

Depolarizációs mintázatok hatása egér neurális össsejtvonalból differenciáltatott neuronok fejlődésére

36. OTDK Biológia Szekció

Készítette:

Bauer Krisztina Rita

biológus mesterszak 1. félév

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Témavezető:

Dr. Tárnok Krisztián, adjunktus

ELTE TTK Biológiai Intézet, Élettani-és Neurobiológiai Tanszék



ELTE
EÖTVÖS LORÁND
TUDOMÁNYEGYETEM

2023.

Tartalomjegyzék

1. ÖSSZEFOGLALÁS	4
2. BEVEZETÉS.....	5
2.1. A KÖZPONTI IDEGRENDSZER FEJLŐDÉSE – A NEURONOK IDENTITÁSÁT MEGHATÁROZÓ FAKTOROK.....	5
2.2. IDEGSEJTFEJLŐDÉS VIZSGÁLATA IN VITRO MODELLRENDSZERBEN	9
2.3. DEPOLARIZÁCIÓS MINTÁZATOK KIALAKÍTÁSA OPTOGENETIKA SEGÍTSÉGÉVEL	11
3. CÉLKITŰZÉSEK	12
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	13
4.1. SEJT TENYÉSZTÉS/SEJTKULTÚRÁK	13
4.2. TRANSZFEKCIÓ ÉS OPTOGENETIKA	13
4.3. RT-QPCR	15
4.4. IMMUNFESTÉS, MIKROSZKÓPIA	16
4.5. ELEKTROFIZIOLÓGIAI MÉRÉSEK.....	17
5. EREDMÉNYEK.....	18
5.1. AZ OPTOGENETIKAI KÍSÉRLETEK BEÁLLÍTÁSA	18
5.1.1. A tenyésztési protokoll beállítása	18
5.1.2. A transzfekeció beállítása.....	19
5.1.3. Fototoxicitás ellenőrzése	20
5.2. A DEPOLARIZÁCIÓS MINTÁZATOK SZELEKTÍVEN MEGVÁLTOZTATJÁK AZ ÉRŐ IDEGSEJTEK TULAJDONSÁGAIT	21
5.2.1. Elektrofiziológiai tulajdonságok megváltozása	21
5.2.2. A depolarizációs mintázat befolyásolja a sejtek Kir csatorna expresszióját	23
6. DISZKUSSZIÓ.....	26
7. KITEKINTÉS.....	29
8. SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	30
9. IRODALOM.....	31
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	34

Rövidítésjegyzék

ACSF	mesterséges agy-gerincvelői folyadék (artificial cerebrospinal fluid)
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic sav
atRA	<i>all-transz</i> retinsav
ChR2	csatornarodopszin-2
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
FCS	fötális borjú szérum (fetal calf serum)
GABA	gamma-aminovajsav
GFAP	gliális fibrilláris savas fehérje (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
GLAST	asztroglia specifikus glutamát transzporter
Kir2.x	befelé rektifikáló K ⁺ -ion csatorna (<i>inwardly rectifying potassium channel</i>) 2
MEM	Minimal Essential Medium
NeuN	Neurális sejtmag fehérje (<i>neuronal nuclear protein</i>)
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
NSC	neurális őssejtek
PBS	foszfáttal pufferolt sóoldat (<i>phosphate-buffered saline</i>)
qPCR	kvantitatív polimeráz láncreakció
RC2	radiális glia sejtmarker (<i>radial glia cell marker</i>) 2
SVZ	szubventrikuláris zóna
VZ	ventrikuláris zóna
YFP	sárga fluoreszcens fehérje

1. Összefoglalás

Az idegsejtek fejlődésében a sejt belső, genetikailag kódolt tulajdonságai mellett fontos szerepet játszanak a szöveti mikrokörnyezet változásai is, melyeket részben a sejteket érő idegi bemenetek alakítanak. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a fejlődő idegrendszerben létrejövő aktivitási mintázatokhoz hasonló depolarizációs tréningezéssel a sejt differenciációt célzottan lehet elősegíteni.

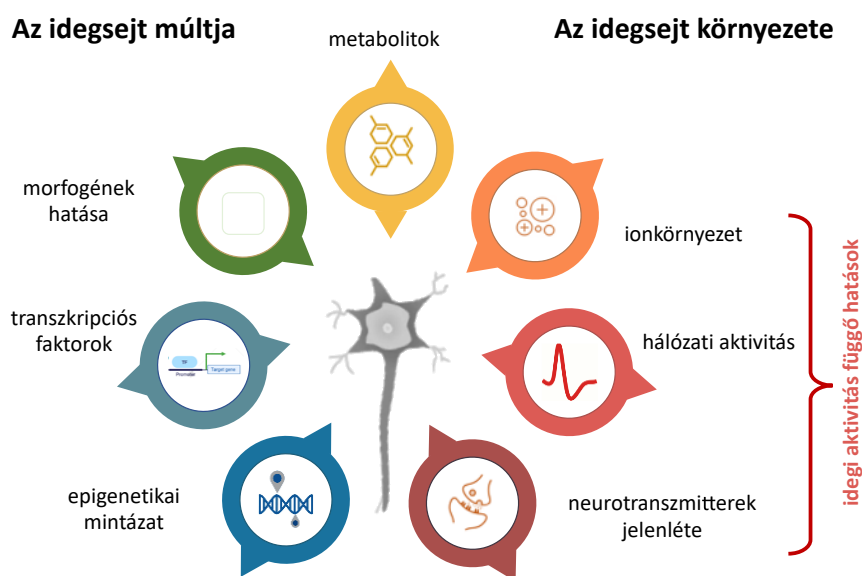
Elképzelésünket egér neuronális őssejtek (NE-4C) *in vitro* idegi differenciációja során alkalmazott optogenetikai tréningezéssel teszteltük. Ehhez az NE-4C sejt vonalban *all-transz* retinsavval neuronképzést indukáltam, az idegsejtekben csatonarodopszin-2 ioncsatornát (ChR2) fejeztettem ki, majd a sejteket 48 órán keresztül különböző megvilágítási mintázatokkal tréningeztem. A *théta oszcillációs* mintázattal tréningezett tenyészetekben a tüzelő idegsejtek aránya, az egyedi akciós potenciálok amplitúdója és az inward rektifikáló kálium áramot mutató sejtek aránya is növekedett. *Folyamatos, Poisson mintázatú* tréningezés hatástalan volt. Ha azonban a *rövid, percenként ismételt Poisson mintázatot* alkalmaztam, a *théta* mintázathoz hasonló elektrofiziológiai változást tapasztaltam. A Kir2.x csatornák izotípusainak expresszióját a tréning mintázatfüggő módon megváltoztatta.

Eredményeink jelzik, hogy az *in vitro* idegi differenciáció során a sejteket érő aktivitásmintázat hatékonyan segítheti a sejtek érését.

2. Bevezetés

2.1. A központi idegrendszer fejlődése – a neuronok identitását meghatározó faktorok

Az idegrendszer megfelelő működéséhez, annak kialakulása és fejlődése alatt pontos és bonyolult szabályozási rendszernek kell működnie. A folyamat során az agyban az idegi őssejtekből a térben és időben precízen szabályozott hatások eredményeként változatos morfológiájú és funkciójú sejtek alakulnak ki. A sejt fejlődésben fontos szerepet játszanak az adott sejt belső, genetikailag kódolt tulajdonságai (például az, hogy az idegrendszer melyik részéből származik, milyen epigenetikai mintázatokat hordoz, aktuálisan milyen génexpressziós mintázattal rendelkezik) ugyanakkor a sejtet érő környezeti hatások (milyen neurotranszmitterek érik, milyen ionkörnyezetben helyezkedik el, milyen a formálódó hálózat idegi aktivitása) és ezzel összefüggésben a sejt membrántulajdonságai (a sejt ingerelhetősége) is kiemelt jelentőséggel bírnak (**1. ábra**). A fejlődés során a szöveti mikrokörnyezet változásai mellett, a sejteket érő idegi bemenetek fontos szerepet játszanak az érett idegsejtek és a sejtekre jellemző diverzitás kialakulásában. A fejlődő sejtek közelében az elektrokémiai potenciálban bekövetkező változások, a tónusos vagy szinaptikus bemenetek, befolyásolják a fejlődő neuronok belső biofizikai és fiziológiai tulajdonságait (Johnson-Venkatesh és *mtsai.*, 2015; Köhidi és *mtsai.*, 2017; Lim és *mtsai.*, 2018; Sultan és Shi, 2018; Ojeda és Ávila, 2019). Az idegi prekursorok és idegsejtek érése mellett az idegi aktivitás hatással lehet a sejtmigrációra, az idegi kapcsolatok kialakulására és a programozott sejthalálra is (Katona és *mtsai.*, 2001; Luhmann és *mtsai.*, 2016; Köhidi és *mtsai.*, 2017).



1. ábra Az idegsejt identitását befolyásoló tényezők (forrás: Tárnok K.)

Az idegrendszer fejlődése az egér embrióban a 7. nap környékén, az embrió dorzális oldalán indul meg. Kialakul a velőlemez, ami fokozatosan csővé záródik, majd az egész központi idegrendszer alapját képezi. A velőlemezt és velőcsövet alkotó, nestin intermedier filamentumot tartalmazó (nestin pozitív) neuroepiteliális őssejtek¹ eleinte szimmetrikusan, majd később aszimmetrikusan is osztódnak. Aszimmetrikus osztódás során az egyik utódsejt megőrzi őssejt tulajdonságait, míg a másik utódsejt egy új sejttípus irányába lesz elkötelezett. Az így képződő neuroepiteliális sejtekből kialakuló radiális glia sejtek (ezek a funkcionáló neurális őssejtek, NSC-k) részben fenntartják saját populációjukat, részben a szövetre jellemző ideg-, valamint az asztrogliá sejteket hozzák létre². Jellemző, hogy a fejlődő idegrendszerben az egyes fejlődési stádiumokban, egymással párhuzamosan az idegi őssejtek több típusa is megtalálható (Köhidi és *mtsai.*, 2017).

A központi idegrendszer idegsejtjei a neuroepiteliális sejtekből és a radiális glia sejtekből közvetlen vagy köztes progenitorokon (pl. bazális progenitor sejtek) keresztül alakulnak ki. A sejttípusok közötti határ nem mindig éles, a radiális gliasejtekre is jellemző a nestin és az radiális glia sejtmarker-2 (RC2) pozitivitás, ám bennük a fejlődés előrehaladtával megjelennek asztrogliá sejtekre jellemző tulajdonságok, mint például az asztrogliá specifikus glutamát transzporter (GLAST) (Shibata és *mtsai.*, 1997; Anthony és Heintz, 2008). A progenitor és a radiális glia sejtek is képesek folyamatos osztódással önmaguk megújítására, valamint aszimmetrikus osztódással köztes progenitorok, idegsejtek és gliasejtek létrehozására *in vitro* körülmények között is (Rowitch és Kriegstein, 2010; Köhidi és *mtsai.*, 2017).

Az agyszövet fejlődésének jellemző aspektusa, hogy a neuronok kapcsolatrendszereiket nem a születésük helyén alakítják ki, hanem szöveti pozícióikat hosszabb-rövidebb vándorlást követően érik el (Kriegstein és Noctor, 2004). Az agykérget kialakító neuronok a velőcső üregét körülvevő ún. ventrikuláris zónában (VZ) vagy az e feletti ún. szubventrikuláris zónában (SVZ) alakulnak ki. A dorzális VZ területéről származó vetítő neuronok a kérgi rétegeket inverz módon hozzák létre. Először a mélyebb kérgi rétegek (pl. 6. réteg) neuronjai alakulnak ki, majd a fiatalabb, külső rétege(ke)t alkotó sejtek a már kialakult rétegen túllépve állapodnak meg (inside-out fejlődési modell). A korai kortikogenezisben a neuronok két populációja tölt be fontos szerepet. A „Cajal-Retzius” sejtek és a korán kialakuló ún. „szubplate” neuronok viszonylag érett funkcionális tulajdonságokat mutatnak (például az ismétlődő akciók

¹ Az őssejt olyan sejttípus, mely képes létrehozni önmagával megegyező és/vagy magánál differenciáltabb sejtet (Smith, 2006)

² A radiális glia sejtek az organogenezis végén eldifferenciálódnak, őssejttulajdonságuk csak 2 kitüntetett helyen marad meg a felnőtt agyban (Obenauer and Alvarez-Buylla, 2019)

potenciálok), és megfigyelhetőek rajtuk szinaptikus bemenetek is. Később a fejlődés során ezen neuronok nagy része eltűnik, vagy jelentős átalakuláson megy keresztül (Luhmann és *mtsai.*, 2016).

