász, "In Vitro pattern formation during neurogenesis in neuroectodermal progenitor cells immortalized by p53-deficiency," *Int. J. Dev. Neurosci.*, vol. 15, no. 6, pp. 795–804, 1997.
- [69] K. Tárnok, Á. Pataki, J. Kovács, K. Schlett, and E. Madarász, "Stage-dependent effects of cell-to-cell connections on in vitro induced neurogenesis," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 81, no. 7, pp. 403–412, Jul. 2002.
- [70] B. Herberth *et al.*, "Changes of KCl sensitivity of proliferating neural progenitors during in vitro neurogenesis," *J. Neurosci. Res.*, vol. 67, no. 5, pp. 574–582, Mar. 2002.
- [71] M. Jelitai *et al.*, "Role of  $\gamma$ -aminobutyric acid in early neuronal development: Studies with an embryonic neuroectodermal stem cell clone," *J. Neurosci. Res.*, vol. 76, no. 6, pp. 801–811, Jun. 2004.
- [72] N. Hádinger, B. V. Varga, S. Berzsényi, Z. Környei, E. Madarász, and B. Herberth, "Astroglia genesis in vitro: distinct effects of retinoic acid in different phases of neural stem cell differentiation," *Int. J. Dev. Neurosci.*, vol. 27, no. 4, pp. 365–375, Jun. 2009.
- [73] K. Markó *et al.*, "A Novel Synthetic Peptide Polymer with Cyclic RGD Motifs Supports Serum-Free Attachment of Anchorage-Dependent Cells," *Bioconjug. Chem.*, vol. 19, no. 9, pp. 1757–1766, Sep. 2008.
- [74] E. Madarasz, J. Kiss, and I. Bartok, "Cell production and morphological pattern formation in primary brain cell cultures. I. Pattern formation within the basal layer(s)," *Brain Res.*, vol. 304, no. 2, pp. 339–349, Jun. 1984.
- [75] Z. Környei, A. Czirók, T. Vicsek, and E. Madarász, "Proliferative and migratory responses of astrocytes to in vitro injury," *J. Neurosci. Res.*, vol. 61, no. 4, pp. 421–429, 2000.



- [76] T. Mosmann, “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays,” *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1, pp. 55–63, 1983.
- [77] R Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2015.
- [78] A. A. Gerencser *et al.*, “Quantitative Microplate-Based Respirometry with Correction for Oxygen Diffusion,” *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 16, pp. 6868–6878, Aug. 2009.
- [79] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method,” *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, Dec. 2001.
- [80] L. Madisen *et al.*, “A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing,” *Nat. Neurosci.*, vol. 15, no. 5, pp. 793–802, Mar. 2012.
- [81] T. Köhidi *et al.*, “Differentiation-Dependent Motility-Responses of Developing Neural Progenitors to Optogenetic Stimulation,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 11, Dec. 2017.
- [82] B. A. Hug *et al.*, “Analysis of mice containing a targeted deletion of beta-globin locus control region 5’ hypersensitive site 3.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 2906–2912, 1996.
- [83] F. Zhang *et al.*, “Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures,” *Nat. Protoc.*, vol. 5, no. 3, pp. 439–456, Mar. 2010.
- [84] Seahorse Bioscience, “Seahorse XFe Brochure,” [http://seahorsebio.com/resources/pdfs/marketing/XFe\\_Brochure\\_LowRes.pdf](http://seahorsebio.com/resources/pdfs/marketing/XFe_Brochure_LowRes.pdf), 16-Dec-2015. .
- [85] T. Uchiumi and D. Kang, “The role of TFAM-associated proteins in mitochondrial RNA metabolism,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1820, no. 5, pp. 565–570, May 2012.
- [86] V. Rogov, V. Dötsch, T. Johansen, and V. Kirkin, “Interactions between Autophagy Receptors and Ubiquitin-like Proteins Form the Molecular Basis for Selective Autophagy,” *Mol. Cell*, vol. 53, no. 2, pp. 167–178, Jan. 2014.
- [87] L. H. Bergersen, “Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle,” *Neuroscience*, vol. 145, no. 1, pp. 11–19, Mar. 2007.
- [88] M. K. Jha, S. Jeon, and K. Suk, “Pyruvate Dehydrogenase Kinases in the nervous system: their principal functions in Neuronal-glia metabolic interaction and Neuro-metabolic disorders,” *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 10, no. 4, p. 393, 2012.
- [89] M. C. Sugden and M. J. Holness, “Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs,” *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, vol. 284, no. 5, pp. E855–E862, May 2003.
- [90] P. Wu, P. V. Blair, J. Sato, J. Jaskiewicz, K. M. Popov, and R. A. Harris, “Starvation Increases the Amount of Pyruvate Dehydrogenase Kinase in Several Mammalian Tissues,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 381, no. 1, pp. 1–7, Sep. 2000.
- [91] A. J. Levine, J. Momand, and C. A. Finlay, “The p53 tumour suppressor gene,” *Nature*, vol. 351, no. 6326, pp. 453–456, Jun. 1991.
- [92] C. R. Berkers, O. D. K. Maddocks, E. C. Cheung, I. Mor, and K. H. Vousden, “Metabolic Regulation by p53 Family Members,” *Cell Metab.*, vol. 18, no. 5, pp. 617–633, Nov. 2013.
- [93] A. G. Jány, Á. M. Nagy, T. Köhidi, S. Ferenczi, L. Tretter, and E. Madarász, “Differentiation-Dependent Energy Production and Metabolite Utilization: A Comparative Study on Neural Stem Cells, Neurons, and Astrocytes,” *Stem Cells Dev.*, vol. 25, no. 13, pp. 995–1005, Jul. 2016.
- [94] J. Grotius, C. Dittfeld, M. Huether, W. Mueller-Klieser, M. Baumann, and L. A. Kunz-Schughart, “Impact of exogenous lactate on survival and radioresponse of carcinoma cells in vitro,” *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 85, no. 11, pp. 989–1001, Nov. 2009.

