

Idegi őrsejtekből kialakított neuronális sejtrendszer elektrofiziológiai jellemzése

XXXVI. OTDK Biológia Szekció

Készítette:

Csótai Zsófia

Biológia Bsc. alapszak, IV. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Szűcs Attila, tudományos főmunkatárs

és

Dr. Tárnok Krisztián, adjunktus

ELTE TTK, Biológiai Intézet, Élettani és Neurobiológiai Tanszék



EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET

Budapest, 2023.

Tartalomjegyzék

1. Összefoglalás	4
2. Bevezetés	5
3. Idegi modellek alkotása.....	5
3.1. <i>In vitro</i> idegi modellek kialakítási lehetőségei	7
3.2. Egér eredetű neuroektodermális őssejtrendszer: az NE-4C sejtvonal	8
3.3. Humán idegsejtek kialakítása in vitro módszerekkel	9
3.3.1. <i>Embriionális őssejtek felhasználása (embryonic stem cells, ESC)</i>	9
3.3.2. <i>Indukált pluripotens őssejtekből nyert neuronok</i>	9
3.3.3 <i>Direkt átprogramozással nyert neuronok (iN-ek)</i>	10
4. Célkitűzések	11
5. Anyagok és módszerek.....	12
5.1. NE-4C sejtek tenyésztése és differenciáltatása	12
5.2. A humán sejt kultúrák fenntartása.....	12
5.3. Elektrofiziológia.....	13
5.4. Fiziológiai tulajdonságok számszerű elemzése, statisztika	14
5.5. Immuncitokémia – A biocitinnel jelzett sejtek visszakeresése	15
6. Eredmények	16
6.1. Különböző érettségű és fenotípusú neuronok azonosítása	16
6.2. Az NE-4C egér neuroektodermális őssejtvonalból differenciálódó idegsejtek (NE4C-N) vizsgálata	17
6.3. Humán iPSC-N sejtek elektrofiziológiai elemzése	18
6.4. Humán iN sejtek vizsgálata	19
6.5. A modellrendszerek neuronjaiban megfigyelhető akciós potenciálok kinetikai összehasonlítása	23
7. Diskusszió	25
8. Köszönetnyilvánítás.....	28
9. Szerzői hozzájárulás.....	28
10. Irodalomjegyzék	29

Rövidítés jegyzék

ACSF: artificial cerebrospinal fluid, mesterséges agyi cerebrospinalis folyadék

BSA: szarvasmarha szérum albumin, (bovine serum albumin)

DIV: *in vitro* napok száma

DNS: dezoxiribonukleinsav

EGTA: etilén-glikol-bisz-(2-aminoetiléter) -N, N, N', N'-tetraecetsav

ESC: embryonic stem cells

HCN: hyperpolarization activated cyclic nucleotidic gated nonselective cationic channels

HEPES: N-2-hidroxietil-piperazin-N'-2-etánszulfonát

iN: közvetlen átprogramozással nyert indukált neuron (direct reprogrammed induced neuron)

iPSC: indukált pluripotens őssejt (induced pluripotent stem cell)

iPSC-N: indukált pluripotens őssejtből származó neuron

NE-4C: egér neuroektodermális őssejtvonal

NE4C-N: neuroektodermális őssejtvonal eredetű neuron

NSC: idegi őssejt (neural stem cell)

spike: akciós potenciál

PBS: foszfát pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)

PLL: poli-L-lizin

PFA: paraformaldehid

atRA: all-transz retinsav (all-trans retinoic acid)

RNS: ribonukleinsav

TritonX: 2-[4-(2,4,4-trimetihylpenthan-2-yl) pheroxy] ethanol

1. Összefoglalás

Az idegsejtek érését, fejlődési lépéseit *in vivo* és *in vitro* sejtmodellekben is tanulmányozhatjuk. Az utóbbiak számos előnyt kínálnak, mivel a fejlődő sejtpopuláció közvetlenül, kísérletesen manipulálható, környezeti tényezői szabadon változtathatók. Bár számos rágszálóból származó idegi fejlődési modellt tanulmányoztak az elmúlt évtizedekben, a humán neuronoknak ilyen célú felhasználása csak bő tíz évre tekint vissza, melynek nagy lendületet az indukált pluripotens őssejt technika kidolgozása adott.