A kéregben a radiális glia sejtek mentén történő, piális felszín felé mutató sejtváándorlás mellett megjelennek az ezekre merőlegesen, tangencionálisan migráló interneuronok. Ezeknek a neuronoknak kiemelt szerepük van már a korai kapcsolatok kialakításában is. Jellemzően a velőcső ventrális területén kialakuló gangliondombokból migrálnak a kortex területére (laterális, mediális és kaudális gangliondomb). A mediális gangliondomb területéről származnak többek közt a neokortex GABAerg sejtjei, a bazális ganglionok neuronjai, vagy épp a fentebb már említett „Cajal-Retzius” sejtek. A kaudális gangliondombból származik egy igen diverz sejtcsoport, többek között a kérgi interneuronok is. A laterális gangliondombnak az embrionális fejlődés későbbi szakaszában van nagy jelentősége, innen származik ugyanis a szaglóhagyma idegi eredetű sejtjeinek nagy része (Buchsbaum és Cappello, 2019). A gangliondombban végbemenő sejtproliferációnak és az innen kifelé történő intenzív, tangencionális, majd radiális vándorlásnak fontos szerepe van abban, hogy a kéregre jellemző összetett kapcsolati rendszer kialakulhasson. A sejtváándorlás alatt a sejteket számos környezeti hatás éri, például a már formálódó idegi kapcsolatok felől, melyek identitásukat befolyásolhatják (Kriegstein és Noctor, 2004; Buchsbaum és Cappello, 2019).

A fejlődő rágcsáló idegrendszerben a késői prenatális és a posztnatális fejlődés különböző fázisaiban spontán aktivitási mintázatok jelennek meg. Ezek eleinte egyszerű ismétlődő mintázatok, amiket később bonyolultabb mintázatok váltanak fel. A mintázatok a prenatális szakaszban gyors fejlődést mutató rágcsálókban gyorsan, 2-3 napon belül megváltozhatnak. A fejlődő idegsejtek a differenciáció során végig, a sejt születésének pillanatától, a migráción át az idegrendszeri hálózatok kialakulásáig elsősorban depolarizációs hatásoknak vannak kitéve. Egér embrió neokortikális szeletekben például már a 16. embrionális napon megfigyeltek spontán, alacsony frekvenciájú ($< 1 \text{ min}^{-1}$), elektromos aktivitás-függő kalcium-tranzienseket (Luhmann és *mtsai.*, 2016). Az elektromos aktivitás nagyban befolyásolja az idegsejtek keletkezését, de ezek szabályozzák például az axon myelinizációt is. Ismert, hogy a ventrikuláris zónában a radiális gliasejtekre jellemző kalcium hullámok befolyásolják a neurorális ősz/progenitor sejtek proliferációját. A kalcium hullámok blokkolásával ugyanis csökken a születő idegsejtek száma (Luhmann és *mtsai.*, 2016). Kísérletesen bizonyították azt is, hogy az idegrendszer fejlődése során a hippocampusz CA1 régiójában és a gyrus dentatusban a neuronok működésének gátlása rendellenességeket okoz a

sejt-fejlődésében, például csökken a serkentő bemeneteket fogadó dendrittüskék száma, és ez a születést követően is hatással van az idegi jelátvitelre (Johnson-Venkatesh és mtsai., 2015). A neuronok ingerlékenysége tehát a hippocampusban befolyásolja a fejlődést és a fejlődő áramkörökbe történő sejt-integrálódást.

A feszültségfüggő ioncsatornák kifejeződésével az idegi aktivitás szinkronizálódni kezd. Eleinte az elektromos szinapszisok dominálnak, és kisebb, helyi hálózatok alakulnak ki, ám már a réskapcsolatokon keresztül is jellemzőek a tovaterjedő kalcium oszcillációk (M. Jelitai, M. Anderová, A. Chvátal, 2007). Később az idegi aktivitás egyre inkább szinkronizálódik, ahogy nagyobb, több területre kiterjedő hálózatok alakulnak ki a fejlődő idegrendszerben. Ezzel egyidőben jellemző az elektromos szinapszistról fokozatosan kémiai szinapszisokra történő áttérés. A fiatal neurális őssejtekben, progenitorokban depolarizációt okozhat a gamma-aminovajsav (GABA), a glicin és a taurin is. A fejlődéssel az axonhálózat jellemzően növekszik, majd a kémiai szinapszisok kialakulását követően megjelennek a szinkronizált kisülés csomagok, „burst”-ök, amik az összetett hálózat kialakulásának ismertetői (Luhmann és mtsai., 2016; Köhidi és mtsai., 2017).

A neocortexben már a születés utáni első napokban hálózati aktivitás figyelhető meg. A sejtekben ilyenkor már ioncsatornák expresszálódnak, mint például az AMPA és az NMDA receptor³. Ezek segítséget nyújtanak a különböző aktivitási mintázatok vizsgálatában, a korán megjelenő glutamaterg „korai kérgi hálózati oszcilláció” (*cortical early network oscillations*) például NMDA és AMPA receptor antagonistákkal blokkolható. Ezek az oszcillációk spontán kalcium hullámok, melyek körülbelül két percenként jelentkeznek, és lassan, 2 mm/s sebességgel terjednek szét a kéregben a hátsó agykéreg irányából. Egy másik spontán, a hippocampusra is jellemző aktivitási mintázat az úgynevezett „kérgei óriás depolarizáló potenciál” (*cortical giant depolarizing potentials*). Ez a hullám sűrűbben jelentkezik és gyorsabb kinetikájú és jellemző rá a GABA által közvetített depolarizáció⁴. A fejlődés későbbi szakaszában „lassú aktivitású tranziensek” (*slow activity transients*) a jellemzőek, amik hosszú ideig (akár 10 másodpercig is) tartanak, és spontán gyors oszcillációkból (15-30 Hz) tevődnek össze. Az újszülött rágsálók kérgében jellemzőek a lokális, 10-30 másodpercenként ismétlődő körülbelül 100-300 ms-ig tartó, 30-40 Hz-es gamma-oszcillációk is, valamint a vizuális és a

³ AMPA és az NMDA ionotróp glutamát receptor aktivátorok.

⁴ A klasszikusan gátló neurotranszmitter, a GABA, a fejlődő idegsejtekben a megváltozott klorid egyensúly miatt depolarizációt vált ki (Jelitai and Madarasz, 2005; Spitzer, 2010).

szomatoszenzoros kérgi területeken megjelenő 0,5-3 másodpercig tartó lokális, rövid oszcillációk, az úgynevezett „*spindle bursts*”-ök (Luhmann és *mtsai.*, 2016).

Az irodalmi adatok alapján felvetül a kérdés, hogy ezek a fejlődés során jelen lévő aktivitási mintázatok mennyiben befolyásolják a kialakuló idegsejt fenotípusát, és létrehozható-e olyan modellrendszer, amivel a depolarizációs mintázatok és ezzel az idegsejtek alakulását külsőleg tudjuk irányítani.

2.2. Idegsejtfejlődés vizsgálata *in vitro* modellrendszerben

Az idegsejtképzés tanulmányozásában előnyt jelent, ha jól kontrollált körülmények között végezhetjük kísérleteinket. Ideális választás olyan *in vitro* rendszer, ahol idegi őssejtekből valamilyen kémiai indukció hatására neuronokat képzünk. Az ilyen sejtrendszerek nagy mennyiségben képesek adott fenotípusú neuronok előállítására, így a befolyásoló tényezők hatása könnyebben kiolvasható (Schlett és Madarász, 1997).

Az NE-4C egy jól definiált, p53 deficiens⁵, kilenc napos egér embrió előagyhólyagjából származó epiteliális karaktert mutató neuroepiteliális őssejtvonal. Előállítása egy többlépéses folyamatban, klónozással történt, hogy a sejtvonal egysejt eredete biztosítva legyen (Schlett és Madarász, 1997). Az NE-4C sejtek idegi irányba elkötelezettek. Megfelelő körülmények között folyamatosan osztódnak, és a vonal több mint száz átültetésen, passzázsokon keresztül is fenntartható. *All-transz* retinsav (atRA) segítségével (1-2 napos kezeléssel) a tenyészetekben jól reprodukálható neuronképzés (és gliaképzés) indukálható (Schlett és Madarász, 1997).

A retinsav, egy A vitamin származék, retinaldehid dehidrogenáz enzimek segítségével közvetlenül retinaldehiddből keletkezik, és erős morfogén hatású. Lipidoldékony molekula, a plazmamembránon átjutva, intracelluláris receptoraival összekapcsolódva génexpresszió szabályozására képes. Jelen van többek között az embrionális és felnőtt agyban is, és széles körben használt különböző őssejtpopulációk *in vitro* differenciáltatására (Schlett és Madarász, 1997). Retinsav kezelés nélkül az NE-4C sejtek megtartják őssejt jellegüket, neuronképzés nem indul ezekben a tenyészetekben (Tárnok és *mtsai.*, 2002; Orsolits és *mtsai.*, 2013).

Az NE-4C tenyészetekben fejlődő neuronok jól meghatározott és jellemzett lépéseken mennek keresztül. A retinsav indukciót megelőzően az epitél morfológiájú sejtekben kimutatható a nestin intermedier filamentum, ami a neurális progenitorokra jellemző. Az egy sejtrétegű, epitél morfológiát mutató, nyúlvány nélküli sejtek az atRA kezelés hatására az első

⁵ A p53 egy tumorszupresszor fehérje, fontos szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában. Hiánya immortalizációt segít elő, a sejteket folyamatos osztódásra készíti, ám nem gátolja meg az idegi differenciálódást.

napokban aggregátumokat hoznak létre, a sejtszám nő. Ezekben a tenyészetekben az atRA hatására erősödnek a sejt-sejt adhéziós kölcsönhatások (Schlett és *mtsai.*, 2000), és a sejtek közötti kapcsolatok kialakítása szükséges hozzá, hogy a sejtek később neuron és asztrocita tenyészetekké fejlődjenek (Tárnok és *mtsai.*, 2002). A denz, magas sejtszámú tenyészetekben ilyenkor jellemző a sejtpusztulás. Az aggregátumokban egy-két nappal az indukciót követően megjelennek az RC2 pozitív, radiális glia szerű sejtek, de jelen vannak a nestin pozitív progenitor jellegű sejtek is.

A indukció harmadik-negyedik napjától a III β -tubulin pozitív idegsejtek is megjelennek az aggregátumokban, és pár nap alatt a sejtek akár 40-50 százaléka is ilyen tulajdonságokat mutathat (Schlett és Madarász, 1997; Schlett és *mtsai.*, 2000; Tárnok és *mtsai.*, 2002). Kimutatták, hogy a retinsav kezelést követő 6. npra a sejtek maguk is képesek bioaktív retinoidok termelésére (Orsolits és *mtsai.*, 2013). Ezt követően az idegsejtek száma eleinte gyorsan növekszik, egyre inkább elágazó, összetett idegi nyúlványhálózat alakul ki (Schlett és Madarász, 1997), a sejtek között réskapcsolatok alakulnak ki (Tárnok és *mtsai.*, 2002). Az idegsejtek sokszor a felszínnel kapcsolatban álló bazális sejtréteg tetején figyelhetőek meg. Fejlődésükkel párhuzamosan, körülbelül az indukciót követő hetedik npra csökken az újonnan kialakuló idegsejtek száma. A sejtproliferáció sebessége a sejtsűrűség növekedésével folyamatosan csökken és cytosine-arabino-furanoside (CAR) kezeléssel leállítható (Schlett és Madarász, 1997). A retinsav kezelést követő 9.-10. npra az idegsejtekben kimutatható a synapsin és synaptophysin expresszió és kialakulnak a neurotranszmitterek termeléséhez és felszabadításához szükséges apparátusok (Orsolits és *mtsai.*, 2013). A sejtekben ilyenkor még a GABA is kiválthat depolarizációt, érésükkel pedig megjelennek bennük az NMDA receptorok (Jelítai és Madarász, 2005).

A gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) pozitív gliasejtek a neuronokhoz képest késve, csupán a differenciáltatás 9. napjától jelennek meg a tenyészetekben. A tenyésztésben ilyenkor a neurogenesis már csökkenő mértékű. Az asztrocitákkal kapcsolatban is elmondható, csak úgy, mint a neuronok esetében, retinsav kezelés hiányában nem jelennek meg az NE-4C tenyészetekben. A gliák késleltetett megjelenése az idegsejtekhez képest jellemzője az idegrendszer fejlődésének (Orsolits és *mtsai.*, 2013). Mindezek mellett a nem definiált fenotípusú, epitél morfológiájú sejtek a tenyésztés teljes időtartama alatt jelen vannak a tenyészetekben (Tárnok és *mtsai.*, 2002).

