

**Idegi őrsejtek anyagcsere őrvtonalainak őr ionos
ingerlésre adott mozgás válaszaínak változása az in
vitro idegsejtképződés során**

Doktori (PhD) disszertáció tázisei

Jády Attila Gyula

Témavezető: Dr. Madarász Emília DSc

Belső konzulens: Dr. Karmos György PhD



Pázmány Péter Katolikus Egyetem

Információs Technológiai őr Bionikai Kar

Roska Tamás Műszaki őr Természettudományi Doktori Iskola

Budapest, 2017

1. Bevezetés

Bár idegsejtek képzésére alkalmas idegi ősz/progenitor sejtek a teljes élettartam alatt jelen vannak az agyban, és sokféle módszerrel *in vitro* is előállíthatók idegsejteké alakuló ősz/progenitor sejtek, a sérülések vagy neurodegeneratív betegségek során elpusztult idegsejtek pótlása ma még nem megoldható. A természetesen 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, ingermintázatra, oxigén és energia ellátottságra van szükség. Ugyanakkor, az idegi őssejtek speciális anyagcsere igényeiről 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, transzporterek és szabályozó fehérjék génexpressziójának elemzésével.

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

Célkitűzések

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 differenciáltatott utódsejtjeik agycsere sajátosságait vizsgáltam az NE-4C sejtek *in vitro* neuron képzése során. Az idegi őssejtek és fejlődő idegsejt alakok O_2 fogyasztását, H^+ 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 anyagcseréje 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 összejt 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 összejtek 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 ionosan ingerelt és nem ingerelt, azonos fejlődési állapotú sejtek között?

2. Módszerek

Az NE-4C ((Schlett and Madarász, 1997); ATTC-CRL-2595) neuronális őssejtek és belőlük fejlődő idegsejtek fejlődési állapotát immuncitokémiai és qPCR módszerekkel ellenőriztük.

Az NE-4C őssejtek, NE-4C eredetű idegsejtek oxigén fogyasztását (OCR) és proton termelését (ECAR) Seahorse anyagcsere mérőkészülék segítségével, mesterséges agygerincvelői (ACSF: artificial cerebrospinal fluid) oldatban mértük. Összehasonlításként embrionális/újszülött agyból tenyésztett ideg és asztrocita sejtek OCR és ECAR értékeit is meghatároztuk. A tápanyag nélküli oldathoz tápanyag molekulákat adagoltunk és mértük a sejtanyagcsere megváltozását egyedi metabolitok (glükóz, laktát, piruvát vagy β -hidroxi-butirát), illetve további éhezés hatására.

A tápanyagmentes és tápoldatban lévő sejtek életképességét MTT redukciós teszttel mértük. A tápanyagmentes, illetve egyetlen metabolitot tartalmazó oldatban tartott sejtek mitokondriális működésüket speciálisan gátló hatóanyagokra (oligomycin, FCCP, DNP, antimycin and rotenon) adott válaszok mérésével ellenőriztük.

A sejtek alapanyagcseréjében kulcsszerepet játszó enzimek kifejeződésének változását az idegi sejt differenciáció során, a gén expresszió szintjén, qPCR módszerrel vizsgáltuk.

A radiális gliászzerű (RGI) idegi őssejtek fényérzékeny channelrhodopsin-2 kation ioncsatornát tartalmazó (ChR2⁺) illetve nem tartalmazó (ChR2⁻) populációban vizsgáltuk sejtek differenciációja során bekövetkező motilitás változást 12 órán keresztül 5 percenként ismételt megvilágítás ($\lambda=488$ nm; 300 ms; 0,13 mW/ mm²) hatására. A sejtek elmozdulását time-lapse felvételek egymást követő képein követtük. A sejt középpontok x és y koordinátái alapján ábrázoltuk a sejtek által bejárt útvonalat. Az egyes képek közötti (5 perces) elmozdulás távolságát a két dimenziós Euklideszi távolság alapján határoztuk meg. A ChR2⁺ és ChR2⁻ sejtek megvilágítás hatására mutatott motilitását összehasonlítottuk a sejtfejlődés három állapotában: az alapállapotú őssejtekben, az elkötelezett progenitorok sejtekben és az idegsejt előalak állapotban. Az adatok összegzése után, a motilitás különbségeket statisztikai módszerekkel elemeztük.