Munkám során három celluláris modellrendszerrel dolgoztam: egérembrió előagyhólyagjából származó neurális őssejtekből (NE4C-N), valamint humán indukált pluripotens őssejtekből differenciáltatott (iPSC-N), illetve emberi fibroblasztokból, közvetlen átprogramozással nyert neuronok (iN) jellemzését végeztem el. Immuncitokémiai módszerekkel detektáltam az idegsejteket, melyek idegéletti sajátosságait patch clamp technika segítségével határoztam meg. Az elemzések során összehasonlítottam a különböző módon nyert neuronok passzív membrántulajdonságait, illetve serkenthetőségét. Kutatásaim által megállapítható, hogy a különböző programozási technikákkal nyert humán sejtpopulációk érési menetrendje, karaktere is eltérő. A humán idegsejtek képződése, érése a rágszálókéval összevetve lényegesen lassabb. Azt is megállapítottam, hogy az iPSC-N sejtmodellek esetében sokkal nagyobb arányban fordultak elő érett tüzelési karakterisztikával jellemezhető neuronok, míg az NE4C-N és iN sejt kultúrákban.

Eredményeim jól mutatják a neurális őssejtek neuronképzésének különbségeit a két fajban. Elektrofiziológiai jellemzéseim elősegítik a modellrendszerek tulajdonságainak jobb megértését.

2. Bevezetés

Az emberi idegszövet különböző idegsejt-típusok és gliasejtek sokféleségéből áll. Ezen specializált sejtek együttműködése, kapcsolatrendszere az emberre jellemző viselkedések és kognitív képességek összességét alakítja ki. Szerkezetének, működésének feltárását ugyanakkor a nagyszámú sejtes elem és a rendkívül összetett kapcsolatrendszer bonyolítja, melyek bármelyikének akár a szervfejlődés közbeni, akár a felnőttkor alatti megváltozása számos kórkép kialakulásának forrása lehet. Az emberi agyszövet fejlődésének, a kóros idegi állapotok hátterében húzódó molekuláris folyamatok szerepének megértéséhez mindenképpen szükséges a humán központi idegrendszer mélyebb szintű tanulmányozása. Mivel az emberi agyszövet elérhetősége és közvetlen kísérletes vizsgálata rendkívül limitált, az idegrendszeri folyamatokat klasszikusan állatmodelleken, *in vivo* és *in vitro* körülmények között tanulmányozhatjuk (Dawson és mtsai., 2018). A számos kínált előny mellett (pl. betegség-specifikus állatmodellek kialakítása, nagyfokú manipulálhatóság stb.) azonban problémaként merül fel, hogy a faji különbségek miatt mind a fejlődési folyamatok időbeli lefutása, mind a modellezett kórképek komplex fenotípusa (pl. néhány kórkép-jellemző modellezett csak) eltér a humán idegszövetben megfigyeltétől (Cummings, 2018). Ennek a problémának a megoldásában nyújtanak segítséget az összejtbiológiai kutatások újabb eredményei (Pasteuning-Vuhman és mtsai., 2021).

3. Idegi modellek alkotása

A kísérletes vizsgálatok célja egy jelenség olyan modelljének felállítása, amely utánozni képes egy folyamat tényleges lefolyását. A modellalkotás kizárólag priori ismereteket használ; általános érvényű törvényszerűségekből kiindulva, természettudományos ismeretanyagra támaszkodva, egy konkrét, ismert jelenség leírására törekszik. Az induktív modellalkotás kizárólag kísérleti adatokra épít; a kísérletek során végzett megfigyelések információt tartalmaznak a jelenség és annak környezete között érvényesülő kölcsönhatásokról, azaz a rendszer bemenő és kimenő jeleiről. A modellalkotás számos hiba forrása lehet. Ha egy komplex kérdés megközelítéséhez egyszerűsített modelleket alkotunk, akkor számos fontos tényezőt kell elhanyagolni a probléma tanulmányozhatóságának érdekében. Viszont a kapott eredmények kiértékelésekor nem szabad általánosítani, generalizálni, és megfeleldezni a modellalkotáskor elhanyagolt tényezőkről. Ilyen modellekre példa az *in vitro* kísérlet, melyek érvényessége *in vivo* nem mindig egyértelmű, és hasonlóképpen, a különböző élőlényekben

kapott eredmények átvitele egyik fajról a másikra (így az emberre) sem lehet teljesen magától értetődő, vagy zökkenőmentes.