A részletesen leírt és jól reprodukálható neuronképzési folyamat miatt az NE-4C neuroepitélialis össejtek jó modellrendszert biztosíthatnak a depolarizációs események vizsgálatára.

2.3. Depolarizációs mintázatok kialakítása optogenetika segítségével

A környezet, jelen esetben a depolarizációs események hatásainak elemzéséhez jó lehetőséget az optogenetikával vezérelhető, összejt alapú, fejlődő neuronhálózatot mimikáló modellrendszerek kialakítása. A neuron progenitorokba és fejlődő idegsejtekbe juttatott fényérzékeny ioncsatornák segítségével ugyanis lehetőségünk van a sejteket érő bemeneteket nem invazív módon, időben és térben pontosan szabályozni (Lee és *mtsai.*, 2019; Giraldo és *mtsai.*, 2021). Ezen technika segítségével irányíthatóak bizonyos neuronpopulációk *in vitro* tenyészetekben, például az optogenetikailag módosított primer neuronok tüzelést mutatnak optikai stimuláció hatására, de az optogenetika használható állatok agyszövetének *in vivo* kontrollálására is (Lee és *mtsai.*, 2019). Mindehhez szükség van valamilyen fényérzékeny fehérjére, mely membránde polarizáció kialakítására képes. A csatornákon keresztüli ionbeáramlás ugyanakkor hatással lehet bizonyos jelátviteli útvonalakra, és ezzel befolyásolható a proliferáció, differenciáció vagy akár a sejthalál is (Giraldo és *mtsai.*, 2021).

A zöldalgából származó, 7 transzmembrán doménből álló csatornarodopszin-2 (ChR2) kationcsatornában 470nm-es kék fény hatására konformáció változás következik be, ami lehetővé teszi a H^+ , Na^+ , K^+ és Ca^{2+} ionok átjutását a sejtmembránon, az elektrokémiai grádiensnek megfelelően, így a csatornát expresszáló neuronok membránjában a kék fény gyors depolarizációt okoz. Amennyiben a neuronokban a depolarizáció meghaladja a küszöbértéket, a sejtek akciós potenciállal válaszolhatnak. A fehérje jól használható szív és vázizomsejtek aktivációjára, feszültségfüggő ioncsatornák működésének vizsgálatához, továbbá az idegtudományban is egyre szélesebb körben használt optogenetikai módszerek egyik legfontosabb eszközévé vált. Ideális esetben a fény által közvetített depolarizáció azonnal detektálható, ám ez nagyban függ az adott sejt membrán tulajdonságaitól, mint például a membrán ellenállástól. Az egyre szélesebb körben elterjedt és egyre többféle sejtben folyó kísérletek miatt a csatornarodopszinok egyre több variánsát fejlesztik ki a biotechnológusok, hogy egy adott kísérlethez a csatorna biofizikai tulajdonságai minél inkább megfeleljenek. Az általam használt ChR2/H134R variáns kis mértékben fényérzékenyebb ($\sim 1,07 \text{ mW/mm}^2$) mint a ChR2, a csatorna záródása pedig kissé lassabb ($\sim 17,9 \text{ ms}$) (Lin, 2011; Habibey és *mtsai.*, 2020).

3. Célkitűzések

Az általunk használt *in vitro* modellrendszerben az NE-4C őssejtekből differenciáltatott neuronok napokon keresztül fejlődnek. Ez a folyamat párhuzamba állítható az egyedfejlődés során a neuronok kialakulásával, de a sejtenyészetekben hiányoznak olyan ciklusosan jelentkező fizikai és kémiai hatások, amelyek a fejlődő idegrendszerben jelen vannak. A csatornarodopszint kifejező, fejlődő idegsejtek megvilágítása a fejlődő idegrendszerben létrejövő stimulációs mintázatokhoz hasonló depolarizációs tréningezéssel felveti a lehetőséget, hogy ezekben a neuronokban célzottan lehessen a sejt differenciációt elősegíteni. A definiált mintázatú, tartósan alkalmazott fényfelvillanásokkal a neuronokban a fejlődő idegrendszerben létrejövő spontán aktivitáshoz hasonló depolarizációt és tüzelést válthatunk ki.

TDK munkám célja volt, hogy összehasonlítsam a különböző, hosszan tartó megvilágítási mintázatokkal kiváltott depolarizációs változások hatását éretlen, csatornarodopszin 2-t (ChR2) expresszáló egér neurális őssejtekből indukált neuronokon (NE-4C sejtek).

Ehhez célul tűztem ki:

1. Az egér neuroektodermális őssejtek tenyésztésének optimalizálását
2. Az optogenetikai tréningezés előfeltételeinek vizsgálatát (megfelelő transzfekciós hatékonyság beállítása, fototoxicitás ellenőrzése)
3. A különböző optogenetikai mintázatokkal tréningezett idegsejtek elektrofiziológiai tulajdonságainak leírását, esetleges molekuláris különbségek feltérképezését

4. Anyag és módszer

4.1. Sejtenyésztés/sejtkultúrák

Az NE-4C sejteket⁶ minimum essential medium (MEM) tápfolyadékban (kiegészítve 5% FCS-el, 4mM glutaminnal (Sigma), 40µg/ml gentamicinel (Sanofi) és 2,5µg/ml amphotericinB-vel (Sigma)) poli-L-lizinnel (Sigma) felszínkezelte 90 mm-es Petri csészékben neveltem, szemikonfluens, maximum 80-90 százalékos sejtsűrűség fenntartása mellett. A sejtek átültetésekor (passzálás), PBS-es mosást követően, a sejteket 2,5 mg/mL-es tripszin-PBS oldattal rövid ideig (<1 perc) kezeltem, majd a sejteket learattam és $2-3 \times 10^5$ sejtsűrűségben új Petri csészére szélesztettem. A sejtvonalat minden alkalommal, ha a sejtsűrűség elérte a szemikonfluens állapotot, újból passzáltam.

A kísérletek során a sejteket $2,5 \times 10^4$ sejt/cm² sejtsűrűségben oxigén plazmával kezelt, poli-L-lizinnel (Sigma) és Geltrex-szel (Thermo) bevont boroszilikát üveg fedőlemezekre (0,17mm vastagság, 12 mm átmérő, VWR) ültettem ki. A fedőlemezeket 24 lyukú szövettényesztőtálca (transzfekciós hatékonyság vizsgálatok, Greiner) vagy 4 lyukú plate (optogenetikai vizsgálatok, Nunc) lukjaiban tartottam. Az idegi differenciáció elindításához *differenciációs médiumot* használtam: Neurobasal Plus (Thermo), 2% B27⁺(Thermo), 2mM GlutaMax (Thermo), 1% CultureOne Supplement (Thermo), 200 µM aszkorbinsav (Sigma), 40µg/ml gentamicin (Sanofi) és 2,5µg/ml amphotericinB (Sigma). Az idegi elköteleződést 48 órás, 10^{-6} M-os *all-transz* retinsavas (atRA) kezeléssel indukáltam. 48 óra elteltével a sejteken a tápot retinsav-mentes *differenciációs médiumra* cseréltem, majd az ötödik, hetedik és kilencedik napokon feles tápcserét végeztem *fenntartó médiummal*: BrainPhys (StemCell), 2% SM1 (StemCell), 40µg/ml gentamicin (Sanofi), 2,5µg/ml amphotericinB (Sigma). Minden sejtenyészetet 37°C-os hőmérsékleten, 5%-os CO₂ koncentráció mellett tartottam a szövettényesztő inkubátorban.

4.2. Transzfekció és optogenetika

A transzfekció beállításához a zöld fluoreszcens fehérjét kódoló pEGFP-C1 plazmidot minden esetben 0,5 µg DNS/lemez mennyiségben az első táblázatban összefoglalt transzfekciós reagensekkel, különböző arányokban használtam, a gyártó útmutatója alapján (**1. táblázat**). A transzfekciós reagens alkalmazását követően a sejtek tápfolyadékát új tápfolyadékra cseréltem. 24 óra poszttranszfekciós időt követően a tenyészeteket 4% paraformaldehid tartalmú PBS

⁶ ATCC: <https://www.lgcstandards-atcc.org/en/Products/All/CRL-2925.aspx>

oldattal fixáltam, majd az üveglemezeket DAPI tartalmú Mowiolal fedtem. A tenyészetekről Zeiss Z1 fluorescens mikroszkóppal Zen szoftver (Zeiss) segítségével többlátóteres (ún. tiles), többcsatornás (DAPI, GFP) felvételeket készítettem. A fényképek elemzéséhez az ImageJ szoftvert használtam. E során a sejtmagok területét a többcsatornás kép DAPI csatornáján a gépi tanulás alkalmazó StarDist plugin segítségével kijelöltem (a képet szegmentáltam), majd az EGFP-csatornán, a sejtmagok területéről fluoreszcencia intenzitásértékeket vettem fel. A folyamatot nem-transzfectált testvértenyészeteken is elvégeztem. A testvértenyészetek adatait küszöbként használtam, az ennél intenzívebb fluoreszcens GFP jelet pozitívként értékeltem. Így meghatároztam az egyes felvételeken a transzfectált sejtek százalékát: küszöb feletti EGFP intenzitású sejtek száma/DAPI⁺ sejtek száma.

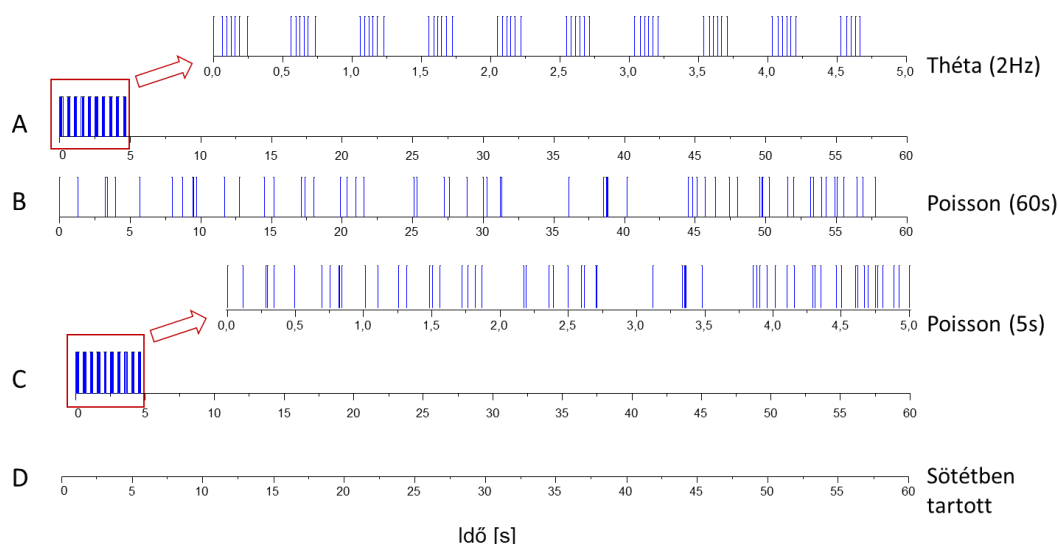
A csatornarodopszin-2 fehérje kifejeztetéséhez a sejtek transzfectálását az idegi differenciáció hatodik napján 0,5 µg DNS/lemez mennyiségű pcDNA3.1-ChR2-H134R-YFP plazmid konstrukcióval (DeisserothLab, Stanford, USA) végeztem. A ChR2 transzfectió esetében a tenyészetben a sárga fluoreszcens fehérje (YFP) jelölés tette lehetővé a valóban transzfectált sejtek mikroszkópos vizsgálatát. A transzfectáláshoz 1 lemezre 0,75 µl Lipofectamine3000 transzfectációs reagenst (Thermo) használtam, a gyártó útmutatása alapján. A sejteken a tápot 4 mM glutaminnal kiegészített (FCS mentes) MEM-re cseréltem, majd hozzáadtam az OptiMEM tápfolyadékot (Thermo) összemért Lipofectamine3000-et és a DNS-t. A sejteket 37°C-on 5% CO₂ koncentráció mellett négy órán keresztül inkubáltam, majd a tápot az eredeti *fenntartó mediumra* cseréltem vissza.