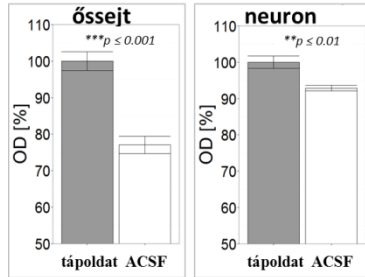
3. Új tudományos eredmények összefoglalása

1. tézis: Az NE-4C eredetű és az agyból izolált neuronok hasonló anyagcsere tulajdonságokkal rendelkeznek.

Tartósabb éhezés, glükóz, laktát, piruvát és β -OH-butirát hozzáadására hasonlóképpen reagálnak az NE-4C eredetű és az agyszöveti idegsejtek. Oxigénfogyasztás és savasodás változásuk, protonszivárgásuk, valamint *pdk4*, *atg12* és *tfam* expressziós szintjük hasonló módon tér el az idegi őssejtek jellemzőitől.

2. tézis: A tápanyag megvonás nagyobb mértékben károsítja az idegi őssejteket, mint az idegsejteket.

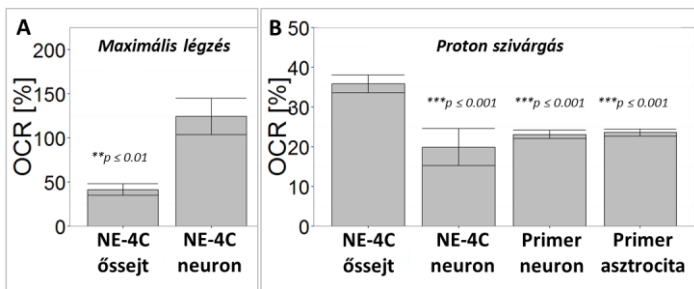
Az életképesség mérések alapján, a fejlettebb sejtek több órán át képesek saját anyagaik lebontásával fedezni az energiaszükségletüket, míg az embrionális idegi őssejteket a néhány órás „éhezés” jelentősen károsítja. (1. ábra)



1. ábra: Az NE-4C **össsejt**ek és az NE-4C eredetű idegsejtek **tenyészet**ein mért relatív életképesség 3 óras éhezés után normál tápoldatban (100%) (szürke) és tápanyagmentes ACSF-ben (fehér) átlag \pm SEM ($n \geq 10$)

3. tézis: Az NE-4C idegsejtté differenciálódás során nő a maximális mitokondriális légzés és csökken a protonszivárgás.

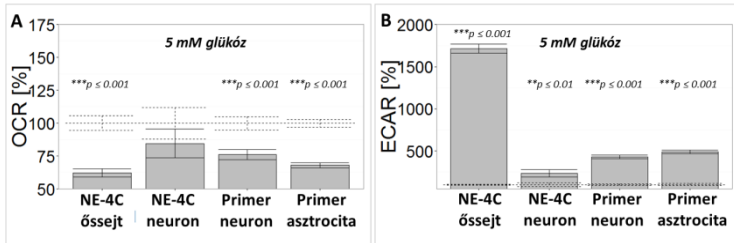
Az anyagcsere mérések eredményei alapján a NE-4C **össsejt**hez képest a belőle differenciálódott NE-4C neuron maximális mitokondriális légzése szignifikánsan magasabb, és a nem mitokondriális ATP szintézisre fordítódó, szivárgó protonok mennyisége jelentősen alacsonyabb. (2. ábra) A mitokondriális transzkripciós A faktor mennyiségének növekedése is alátámasztja, hogy az idegsejt fejlődés során a mitokondriumok változnak. A differenciáció során nő a mitokondriális aktivitás és az oxigénfogyasztás.