A rágcsló idegi modellek esetében az idegsejtek fejlődését, tulajdonságait, működését olyan eltérő megközelítésű modellek segítségével tanulmányozhatjuk, melyek a sejt működés bizonyos szempontjait emelik ki. Ha a sejteket *in vivo* körülmények között vizsgáljuk, képet kap(hat)unk az adott neuron szöveti és sejt tulajdonságairól, kapcsolatrendszeréről, egyedi és hálózati működéséről (Yang és Yuste, 2017). A vizsgálatok magas komplexitású környezetben zajlanak, valósan írják le az adott sejt tulajdonságait/működését. Esetenként korreláltathatóak magasabb hálózati működéssel vagy végső soron az állat viselkedésével (Renart és Machens, 2014). Ugyanakkor a sejtbiológiai folyamatok megértését, a fejlődésbiológiai történések lépéseinek nyomon követését a magasabb komplexitás hátráltathatja. A komplex rendszereket leírhatjuk úgy is, ha elemeire bontjuk, redukáljuk. Az *in vitro* megközelítés lényege, hogy a szöveti, sejt működést a szervezetből kiemelve, mesterséges, jól kontrollált környezetben tanulmányozzuk. Ilyen esetben a kiemelt idegszövetet vagy idegsejteket megfelelő tápfolyadékban meghatározott és standardizált körülmények között tarjuk és vizsgáljuk (Zhang és mtsai., 2022). Ebben az esetben a biológiai törvényszerűségek az egyszerűbb rendszer miatt könnyebben leírhatóak, a kísérletek egyszerűbben végrehajthatóak (pl. könnyebb manipuláció, közvetlen sejtlerés) (**1. táblázat**). Ugyanakkor ez egyben egyik korlátja is lehet az *in vitro* tenyésztési módszereknek, hiszen a sejtek viselkedését a szervezetben sok más sejt(típus) befolyásolja, ezért a kapott adatokat nem lehet egy az egyben az *in vivo* állapotokra vonatkoztatni.

1. táblázat

Az <i>in vitro</i> megközelítés előnyei és hátrányai:	
- egyszerűbb manipuláció - kontrollálható kísérletek - közvetlen sejt-, és szövet- szintű hatás - kisebb komplexitás	- az élő szervezet komplexitása magasabb - esetenként hiányzó határfelületek - nincs/csökkent mértékű a metabolizmus

3.1. *In vitro* idegi modellek kialakítási lehetőségei

Ha az idegsejteket *in vitro* szeretnénk tanulmányozni, akkor azokat kiemelhetjük a már kialakuló/kialakult idegszövetből (*primer tenyészetek kialakítása*). Ez esetben adott tulajdonságú, fejlődési állapotú vagy agyterületi sajátosságokat hordozó sejteket tenyésztünk és tanulmányozunk. Ilyenkor a neuronok már elkötelezett állapotban vannak, érésük, hálózatformáló képességük tanulmányozható¹. Ugyanakkor a neuronokat *in vitro* létrehozhatjuk, ehhez a szövet kialakulásához nélkülözhetetlen *őssejtekre* lesz szükségünk.