Transzfekció módja	Lipofekció					Magnetofekció			
Transzfekciós reagens	Lipofectamine 2000 (ThermoFisher)	Lipofectamine 3000 (ThermoFisher)		Lipofectamine Stem (ThermoFisher)		Neuromag (OZBiosciences)			
Transzfekciós reagens mennyisége (ul)	1	0,75	1,5	1	2	1	2	3	3,5

1. táblázat Az optimális transzfectió beállításához használt transzfectációs reagentek és mennyiségük

A sejtek optogenetikai tréningezését 24 órával a transzfectiót követően kezdtem el. Ehhez a labor saját fejlesztésű, szövettenyésztő inkubátorba helyezhető iFlash, optogenetikai megvilágító készülékét használtam. Az iFlash eszköz szemiautonóm módon képes 480nm-es hullámhosszúságú fénnel megvilágítási mintázatokat kiadni. A kísérletek során három féle optogenetikai mintázatot használtam fel, amikkel 48 órán keresztül tréningeztem a sejteket. Az első mintázat egy 5 másodpercig tartó, percenként ismétlődő 20Hz-es *théta oszcilláció* volt (**1.A**

ábra), a második *egy percen keresztül tartó Poisson eloszlást* mutató **(1.B ábra)**. Később a tenyészeteket egy olyan mintázattal is megvilágítottuk, melyben egy *5 másodpercig tartó Poisson eloszlású mintázatot* percenként ismételtünk **(1.C ábra)**. A megvilágítási impulzusok szélessége 2 ms volt. Minden kísérlet során egy párhozamos üveglemezt ChR2 transzfekciót sötétben tartottam kontroll gyanánt **(1.D ábra)**.



2. ábra A kísérletek során használt megvilágítási mintázatok. Részletek a szövegben

4.3. RT-qPCR

Az üveg fedőlemezeken tenyésztett sejtekről az RNS mintákat a Quick-RNA Miniprep Kit segítségével izoláltam (Zymo Research), a gyártó által ajánlott protokoll szerint. A lyukakról a tápoldatot leszívtam, majd kétszer PBS-el mostam a sejteket, ezután 300 µl lízis puffert adtam hozzá. A DNS eltávolítására és az RNS minták izolálására a gyártó által biztosított gyanta oszlopokat használtam. A mintákból származó RNS-t RNáz mentes vízben eluáltam, majd további felhasználásig -80°C-on tároltam.

A qPCR mérésekben az előzetes elektrofiziológiai mérések alapján az egér inward rektifikáló kálium csatorna (Kir) 2.1, 2.2, 2.3 és 2.4 jelenlétére kerestem bizonyítékot. Az RNS mintákból, 0,5 µg totál RNS-t cDNS-sé írtam át Maxima H Minus Frist Stand cDNA Synthesis kit with dsDNase (ThermoScientific, K1681) segítségével, majd a qRT-PCR mérésekhez a Maxima SYBR Green qPCR Master Mix-et (ThermoScientific, K0251) használtam. A méréshez felhasznált primereket az **2. táblázatban** foglaltam össze.

A liofilizált primereket RNáz mentes vízben oldottam be, 100 μ M törzsoldatot készítettem. A PCR plate 1 lyukába a következő mennyiségeket mértem össze (12 μ l össztérfogatban): 6 μ l MasterMix, 0,36 μ l forward primer, 0,36 μ l reverse primer, 2 μ l cDNS minta (1:5 hígításban), RNáz mentes vízzel kiegészítve. A PCR programot a gyártó ajánlása alapján a **3. táblázat**ban összefoglaltak alapján állítottam be. A 2.-5. lépéseket a gép negyvenszer ismételte. A PCR adatok kiértékelését a Bio-Rad CFX Manager 3.1 programmal (Bio-Rad, Inc., USA) végeztem. A relatív expressziós változásokat $\Delta\Delta C_q$ módszerrel számítottam ki.

csatorna			A csatorna molekulatömege
Kir 2.1	forward	5' CTTCTGTCTTGCCTTCGTGC 3'	112bp
	reverse	5' TGTTGACCTCTGACACGCAT 3'	
Kir 2.2	forward	5' TTCAGCCATAATGCCGTGGT 3'	199bp
	reverse	5' TACGGTCTAGGCCCTTGTC 3'	
Kir 2.3	forward	5' GCCTCCTCTTCTGGTGCATT 3'	110bp
	reverse	5' TACAGGGTTTGGGGGCATTC 3'	
Kir 2.4	forward	5' AGCCATGACTACACAGTGCC 3'	127bp
	reverse	5' TGTTTCGATGGAAGTGGCGAT 3'	
GAPDH	forward	5' TGGTGAAGGTCGGTGTGA 3'	154bp
	reverse	5' ATGAAGGGGTCGTTGATGGC 3'	

2. táblázat A qPCR mérés során használt primerek

A minták tisztaságának ellenőrzésére a PCR reakciót követően melting curve analízist és gélelektroforézis vizsgálatot végeztem, amihez a mintákat 1,5%-os agaróz gélen 80V-on, 15 μ L/minta térfogattal futattam (nincs bemutatva).

Lépés	Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)
1.	95	10:00
2.	95	00:15
3.	55	00:30
4.	72	00:30
5.	plate leolvasása	
6.	72	10:00
7.	65	00:05
8.	95	00:05

3. táblázat A PCR program lefutásának összefoglalása

4.4. Immunfestés, mikroszkópia

A tenyészetek fixálásához 4% paraformaldehid tartalmú PBS oldatot használtam, 20 percen keresztül, PBS-sel történő mosást követően a membránokat 0,1%-os TritonX100 tartalmú PBS oldattal 5 percig permeabilizáltam. A tenyészeteket PBS-el mostam, majd az

aspecifikus fehérjekötő helyeket 2% BSA és 0,1% NaN_3 tartalmú PBS oldattal szobahőmérsékleten, 1 óráig blokkoltam. Blokkolás után a mintákat az elsődleges ellenanyagban 4°C-on, egy éjszakán át inkubáltam. Kísérleteim során a következő ellenanyagokat használtam: anti-NeuN (1:1000, egér, Chemicon, MAB377), anti-III β -tubulin (1:1000, egér, Exbio, Lot.: 512498). PBS mosást követően, a sejteket 1 órán át szobahőmérsékleten (sötétben) másodlagos ellenanyagokkal inkubáltam. Másodlagos ellenanyagként a következőket használtam: anti-egér AlexaFluor488 (1:500, kecskében termeltetett, LifeTechnologies, A10684), anti-nyúl AlexaFluor546 (1:500, kecskében termeltetett, LifeTechnologies A11010). A másodlagos ellenanyagokat a blokkoló oldatban oldottam be. PBS mosást követően, a tenyészeteket DAPI tartalmú Mowiolal fedtem. A mikroszkópos felvételek készítéséhez Colibri LED-es megvilágító rendszerrel felszerelt Zeiss AxioObserver Z1 mikroszkópot (Neofluar 20x/0,4 NA, α -PlanApochromat 63x/1,4 NA objektívekkel) és Zen szoftvert (Zeiss) használtam.

4.5. Elektrofiziológiai mérések

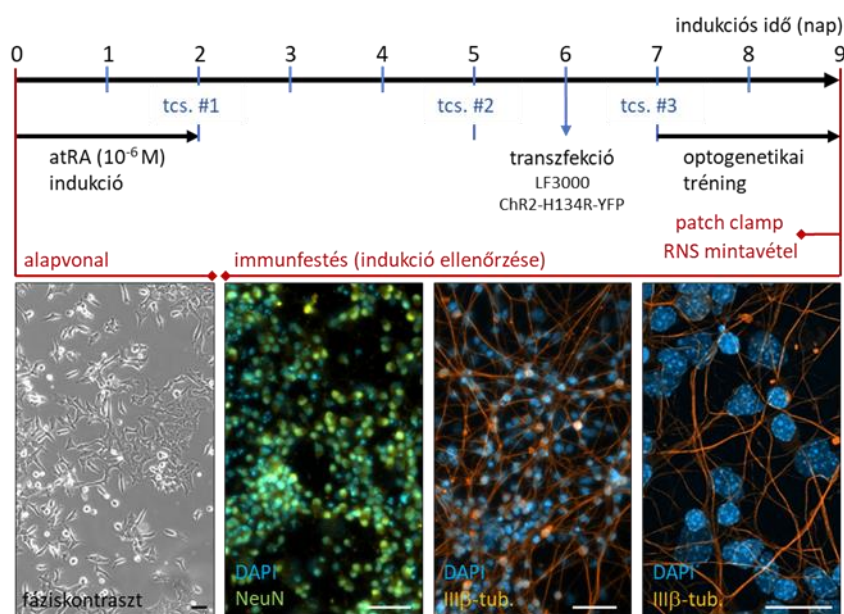
Az elektrofiziológiai mérésekhez a tenyészeteket én állítottam elő, a mérések során jelen voltam, de a teljes sejt patch clamp mérések során a sejtek megfogását, majd ezen adatok elemzését Dr. Szűcs Attila végezte. A mérésekhez egy Zeiss Axiovert 200 mikroszkópot, MultiClamp 700B erősítőt (Molecular Devices) és MP-225 manipulátort (Sutter Instrument) használtunk. A patch pipettákat saját magunk állítottuk elő, majd ezeket intracelluláris oldattal (100 mM K-glukonát, 10 mM KCl, 20 mM KOH, 2 mM MgCl_2 , 2 mM NaCl, 10 mM HEPES, 0,2 mM EGTA, 5 mM D-glükóz) töltöttük fel. Egyes sejtekben az intracelluláris oldatot 1 mM biocitinnel egészítettük ki, hogy a vizsgált sejtek később immuncitokémiai módszerekkel is vizsgálhatóak legyenek. Az üveglemezeken a mérések idejére a tápfolyadékot mesterséges agygerincvelő folyadékra, ACSF-re (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, 10 mM D-glükóz) cserétük, a tenyészeteket a mérés után 4% paraformaldehid tartalmú PBS-el fixáltuk. Az elektrofiziológiai adatok kiértékelését Szűcs Attila a NeuroExpress programmal végezte. A ChR2 ioncsatornát kifejező sejteket a méréshez YFP fluoreszcenciájuk alapján válogattuk ki. A mérések során csak ChR2 pozitív sejtek (megvilágított, sötétben tartott) elemzését végeztük el.

5. Eredmények

5.1. Az optogenetikai kísérletek beállítása

5.1. 1. A tenyésztési protokoll beállítása

Az NE-4C sejtek neuronális differenciációja jól jellemzett eseménysor (Schlett és Madarász, 1997). A korábbi publikációk alapján ennek eleme, hogy az *all-transz* retinsav (atRA) kezelést követően a sejtek átmenetileg nagyobb sejtegyütteseket, aggregátumokat hoznak létre (Tárnok és mtsai., 2002). Ezek a tenyésztés későbbi időszakában is fennmaradhatnak. Ahhoz, hogy a tervezett kísérletek, mint például az elektrofiziológiai mérések a neuronokon eredményesek lehessenek, első lépésként szükség volt egy olyan tenyésztési protokoll beállítására, melyben kiküszöböljük az aggregálódást, hogy a sejtek differenciációjuk végére ne klaszterekben, hanem egy-két sejtrétegben helyezkedjenek el. Ezt egy modern, a sejtek tulajdonságainak megfelelő, molekuláris mikrokörnyezetüket modellező tápfolyadék-rendszer használatával igyekeztem elérni.



3. ábra Felül a differenciációs protokoll. Az első felvételen az alapvonal fázisképe látható, a 2.-3. felvételen a 9. napon fixált tenyészetekből készített immunfestések mikroszkópos felvételei. A mérce minden esetben 50 μ m-t jelöl. tcs: tápfolyadék csere.