- [95] M. J. Rardin, S. E. Wiley, R. K. Naviaux, A. N. Murphy, and J. E. Dixon, "Monitoring phosphorylation of the pyruvate dehydrogenase complex," *Anal. Biochem.*, vol. 389, no. 2, pp. 157–164, Jun. 2009.
- [96] P. Schönfeld and G. Reiser, "Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy?-Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 33, no. 10, pp. 1493–1499, 2013.
- [97] E. Meijering, O. Dzyubachyk, I. Smal, and others, "Methods for cell and particle tracking," *Methods Enzym.*, vol. 504, no. 9, pp. 183–200, 2012.
- [98] K. Schlett, A. Czirik, K. Tárnok, T. Vicsek, and E. Madarasz, "Dynamics of cell aggregation during in vitro neurogenesis by immortalized neuroectodermal progenitors," *J. Neurosci. Res.*, vol. 60, no. 2, pp. 184–194, 2000.
- [99] L.-H. Tsai and J. G. Gleeson, "Nucleokinesis in Neuronal Migration," *Neuron*, vol. 46, no. 3, pp. 383–388, May 2005.
- [100] B. Szabó, R. Ünneper, K. Markó, Z. Környei, E. Méhes, and A. Czirik, "Inhibition of myosin II triggers morphological transition and increased nuclear motility," *Cytoskeleton*, vol. 68, no. 6, pp. 325–339, 2011.

## **A szerző publikációi**

### **Folyóiratcikk**

[1] **A. G. Jády**, Á. M. Nagy, T. Köhidi, S. Ferenczi, L. Tretter, and E. Madarász, “Differentiation-Dependent Energy Production and Metabolite Utilization: A Comparative Study on Neural Stem Cells, Neurons, and Astrocytes,” *Stem Cells and Development*, vol. 25, no. 13, pp. 995–1005, Jul. 2016.

[2] T. Köhidi, **A. G. Jády**, K. Markó, N. Papp, T. András, Zs. Környei, E. Madarász, “Differentiation-Dependent Motility-Responses of Developing Neural Progenitors to Optogenetic Stimulation,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 11, Dec. 2017.

### **Konferenciaközlemény**

[3] Z. Bérces, Á. Horváth, **A. Jády**, A. Pongrácz, E. Madarász, and Z. Fekete, “Neural Cell Response to Nanostructured Biosensor Surfaces,” *Procedia Engineering*, vol. 87, pp. 971–974, 2014.

## **Köszönetnyilvánítás**

Először szeretném megköszönni témavezetőm, Dr. Madarász Emília segítségét, aki szakmailag és emberileg is támogatta a tudományos pályafutásom fejlődését.

Köszönettel tartozom Dr. Tretter Lászlónak, hogy lehetővé tette a Seahorse rendszer használatát a Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémiai Intézetében és értékes segítségét az adatok értelmezésében. Továbbá Nagy Ádám és Dr. Kovács Tünde betanítását és segítségét a mérésekben.

Köszönöm Kőhídi Tímeának a sejtmozgásos kísérletekben elvégzett munkáját, ami lehetővé tette a sejtmozgás adatok elemzését és a segítségét a qPCR mérések betanításában. Köszönet illeti Gaál Katalint a sejttenyészetekkel való munka betanításáért és a mérések kivitelezésében nyújtott technikai segítségért. Köszönöm Dr. Környei Zsuzsanna segítségét a primer tenyészetek kezelésében.

Szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki bármilyen formában segítette munkámat.

Külön köszönöm Dr. Karmos György, belső konzulensem hasznos tanácsait és útmutatásait.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönöm a folyamatos támogatást, biztatást és megértést, amit a feleségemtől, apámtól, anyámtól és testvéreimtől kaptam.

The project was supported by the European Union, co-financed by the European Social Fund (EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00002).