2. ábra: Mitokondriális érés differenciáció hatására. (A) Maximális légzés oxigénfogyasztása NE-4C összesjtekben és a belőlük származó neuronokban az alap éhezéshez (100%) képest, átlag±SEM (n≥8) (B) Protonszivárgás NE-4C összesjtekben, a belőlük differenciálódott neuronokban, primer neuronokban és primer asztrocita tenyészetekben az alap éhezéshez képest, átlag±SEM (n≥23)

4. tézis: A hozzáadott glükóz az idegi összesjtekben és idegsejtben is aerob glikolízis révén hasznosul.

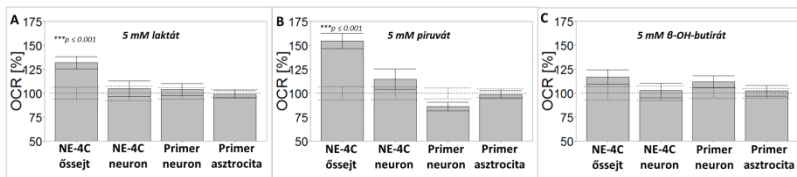
Az NE-4C ős és neuronokhoz, primer neuronokhoz és asztrocita sejtekhez adott glükóz hatására az oxigénfogyasztás csökken és a külső környezet savasodik, amely jelzi, hogy a glükózt aerob glikolízis útján hasznosítják (3. ábra).



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

5. tézis: Az éhező NE-4C őssejtek a laktátot, piruvátot és β -OH-butirátot is fel tudják használni mitokondriális energiatermelésre, míg az NE-4C neuronok és primer neuronok ezen tápanyagok hatására nem fokozzák a mitokondriális aktivitásukat.

Az éhező NE-4C őssejtek laktát, piruvát és β -OH-butirát molekulákat is felhasználnak mitokondriális energiatermelésre (4. ábra).



4. ábra: Laktát (A), piruvát (B) és β -OH-butirát (C) hozzáadás hatása Oxigénfogyasztás változás a tenyészetekben az alap éhezéshöz (100%) képest, átlag \pm SEM (n \geq 23)

Az NE-4C összesjt anyagcseréjét az elérhető tápanyagokhoz való gyors alkalmazkodás jellemzi. Az NE-4C neuronok éhezés alatt is fenntartják magas oxidatív foszforilációs aktivitásukat, belső anyagaik lebontása révén. Ez utóbbit alátámasztja az autofágiához köthető (*atg12*) gén magasabb expressziós szintje is az idegsejtben.

A jelentősen nem változó oxigénfogyasztás laktát és piruvát hatására megerősíti, hogy ezek a molekulák nem játszanak alapvető szerepet a szöveti *in vivo* működéshez képest alacsony szinaptikus aktivitású, tápanyag deprivált, idegsejt anyagcseréjében. Miután a glutamáterg szinapszisokban aktív MCT2 transzporter mRNS-ét nem tudtuk kimutatni, feltételezhető, hogy ezek a tápmolekulák nem jutnak be a tenyészetek túlnyomó sejtanyagát adó idegsejt sejttestébe.

6. tézis: A radiális glia jellegű idegi progenitor sejtek vándorlási aktivitását a befelé irányuló kation áram jelentősen fokozza, míg a belőlük differenciálódó idegsejt előalakok motilitását csökkenti.

4. Alkalmazási területek

Adataink szerint, az idegi őssejtek és fejlődő idegsejtek anyagcsere folyamatai, és ennek megfelelően tápanyag és oxigén szükségletei jelentősen különböznek. Ugyancsak nagy eltérések mutatkoznak a progenitor sejtek és fejlődő neuronok ionos stimulációra adott mozgás reakcióiban. Eredményeim megerősítik, hogy mind a jövőben várható sikeres sejterápiás alkalmazások, mind az *in vitro* szövetépítés számára nélkülözhetetlen a különböző fejlődési állapotú sejtek számára optimális környezeti feltételek feltárása.

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. Andrási, 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.