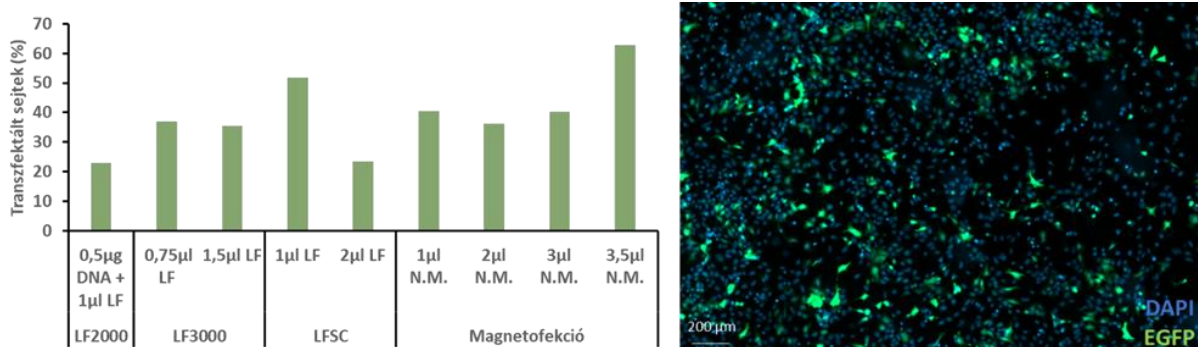
A folyamat során az NE-4C sejteket poli-L-lizin/Geltrex-szel bevont üveg fedőlemezekre *differenciációs tápfolyadékban* (Neurobasal+, 2% B27+, 1% CultureOne, 2mM Glutamax, 200 μ M aszkorbinsav, 2,5 μ g/mL AmphotericinB, 40 μ g/mL gentamicin) 25.000 sejt/cm² sejtsűrűségben ültették ki. Az idegi irányú differenciációt 10⁻⁶M-os *all-transz* retinsav (atRA) kezeléssel váltottuk ki. A tenyészetben a tápfolyadékot 2-3 naponta cseréltem, úgy, hogy

az indukció 5. napján *fenntartó tápfolyadékra* váltottam (BrainPhys, 2% SM1, 2,5µg/mL AmphotericinB, 40 µg/mL gentamicin). A tápfolyadékokban változó ionösszetétel segíti az idegsejtek membránpotenciáljának fejlődési életkor szerinti változását (az alapvonal -10-20mV, míg az idegsejtek -50-60mV nyugalmi membránpotenciállal rendelkeznek).

Fontos szempont volt, hogy magas legyen a tenyészetek neuronhozama is. A tenyésztés során az epitél morfológiát mutató alapvonal sejteket az atRA kezelést követő 8-9. napra felváltották a neuronszerű sejtek. Az idegi irányú elköteleződést a tenyészeteken a morfológiai megfigyelésen kívül immuncitokémiai módszerek segítségével is ellenőriztem. Ehhez a tenyészeteket a kilencedik napon fixáltam, majd NeuN neuronális markerrel, III-β-tubulin neuronális sejtvázmarkerrel immuncitokémiai módszerrel festettem (**3. ábra**). A sejtmagok jelöléséhez DAPI ellenanyagot használtam. Eredményeim igazolják, hogy az NE-4C sejtekben az idegi differenciáció megtörtént, mivel tenyészetekben nagyszámú NeuN és III-β-tubulin immunpozitív sejtet figyeltem meg (**3. ábra**).

5.1.2. A transzfekció beállítása

Az optogenetikai tréning végrehajtásához az NE-4C egér neuroektodermális őssejteket csatornarodopszin-2-t kifejező plazmid konstrukcióval (ChR2-H134R-YFP) kell transzfektálnunk. A kísérleteim során kritikus lépés volt, az idegsejtek nagy arányban fejezzék ki a csatornarodopszin-2 fehérjét, vagyis célom volt, hogy az egyes üveglemezeken minél több transzfektált sejt legyen, valamint, hogy a transzfektált sejtek megőrizték megfelelő morfológiai és fiziológiai állapotukat.



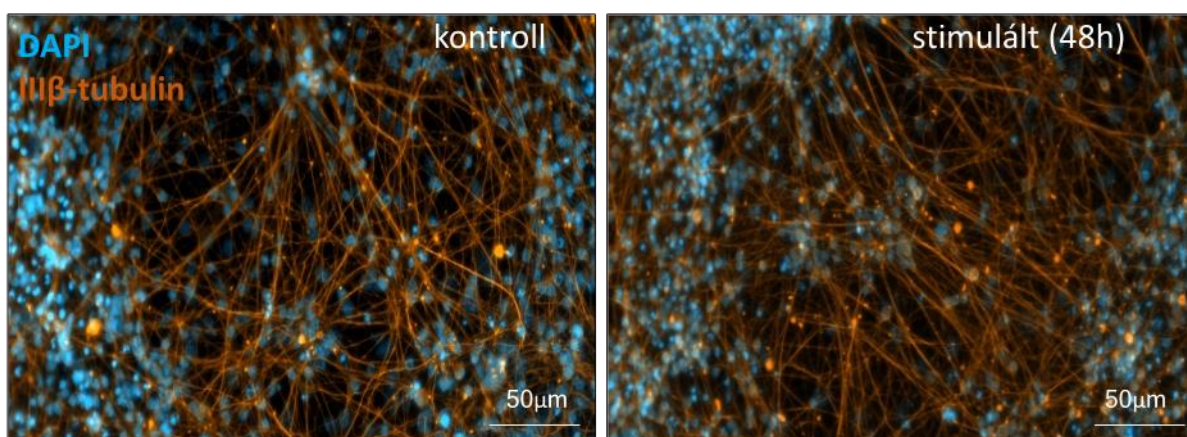
4. ábra A különböző transzfekciós reagenssekkel elért transzfekciós hatékonyság. Az EGFP+ sejtek (jobb oldali ábra, zöld) arányát határoztuk meg az DAPI+ sejtmagokhoz képest (jobb oldali ábra, kék).

A transzfekciós ráta beállításához az **1. táblázat**ban összefoglalt transzfekciós reagenszet és a jobb elemezhetőség miatt egy EGFP-t (0,5 µg) kifejező plazmid konstrukciót (pEGFP-C1) használtam. Mind liposzómaképző transzfekciós reagenszetet, mind pedig

mágneses nanopartikulumokat alkalmazó módszert kipróbáltam, ezen felül az alkalmazott DNS mennyiség:reagens arány változtatását is elvégeztem. 24 órával a transzfekciót követően a sejteket fixáltam, a tenyészeteket bis-benzimid tartalmú lefedőanyaggal lefedtem, így a sejtmagokat fluorescens DNS festéssel láthatóvá tettem. Az így előkészített mintákról fluoreszcens mikroszkópos felvételeket készítettem (**4. ábra, bal**), majd kvantitatív képelemzéssel meghatároztam a GFP expressziót mutató sejtek arányát (**4. ábra**, részletek az Anyag és módszer fejezetben). A megfelelő protokoll kiválasztásánál a magas transzfekciós hatékonyság mellett szempont volt a transzfekciós reagens minél alacsonyabb mennyisége, így további kísérletekben a Lipofectamine 3000 transzfekciós reagenst (0,75 μ L reagens/0,5 μ g DNS) alkalmaztuk.

5.1.3. Fototoxicitás ellenőrzése

A csatornarodopszin-2-t kifejező plazmid konstrukcióval (ChR2-H134R-YFP) az NE-4C sejteket az indukció 6. napján transzfektáltam (**3. ábra**). A konstrukció transzfekciós tulajdonságai az EGFP konstrukciónkhoz hasonlóak (nincs bemutatva). Az idegsejteket a szöveti fejlődés során érő depolarizációs mintázatok hatását *in vitro* rendszerünkben 480 nm hullámhosszúságú, 10mW LED intenzitású megvilágítási mintázatokkal szimuláljuk. Fontos azonban, hogy maga a megvilágítás ne okozzon sejtdegradációt a tenyészetekben. Sok esetben a LED világítás hőt termelhet, valamint előfordulhat, hogy a használt médium megvilágítása citotoxikus a sejtek számára. Kimutatták például, hogy a BrainPhys hosszas megvilágítása kék fénnel a H_2O_2 mennyiségének növekedésével járhat egyes tenyésztési protokollokban (Schmieder és mtsai., 2022).



5. ábra III- β -tubulin és DAPI festés a kontroll és a tréningezett 9. napon fixált tenyészetekről. (saját felvétel)

A tenyészet megvilágítást követő állapotának ellenőrzéséhez a differenciációt követő 7. napon (24 órás poszttranszfekciós idő, **3. ábra**) a tenyészeteket az iFlash készülékre helyeztem és 48 órán keresztül a *théta oszcillációs* megvilágítási mintázattal tréningeztem (lásd Anyag és

módszer). Kontrollként egy másik ugyanazon indukcióból származó üveglemezt zavartalanul, sötétben az inkubátorban tartottam. A tréningezés után mindkét üveglemezt fixáltam és immunfestést végeztem. Az idegsejtek nyúlványait III- β -tubulinnal, a sejtmagokat DAPI festéssel tettem láthatóvá, majd fluoreszcens mikroszkópia segítségével ellenőriztem a lemezeken a sejtek állapotát. A két lemez állapota között különbséget nem tapasztaltam (**5. ábra**), megállapítottam, hogy az optogenetikai stimuláció nem okozott jelentős nyúlványdegradációt és sejtpusztulást.

5.2. A depolarizációs mintázatok szelektíven megváltoztatják az érő idegsejtek tulajdonságait

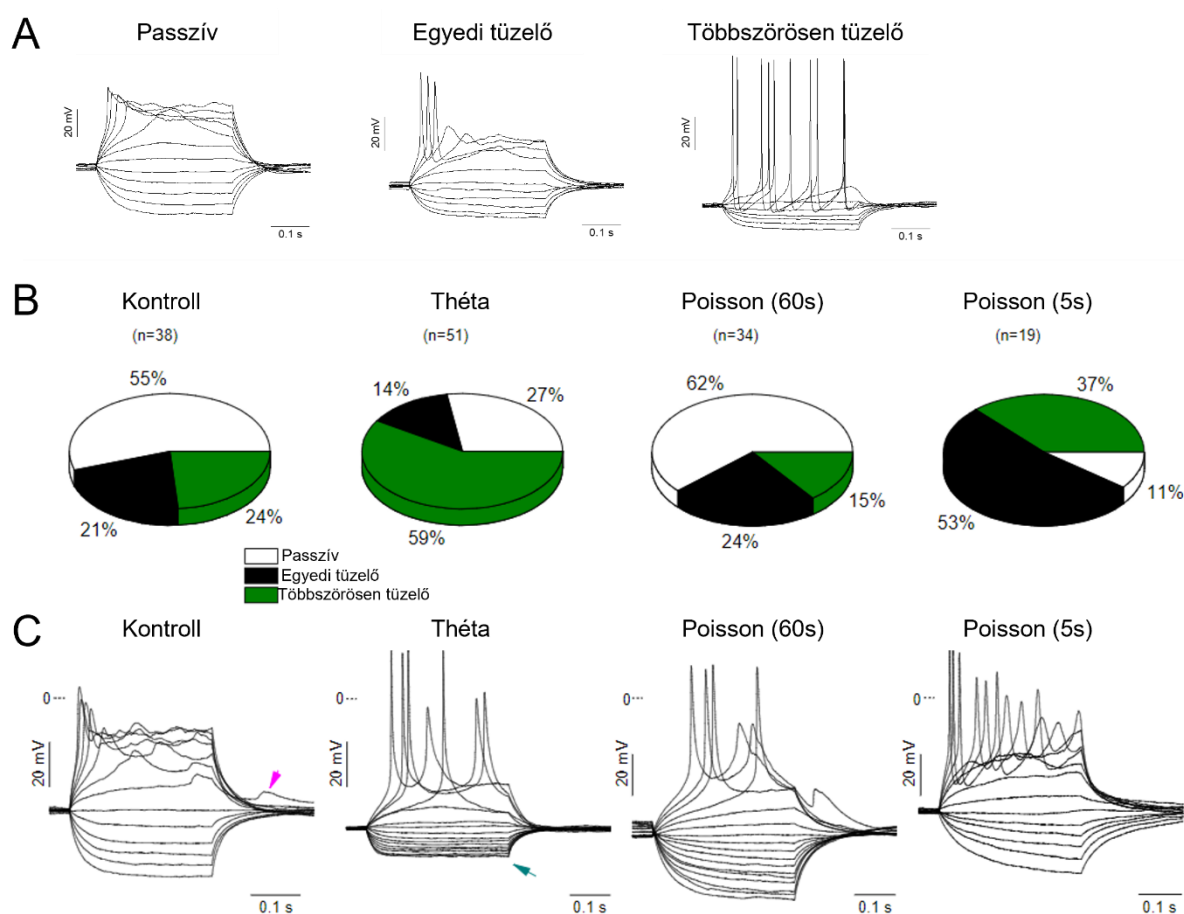
5.2.1. Elektrofiziológiai tulajdonságok megváltozása

A depolarizációs mintázatok idegi differenciációt befolyásoló hatásának elemzéséhez tenyészteimet a ChR2 fehérje kifejeződése után (24 órával a transzfekciót követően, DIV7, **3. ábra**) a 48 órán keresztül az iFlash illuminátor segítségével, különböző megvilágítási mintázatokkal (**2. ábra**) a szövettenyésztő inkubátorban megvilágítottam, „tréningeztem”. Kontrollként a párhuzamos tenyészeteket 48 óráig sötétben tartottam. A tréningezéshez 1 perces ismétlődésű, 5 másodperc hosszú 2 Hz-es *théta oszcillációt* (melyek a neuronokat az embrionális agyban érő mintázatokot modellezi) használtunk, valamint olyan *Poisson-eloszlású fényfelvillanás* sorrendet, ahol a *théta oszcilláció* fénymennyiségét az 1 perces időszakra osztottuk el. Harmadik megvilágításként 1 perces ismétlődésű, 5 másodpercig tartó *Poisson eloszlású* mintázatot alkalmaztam. Mindhárom megvilágítás esetén ugyanannyi kumulatív fényintenzitás érte a sejteket, csak azok időbeli mintázata különbözött.

Az elektrofiziológiai mérések során a négy féle kezelési csoportban csoportonként körülbelül 30-50 sejt analízisét végeztük el. E során a sejteket a ChR2 fehérjéhez kötött, sárga fluoreszcens fehérje (YFP) kifejeződésük alapján azonosítottuk, megszűrtük és elektrofiziológiai tulajdonságait current clamp üzemmódban whole-cell patch-clamp mérésben mértük. Az NE-4C sejtenyészetekben három féle tüzelési sajátosságot mutató sejtet különböztettünk meg: ezek a *passzív*, az *egyedi tüzelő* („*single spiking*”), azaz egyetlen akciós potenciált mutató és a többszörösen tüzelő („*firing*”), azaz folyamatosan tüzelő sejtek voltak (**6.A ábra**). Eredményeink azt mutatják, hogy a *théta oszcillációs tréning*, valamint az 5 másodpercig tartó *Poisson eloszlású tréning* hatására nőtt a tüzelő sejtek aránya a tenyészetekben (**6.B ábra**), és ezen mintázatok megváltoztatták a sejtek membrántulajdonságait is (**6.C ábra**). Nőtt az akciós potenciálok amplitúdója, a sejtek I-V görbéi érettebb neuronális alakot mutattak (**6.C ábra**), ezen felül az inward rektifikáló kálium áram (Kir) jelenlétét is

megfigyeltük a *théta* oszcillációval megvilágított a tenyészetekben (6.C ábra, zöld nyíl). A nem-megvilágított kontroll esetben a ChR2⁺ sejtek 5,9%-a mutatta a Kir jelenlétét, addig az oszcilláló stimulációt követően a transzfektált sejtek 13,2%-ánál találtuk meg a Kir-t.

A Poisson (60s) eloszlású mintázat esetén a sötétben tartott kontrollhoz hasonló értékeket kaptuk (Kir a sejtek 6,1%-ában volt jelen), jelezve, hogy nem a megvilágítás jelenléte, hanem annak mintázata a biológiai hatást kiváltó esemény. Ezzel szemben a Poisson eloszlású tréningezési mintázat nem változtatta meg jelentősen a tüzelési sajátságokat.



6. ábra Az elektrofiziológiai mérések eredményei. A: A tenyészetekben előforduló háromféle tüzelési sajátsággal rendelkező sejtek reprezentatív I-V görbéi. B: A Théta oszcillációs tréning hatására nőtt a tüzelő sejtek aránya a tenyészetekben. C: A Théta oszcillációval tréningezett kezelési csoportból mér egyik neuron reprezentatív áram-feszültség (I-V) görbéje. A zöld nyíl az inward rektifikáló K-áram jelenlétét jelzi. (Dr. Szűcs Attila által készített ábrák)

5.2.2. A depolarizációs mintázat befolyásolja a sejtek Kir csatorna expresszióját

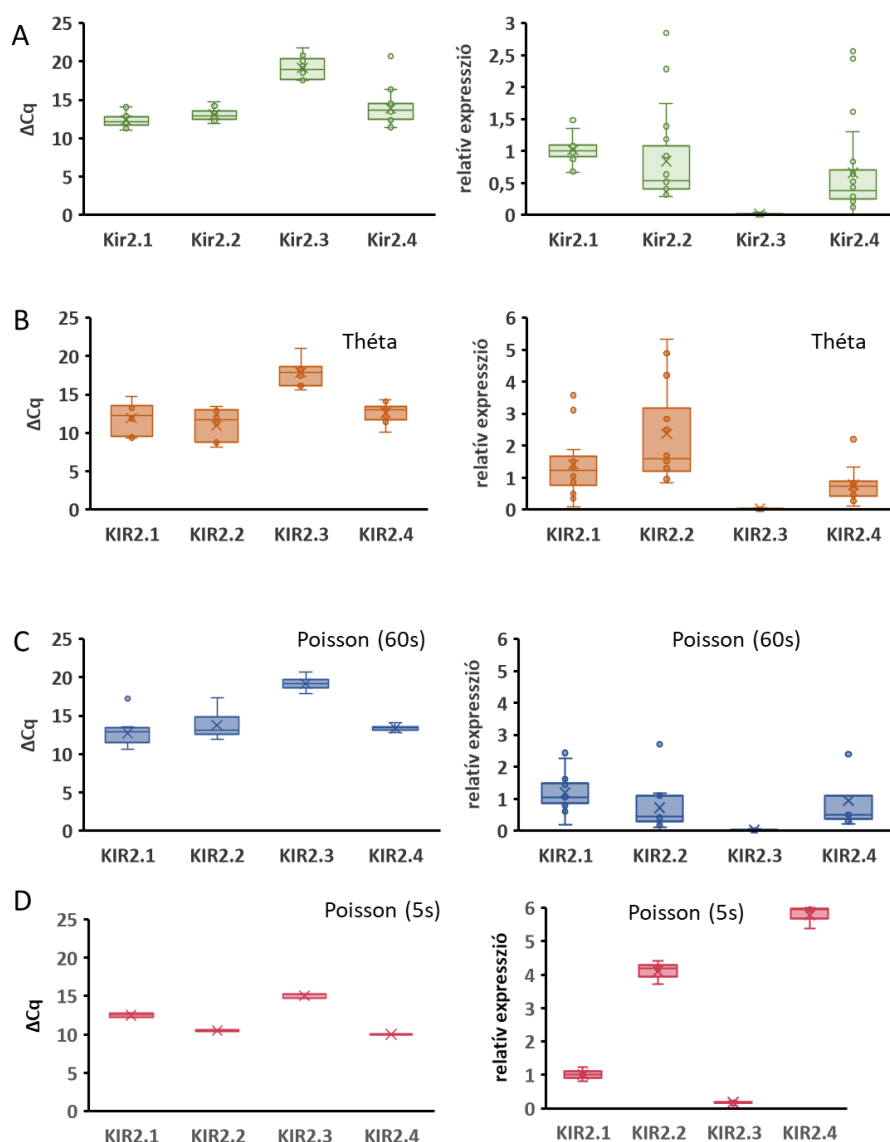
Az elektrofiziológiai mérések jelezték, hogy a depolarizációs tréningezés megváltoztatja a Kir áram előfordulását, így az áram kialakításáért felelős inward rektifikáló kálium csatorna az idegrendszerre jellemző, ún. klasszikus izoformáinak (Kir2.x) az expresszióját qPCR technika segítségével elemeztem. A négy vizsgált ioncsatorna izoforma (Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3, Kir2.4) kifejeződését először három különböző kezelési csoport (*sötét kontroll*, *théta oszcillációs* mintázattal megvilágított, *Poisson (60s)* mintázattal megvilágított sejtek, **2. ábra**) esetében vizsgáltam (**7. ábra**). Első lépésben a háztartási gén, GAPDH kontrollhoz viszonyítva határoztam meg az expresszióban megfigyelt késést (**7. ábra, ΔCq**). Ezután Kir2.1 csatornához viszonyítva vizsgáltam a másik három csatorna relatív expresszióját (**7. ábra, $\Delta\Delta Cq$**). Az eredményekből jól látszik, hogy a kontroll csoport esetén mind a Kir2.1, a Kir2.2 és a Kir2.4 izoforma expressziója kifejezett, azonban a Kir2.3 izoforma a PCR detekciós küszöbénél (40 ciklus) detektálható (**7.A ábra**), alapvetően nincs jelen a tenyészetekben. Az NE-4C eredetű neuronok Kir2.1, a Kir2.2 és a Kir2.4 izoformákat eltérő mértékben fejezik ki, a Kir2.2 és Kir2.4 csatornákból a sejtekben körülbelül 0,5-szeres mennyiség expresszálódik a Kir2.1 csatornához képest (**7.A ábra**).

Théta oszcillációval végzett depolarizációs tréningezés hatására mindhárom izoforma expressziója a sötétben tartott kontrollhoz viszonyítva megemelkedik (**8. ábra**), és egymáshoz viszonyított arányuk is eltolódik (**8.A ábra**). A Kir2.1 csatornához viszonyított relatív értékekből leolvasható, hogy a Kir2.2-es csatorna expressziója a Kir2.1 csatorna körülbelül két és félszerese, míg a Kir2.4 csatorna annak 0,8-szorosa (**8.A ábra**).

Ezzel szemben a *Poisson (60s)* mintázattal tréningezett tenyészetek esetén a csatornák nem megvilágított kontrollhoz képesti relatív expressziója nem változott jelentősen (**8.B ábra**). A *Poisson (60s)* mintázat a génexpressziós szintre sem volt hatással.

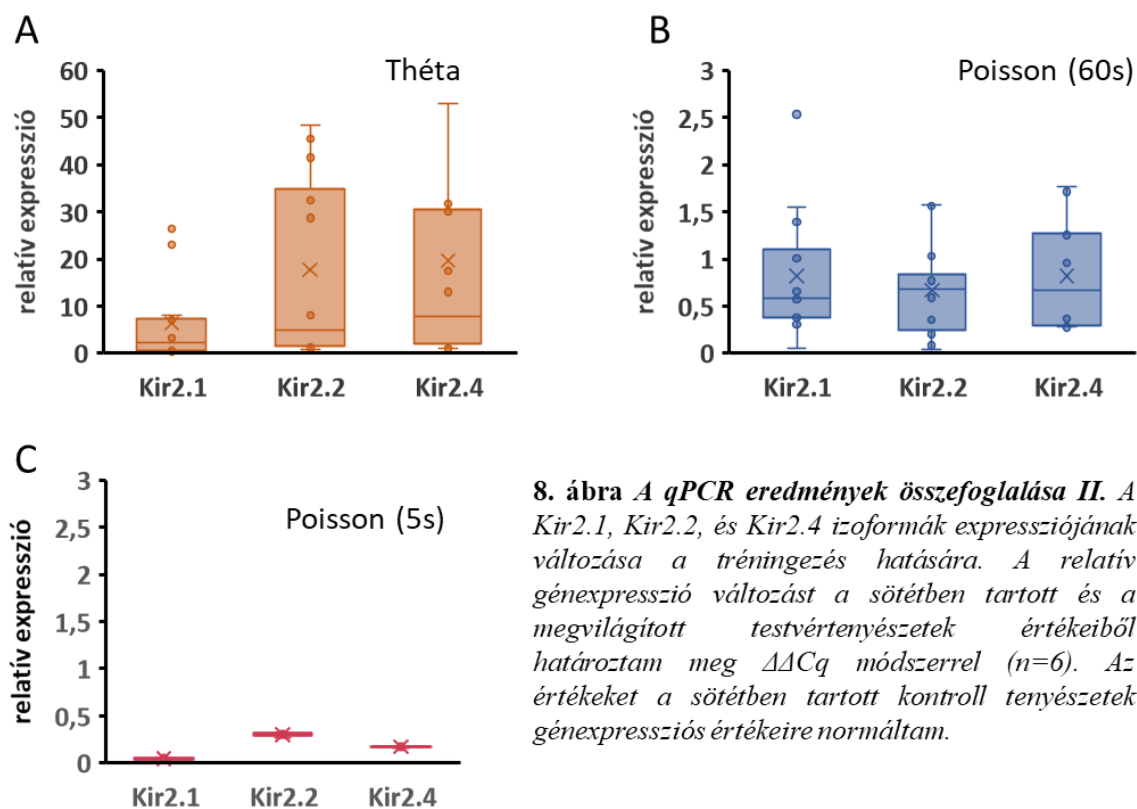
Annak érdekében, hogy lássuk, hogy maga a théta mintázat vagy annak perces ismétlése okozza-e a megfigyelt változásokat, a ChR2-t kifejező NE-4C tenyészeteket 48 órán keresztül olyan felvillanási mintázattal tréningeztünk, amelyben egy 5 másodpercig tartó Poisson mintázatot percenként ismételtünk: *Poisson (5s)* mintázat (**2.C ábra**). 48 óra elteltével, az előző kezelési csoportokhoz hasonlóan, RT-qPCR méréseket végeztünk mind a tréningezett és a kontroll lemezek esetén. Bár ezeknek az adatoknak a kiértékelése még folyamatban van, az elektrofiziológiai mérésekből úgy tűnt, hogy ennek a mintázatnak is a *théta oszcillációs* mintázathoz hasonló hatása van az idegsejtek tüzelési tulajdonságaira (**6.B,C ábra**). Kíváncsiak

voltunk, hogy a Kir2.x izoformák kifejeződése is követi-e az előbbieken megfigyelt trendet. Itt is meghatároztam a GAPDH kontrollhoz viszonyított expresszióban megfigyelt késést (7.D ábra, ΔCq), majd a Kir2.1 csatornához viszonyított másik három csatorna relatív expresszióját (7.D ábra, $\Delta\Delta Cq$). Ezekben a tenyészetekben is a Kir2.1, Kir2.2 és Kir2.4 izoformák expresszálódnak jelentősen, míg a Kir2.3 izoforma mennyisége elhanyagolható volt. Különbőség van azonban az izoformák egymáshoz viszonyított arányában. A Kir2.1 izoformához viszonyítva, ugyanis ebben a csoportban a Kir2.4 van jelen a legnagyobb mennyiségben, expressziója körülbelül hatszorosa a Kir2.1-nek (7.D ábra, $\Delta\Delta Cq$).



7. ábra A qPCR eredmények összefoglalása I. A négy Kir2.x izoforma expressziója sötét kontroll (A), θ oszcillációs (B) és 60s Poisson eloszlású (C) és 5s Poisson eloszlású megvilágítás esetén. Az adatokat a Kir2.1 csatorna expressziójára normalizáltam, és az izoformák egymáshoz képesti relatív kifejeződését mutattam be, melyet $\Delta\Delta Cq$ módszerrel határoztam meg (nem megvilágított $n=12$, tréningezett $n=6$).

A sötétben tartott kontrollhoz viszonyítva azonban érdekes megfigyelés, hogy bár az elektrofiziológiai eredmények összefüggést mutatnak a *théta* *oszcillációs* csoporttal, az első qPCR eredmények alapján, a fentiekkel ellentétben ebben a csoportban jelentősen csökkent a Kir2.x izoformák kifejeződése (**8.C ábra**).



8. ábra A qPCR eredmények összefoglalása II. A Kir2.1, Kir2.2, és Kir2.4 izoformák expressziójának változása a tréningezés hatására. A relatív génexpresszió változást a sötétben tartott és a megvilágított testvértényészetek értékeiből határoztam meg $\Delta\Delta Cq$ módszerrel ($n=6$). Az értékeket a sötétben tartott kontroll tenyészetek génexpressziós értékeire normáltam.

6. Diszkusszió

Homogén neuronpopulációt tartalmazó tenyészetek *in vitro* létrehozására és fenntartására, már sokféle széles körben használt protokoll létezik, azonban kevesebb a lehetőség a funkcióképes, élő idegrendszer heterogenitását és összetett működését leképző modellek kialakítására. Az optogenetikai stimuláció már számos esetben hasznosnak bizonyult valamilyen neurális őssejtől származó idegsejt egyes tulajdonságainak megváltoztatásában, jelátviteli útvonalak módosításában. Az optogenetika alkalmazása az őssejt-kutatásban is egyre elterjedtebb módszer, mivel az őssejt-differenciáció irányítása lehetőséget adhat olyan sejtkészletek kialakítására, mellyel a sérült vagy öregedő szövetek esetleg helyreállíthatóak (Sokolik és *mtsai.*, 2015; Rosenbloom és *mtsai.*, 2020; Shams és Soheili, 2021).

Az optogenetikai kísérletekhez a fényérzékeny fehérjék, mint például a csatornarodopszin, a vizsgálni kívánt sejtekbe többféle módon is bejuttatható. Kifejleszhető olyan transzgén állatmodell, aminek neuronális őssejtjei, már eleve kifejeznek valamilyen fényérzékeny ioncsatornát (Habibey és *mtsai.*, 2020). Ha különböző őssejtvonalakkal dolgozunk, a legegyszerűbb a tenyésztési folyamat során valamilyen vektor segítségével bejuttatni a fényérzékeny fehérje DNS-ét az adott sejtekbe melyre többféle kidolgozott módszer és protokoll létezik. Elterjedt például humán pluripotens őssejtek esetében a virális transzfekció, ám ennek hátránya, hogy magas felszereltségű és biztonsági fokozatú labor szükséges hozzá. Szélesebb körben elérhető módszer plazmid konstrukció bejuttatása, vagyis a sejtvonalak transzfektálása, valamilyen liposzóma alapú transzfekciós reagenssel (például az Invitrogén által forgalmazott különböző Lipofectamine reagenssekkel), vagy egy új módszerrel a magnetofekcióval. Magnetofekció során a kívánt DNS konstrukciót mágneses nanorészecskékhez kötjük, majd egy erős mágnes segítségével juttatjuk az *in vitro* tenyészetekben, őssejtek vagy akár neuronok felszínére. Megfelelő plazmidkonstrukcióval nyomon követhetjük a csatornarodopszint kifejező sejteket, legegyszerűbben valamilyen fluoreszcens fehérje kifejeződésének követésével. Vizsgálataimban bár számos transzfekciós formát kipróbáltam, legnagyobb hatékonyságúnak a liposzóma alapú megközelítés bizonyult.

Az optogenetikai beavatkozás számos ponton módosíthatja a fejlődési folyamatokat. Optogenetikát alkalmazhatunk az őssejtek differenciálódásának elindítására, nyomon követésére. Tréningezéssel megzavarható a sejtciklus, módosulhatnak egyes szignálútvonalak, hatással lehet a proliferációra és befolyásolható a fejlődő sejt típusa, melyek terápiás felhasználásai is lehetnek (Wang és *mtsai.*, 2019; Wang, Du és Peng, 2019). Csatornarodopszint

kifejező egér embrionális őssejtek tenyészetén 48 órás kékfény stimuláció segítségével módosíthatóak a membrán tulajdonságok. Eredményként csökkenthető a sejtciklus S fázisában lévő sejtek aránya, meggátolható az önmegújulás és serkenthető a differenciálódás, ami különböző differenciációs markerek (például nestin, Hand1, Fgf5, Cdx2) mRNS szintjének növekedését eredményezte (Wang, Du és Peng, 2019). Ugyanakkor optogenetika segítségével kimutatható egy fényérzékeny fehérjét kifejező és egy közelében lévő másik neuron közötti szinaptikus kapcsolat és a módszer segítségével akár az aktivitásukat is kontrollálhatjuk (Habibey és mtsai., 2020). Humán indukált pluripotens őssejtekből (hiPSC) származó csatornarodopszint kifejező neurális progenitor (NPC) sejtek esetében megfigyelték, hogy a kék fénnel történő hosszú idejű, nem mintázott (on-off) stimulálás hatására a sejtek intracelluláris Ca-szintje változott, valamint fokozódott a proliferáció és nőtt az asztrocitákká és neuronokká differenciálódott sejtek száma. Emellett az idegsejtek axonjainak hossza, elágazásuk mértéke is növekedett (Giraldo és mtsai., 2021). Az idegrendszerre jellemző, hogy a fejlődés előrehaladtával csökken a differenciálódó idegi prekursorok mozgékonyága. Ennek ellenére fényérzékeny, különböző fejlődési stádiumban lévő radiális glia szerű őssejtek *in vitro* tenyésztésében megfigyelték, hogy a még migráló progenitorok mozgékonyága növekszik 12 órán keresztül tartó 5 percenként ismétlődő felvillanások hatására. A neuronális prekursorokban a fényérzékeny fehérjék által közvetített megváltozott kalcium ion beáramlások hatással lehetnek a sejtek élettani folyamataira, többek közt a nyúlványok növekedésére és a mozgásokon keresztül a kapcsolatok kialakulására (Köhidi és mtsai., 2017). Az optogenetika könnyen kombinálható multi elektródás rendszerekkel (MEA), így nyomon követhető a teljes neuronhálózat tüzelési aktivitása is (Schmieder és mtsai., 2022).

Kísérleteimben az optogenetikai beavatkozás okozta depolarizációs tréningezés következményeként elektrofiziológiai változásokat, illetve az inward rektifikáló kálium csatornák alegységeinek expressziós változását figyeltem meg. Az inward rektifikáló kálium csatorna egy ligandum függő ioncsatorna, melynek jelenlétét a szervezetben számos sejttypusban igazolták. Szerepe az idegrendszerben sokrétű, ez az ioncsatorna család modulálhatja a sejtek ingerlékenységét, a neurotranszmitterek szekrécióját, továbbá szerepe van a nyugalmi membránpotenciál beállításában is. A csatorna hatása egy depolarizáció során bekövetkező erős befelé irányuló rektifikáció, úgynevezett depolarizációs visszahajlást okoz. Csökkenti a K^+ -ion kiáramlást, ezzel segítve a negatív nyugalmi membránpotenciál fenntartását (Murata és mtsai., 2016). Kísérletesen a Kir2.1 ioncsatorna túlexpresszáltatása az ingerlékenység csökkentésére használható a neuronokban (Johnson-Venkatesh és mtsai., 2015).

Elektrofiziológiai mérések során ingerlést követően a neuronok I-V görbéin is jól megfigyelhető a csatorna hatása (6.C ábra).

Az idegrendszerben a leginkább kifejezett hatása a hét alcsalád közül Kir2.x csatornáknak van. Ezen alcsalád eloszlását az agyban immunhisztokémiai módszerekkel számos tanulmányban vizsgálták. A Kir2.1 és Kir2.3 ioncsatornák mind neuronokban, mind glia sejtekben megtalálhatók, bár a glia sejtekben feltehetően kevésbé kifejezettek. Bár a Kir2.1 csatorna az agy valamennyi területén detektálható, nagy mennyiségben a szaglóhagymában és a középagyi colliculus superior-ban mutatták ki, így szerepe lehet a szem és fejmozgások finomhangolásában. Míg a Kir2.1 és Kir2.3 megtalálható alacsonyabb agyi régiókban is - mint például a dorzális spinális ganglionokban és a gerincvelőben -, addig a Kir2.4 csatorna többnyire az agytörzsi motorneuronokban expresszálódik. A Kir2.2 csatorna számos előagyi magban, így a hippocampusban és a kisagyban is megtalálható nagy mennyiségben (Prüss és mtsai., 2005; Murata és mtsai., 2016).

Az NE-4C sejtekből differenciáltatott neuronok, származásukból adódóan kortikális neuronhálózatot modellező sejtrendszerek, ezek alapján nem meglepő, hogy a megvilágítás hatására legnagyobb mértékben a Kir2.2 ioncsatorna expressziója változott, ezzel szemben az alacsonyabb agyi régiókra jellemző Kir2.3 ioncsatorna ezekben a sejtekben alig volt jelen. A tartós depolarizációs tréning (*théta oszcilláció*) hatását ellensúlyozva a sejtek a nyugalmi membránpotenciál fenntartását elősegítő ioncsatorna kifejeződésének növekedésével válaszoltak.

A vizsgált depolarizációs mintázatokra adott eltérő idegsejtfejlődési válasz tudomásom szerint új, egyedi eredmény. Eredményeinkből úgy tűnik, hogy a rövid ideig tartó (5 másodperc), percenként ismételt fénymintázatoknak lehet biológiailag aktív hatása az NE-4C fejlődő neurális tenyészetekben. Mind a *théta oszcilláció*, mind az *5 másodpercig tartó Poisson eloszlású tréning* növelte a tenyészetekben a tüzelő sejtek arányát 48 órás megvilágítási tréninget követően. Ezzel szemben a folyamatos, Poisson eloszlású megvilágításnak nem volt ilyen hatása. Ezek az eredmények összefüggésben állhatnak azzal, hogy a fejlődő rágsáló idegrendszerben a neuronok kialakulása során a lassú lefutású, kis csoportokban érkező oszcillációkat figyeltek meg (Luhmann és mtsai., 2016), amit az 5 másodperces mintázatok jobban leképezhetnek.

Érdekes megfigyelés, hogy míg a *théta oszcilláció* esetében az elektrofiziológiai eredményekkel összefüggésben egyértelműen nő a Kir csatorna három izoformájának (Kir2.1,

Kir2.2, Kir2.3) expressziója a tenyészetekben, addig az 5 másodperces Poisson mintázatú megvilágítás hatására csökkenést detektáltunk. Ennek oka lehet, hogy ezen tenyészetekben másfajta ioncsatornák okozzák az idegsejtek optogenetika által hajtott érését, fontosnak tartom azonban megjegyezni, hogy itt a qPCR eredmények ebben a pillanatban, még csupán egy tenyészetből származnak.

7. Kitekintés

Kutatások bizonyították, hogy egy exogén őssejtből származó neuron sikeresen beépülhet, differenciálódhat és funkcionálhat az idegszövetbe. Az optogenetika lehetőséget adhat rá, hogy az őssejtek jövőjét, fenotípusát precízen hangoljuk, így ezen neuronok fejlődésének irányítása az orvostudomány számára is fontos lehet, többek között például a retina, vagy az idegrendszer egyéb területeinek sérülésével kapcsolatos betegségek helyreállításában (Habibey és *mtsai.*, 2020; Shams és Soheili, 2021). Az optogenetika segítségével kialakíthatunk egy olyan háromdimenziós kívülről vezérelhető emberi neurális hálózat modellt, ami leképzi az emberi agy fiziológiáját. Egy ilyen modell hasznos lehet az implantációs kezelések fejlesztésén kívül egyes neurodegeneratív betegségek *in vitro* vizsgálatában, vagy akár gyógyszerek tesztelésében (Lee és *mtsai.*, 2019).

Az idegrendszer korlátozott regenerációs képessége és a humán idegrendszer hozzáférhetetlensége miatt egyes neurodegeneratív betegségek, mint például az Alzheimer-kór, vagy a Parkinson-kór és az esetleges sérülések kezelése és vizsgálata nehézségekbe ütközik (Lee és *mtsai.*, 2019; Chang és *mtsai.*, 2021; Giraldo és *mtsai.*, 2021). Ezen felül a humán idegrendszer rendkívül komplex kapcsolati hálóval rendelkezik és a sokféle neuron altípus méginkább megnehezíti a vizsgálatát. Sok neurodegeneratív betegség köthető a neuronok egy specifikus populációjához, például tudjuk, hogy a Parkinson-kór kialakulásában a dopaminerg neuronoknak van jelentős szerepe (Chang és *mtsai.*, 2021). Ez a specificitás és összetettség még inkább megnehezíti ezen betegségek vizsgálatát. Az optogenetikai módszerek segítségével kialakított őssejt alapú modellek fejlesztése potenciális lehetőséget nyújthatnak többek közt ezen betegségek célzottabb vizsgálatára és a terápiás lehetőségek fejlesztésére.

8. Szerzői hozzájárulás

- A TDK munkához felhasznált összes tenyészetet én állítottam elő. A TDK-ban bemutatott adatokhoz összesen 20 differenciáltatott tenyészetet használtam fel. Ebből négyet a tenyésztési protokoll beállítására, egyet a fototoxicitás vizsgálatához, hármat az RNS mintavételhez. Az elektrofiziológiai mérésekhez 12 tenyészet 3 vagy 4 lemezét használtuk fel.
- A differenciáltatott tenyészeteken a transzfektálást, a fixálást és az immuncitokémiai festéseket és az ezzel kapcsolatos mikroszkópos felvételek készítését minden esetben én végeztem. A transzfekciós ráta beállításához a tenyészetet én állítottam elő, a transzfektálást, a mikroszkópos felvételek készítését, majd az adatok elemzését magam végeztem.
- Az elektrofiziológiai mérésekhez a tenyészeteket és állítottam elő, a teljes sejt patch clamp méréseket és az ebből származó adatok kiértékelését Dr. Szűcs Attila végezte.
- A RT-qPCR mérésekhez az RNS mintákat (összesen 20 lemezről) én vettem, a mérés összeállítását Ben Mahmoud Maissa segítségével végeztem.

Ezúton nyilatkozom, hogy TDK konferencián korábban nem értem el helyezést. Ha a jelen BTDK Konferencia előtt másik TDK konferencián helyezést érek el, arról a BTDK szervezőit még a konferencia előtt értesítem, a nyertes pályamunkát eljuttatom hozzájuk.

9. Irodalom

Anthony, T. E. and Heintz, N. (2008) ‘Genetic lineage tracing defines distinct neurogenic and gliogenic stages of ventral telencephalic radial glial development’, *Neural Development*, 3(1). doi: 10.1186/1749-8104-3-30.

Buchsbaum, I. Y. and Cappello, S. (2019) ‘Neuronal migration in the CNS during development and disease: Insights from in vivo and in vitro models’, *Development (Cambridge)*, 146(1). doi: 10.1242/dev.163766.

Chang, C. Y. *et al.* (2021) ‘Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Specific Neural Lineages’, *Cell Transplantation*, 30, pp. 1–14. doi: 10.1177/09636897211017829.

Giraldo, E. *et al.* (2021) ‘Optogenetic modulation of neural progenitor cells improves neuroregenerative potential’, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), pp. 1–14. doi: 10.3390/ijms22010365.

Habibey, R. *et al.* (2020) ‘Optogenetics for neural transplant manipulation and functional analysis’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 527(2), pp. 343–349. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.141.

Jelitai, M. and Madarasz, E. (2005) ‘The Role of GABA in the Early Neuronal Development’, *International Review of Neurobiology*, 71(05), pp. 27–62. doi: 10.1016/S0074-7742(05)71002-3.

Johnson-Venkatesh, E. M. *et al.* (2015) ‘Excitability governs neural development in a hippocampal regionspecific manner’, *Development (Cambridge)*, 142(22), pp. 3879–3891. doi: 10.1242/dev.121202.

Katona, I. *et al.* (2001) ‘Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission’, *Journal of Neuroscience*, 21(23), pp. 9506–9518. doi: 10.1523/jneurosci.21-23-09506.2001.

Köhidi, T. *et al.* (2017) ‘Differentiation-dependent motility-responses of developing neural progenitors to optogenetic stimulation’, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(December), pp. 1–12. doi: 10.3389/fncel.2017.00401.

Kriegstein, A. R. and Noctor, S. C. (2004) ‘Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex’, *Trends in Neurosciences*, 27(7), pp. 392–399. doi: 10.1016/j.tins.2004.05.001.

Lee, S. Y. *et al.* (2019) ‘Optogenetic control of iPS cell-derived neurons in 2D and 3D culture systems using channelrhodopsin-2 expression driven by the synapsin-1 and calcium-calmodulin kinase II promoters’, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(3), pp. 369–384. doi: 10.1002/term.2786.

Lim, L. *et al.* (2018) ‘Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons’, *Neuron*, 100(2), pp. 294–313. doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.009.

Lin, J. Y. (2011) ‘A user’s guide to channelrhodopsin variants: Features, limitations and future developments’, *Experimental Physiology*, 96(1), pp. 19–25. doi: 10.1113/expphysiol.2009.051961.

Luhmann, H. J. *et al.* (2016) ‘Spontaneous neuronal activity in developing neocortical networks: From single cells to large-scale interactions’, *Frontiers in Neural Circuits*, 10(MAY), pp. 1–14. doi: 10.3389/fncir.2016.00040.

- M. Jelitai, M. Anderová, A. Chvátal, E. M. (2007) 'Electrophysiological Characterization of Neural Stem/Progenitor Cells During In Vitro Differentiation: Study With an Immortalized Neuroectodermal Cell Line', *Journal of Neuroscience Research*, 3253(April), pp. 3244–3253. doi: 10.1002/jnr.
- Murata, Y. *et al.* (2016) 'Neuronal and glial expression of inward rectifier potassium channel subunits Kir2.x in rat dorsal root ganglion and spinal cord', *Neuroscience Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 617, pp. 59–65. doi: 10.1016/j.neulet.2016.02.007.
- Obernier, K. and Alvarez-Buylla, A. (2019) 'Neural stem cells: Origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain', *Development (Cambridge)*, 146(4). doi: 10.1242/dev.156059.
- Ojeda, J. and Ávila, A. (2019) 'Early Actions of Neurotransmitters During Cortex Development and Maturation of Reprogrammed Neurons', *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 11(November), pp. 1–14. doi: 10.3389/fnsyn.2019.00033.
- Orsolits, B. *et al.* (2013) 'Retinoid machinery in distinct neural stem cell populations with different retinoid responsiveness', *Stem Cells and Development*, 22(20), pp. 2777–2793. doi: 10.1089/scd.2012.0422.
- Prüss, H. *et al.* (2005) 'Differential distribution of individual subunits of strongly inwardly rectifying potassium channels (Kir2 family) in rat brain', *Molecular Brain Research*, 139(1), pp. 63–79. doi: 10.1016/j.molbrainres.2005.05.006.
- Rosenbloom, A. B. *et al.* (2020) 'β-Catenin signaling dynamics regulate cell fate in differentiating neural stem cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(46), pp. 28828–28837. doi: 10.1073/pnas.2008509117.
- Rowitch, D. H. and Kriegstein, A. R. (2010) 'Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification', *Nature*, 468(7321), pp. 214–222. doi: 10.1038/nature09611.
- Schlett, K. *et al.* (2000) 'Dynamics of cell aggregation during in vitro neurogenesis by immortalized neuroectodermal progenitors', *Journal of Neuroscience Research*, 60(2), pp. 184–194. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(20000415)60:2<184::AID-JNR7>3.0.CO;2-E.
- Schlett, K. and Madarász, E. (1997) 'Retinoic acid induced neural differentiation in a neuroectodermal cell line immortalized by p53 deficiency', *Journal of Neuroscience Research*, 47(4), pp. 405–415. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19970215)47:4<405::AID-JNR6>3.0.CO;2-I.
- Schmieder, F. *et al.* (2022) 'Tracking connectivity maps in human stem cell-derived neuronal networks by holographic optogenetics', *Life Science Alliance*, 5(7), pp. 1–19. doi: 10.26508/lsa.202101268.
- Shams, H. and Soheili, Z.-S. (2021) 'Optogenetic approach improves neuroregenerative potential of stem cell-based therapies', 20(6), pp. 1–5.
- Shibata, T. *et al.* (1997) 'Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord', *Journal of Neuroscience*, 17(23), pp. 9212–9219. doi: 10.1523/jneurosci.17-23-09212.1997.
- Sokolik, C. *et al.* (2015) 'Transcription Factor Competition Allows Embryonic Stem Cells to Distinguish Authentic Signals from Noise', *Cell Systems*. Elsevier Inc., 1(2), pp. 117–129. doi: 10.1016/j.cels.2015.08.001.

Spitzer, N. C. (2010) 'How GABA generates depolarization', *Journal of Physiology*, 588(5), pp. 757–758. doi: 10.1113/jphysiol.2009.183574.

Sultan, K. T. and Shi, S. H. (2018) 'Generation of diverse cortical inhibitory interneurons', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 7(2), pp. 1–18. doi: 10.1002/wdev.306.

Tárnok, K. *et al.* (2002) 'Stage-dependent effects of cell-to-cell connections on in vitro induced neurogenesis', *European Journal of Cell Biology*, 81(7), pp. 403–412. doi: 10.1078/0171-9335-00262.

Wang, M. *et al.* (2019) 'Nongenetic optical modulation of neural stem cell proliferation and neuronal/glial differentiation', *Biomaterials*, 225(October). doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119539.

Wang, S., Du, L. and Peng, G. H. (2019) 'Optogenetic stimulation inhibits the self-renewal of mouse embryonic stem cells', *Cell and Bioscience*, 9(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s13578-019-0335-6.

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom elsősorban témavezetőmnek, Dr. Tárnok Krisztiánnak a kísérleteim során és a dolgozatom elkészítése közben nyújtott segítségével, és Dr. Szűcs Attilának az elektrofiziológiai mérések során nyújtott munkájáért. Szeretném megköszönni Dr. Schlett Katalinnak és a ELTE Élettani és Neurobiológiai Tanszékén munkatársainak a támogatásukat. Külön köszönet illeti Dr. Rátkai Anikót, akihez a munkám elkészítése során bármikor fordulhattam segítségért.

Kutatásunkat a Richter Gedeon Nyrt. RG-IPI-2020-TP14/025 számú témapályázata és az NKFIH VEKOP-2.3.3-15-2016-00007 pályázata támogatta.