Az *őssejtek* olyan differenciálatlan, elkötelezetlen sejtek, amelyek képesek önmaguk változatlan formában való fenntartására (*önmegújítás*), valamint differenciációval specializáltabb sejtek létrehozására (*differenciációs potenciál*) (Smith, 2006). Az embrionális *őssejtek* a szerv-szöveti fejlődésben, a felnőtt szöveti *őssejtek* az adott szövetre/szervre jellemző egy vagy többféle sejtípus kialakításában játszanak szerepet. Az *őssejtek* fejlődési kapacitásuk (*fejlődési potenciál*) tekintetében is eltérnek egymástól. A megtermékenyített embrió és a hólyagsíra sejtjei rendkívül széles fejlődési potenciálúak, mindhárom csíralemez sejtjeinek kialakítására képes totipotens², illetve pluripotens sejtek (pl. embrionális *őssejtek*). A szöveti *őssejtek* már zártabb genetikai programmal rendelkeznek; multi- vagy unipotensek (Szabó, 2009). Számos szervben/szövetben írtak le ilyen szöveti *őssejteket*, köztük a csontvelőben, bőrben, fogban, a béltraktusban és az agyban is (Vasan és mtsai., 2021).

Az *őssejtek* felhasználásával az adott szövet sejtjeinek sejt- és molekuláris biológiai tanulmányozása több irányból is elérhető. Izolálhatjuk és *in vitro* fenntarthatjuk az *adott szövet szövetspecifikus őssejtjeit*, majd ezeket az elköteleződési, fejlődési útvonalaik ismeretében az adott szövet megfelelő sejtípusává differenciáltathatjuk. Rendelkezhetünk széles fejlődési képességű, *pluripotens sejtekkel* (pl. embrionális *őssejtekkel*) is, és ezeket differenciáltathatjuk az adott szöveti irányba (Avior és mtsai., 2016). Állatmodellek esetén mindkét lehetőség adott, még az agy esetében is. Így léteznek idegi *őssejteken* (pl. közvetlenül az agyszövetből izolált idegi *őssejt*, NSC³ vagy halhatatlanná tett, immortalizált NSC sejtvonala) és embrionális *őssejteken* alapuló idegi modellrendszerek is (Siller és mtsai., 2013).

¹ Léteznek olyan *in vitro* modellek is, ahol az idegsejteket egy az idegrendszerből származó szövetkockában tenyésztjük (organotipikus szelet tenyészet). Ezek dolgozatomban tárgyától eltérnek, így nem részletezem őket.

² A totipotens sejtek az embrió minden sejtje mellett, a magzatburkokat is ki tudják alakítani.

³ NSC – idegi *őssejt*, mely ideg és glia sejtek képzésére képes

3.2. Egér eredetű neuroektodermális őssejttrendszer: az NE-4C sejtvonal

A sejtfajlás mechanizmusainak megértéséhez szükséges a kiinduláshoz használt sejtek fejlődési állapotának pontos ismerete. Az idegrendszer fejlődésének vizsgálatához általában olyan állapotú sejtekre van szükségünk, amelyek az egy-sejtrétegű neuroektoderma homogén sejtpopulációjához hasonlítanak legjobban (*neuroektodermális őssejtek*). Az embriókból izolált idegi őssejt-készlet sokszor heterogén, és fenntartásuk időben limitált. Ugyanakkor elérhetőek halhatatlanná tett, *immortalizált idegi őssejtvonalak* is, melyek hosszú távon fenntartva is képesek homogén sejtpopulációk előállítására. Az ilyen sejttrendszerek előnye, hogy leírásuk több évtizedes múlta is visszatekinthet, így fejlődési lépéseik ismertek, neurogenézisük folyamatai jól jellemzettek (Tárnok és mtsai., 2002; Schlett és mtsai., 1997).

Vizsgálataimhoz NE-4C idegi őssejteket használtam (Schlett és mtsai., 1997). Az NE-4C egér embrionális neuroektodermális őssejtek 9 napos, p53⁴ defficiens egérembrío előagyhólyagjából származnak, feno- és genotípusukat tekintve azonosak. *In vitro*, ún. „fenntartó” körülmények között „végtelenül” szaporíthatók, de indukciós hatásokra (mikromoláris koncentrációjú *all-transz* retinsav jelenlétében) idegszöveti – neuron és glia - irányba differenciálódnak. A retinsav több funkciójú morfogén. Számos folyamatot kontrollál, beleértve a mesodermális szegmentációt és differenciációt, a neurogenézist és a fejlődő gerincvelő regionális mintázódását kialakítva a gerincvelő ventrális részére jellemző sejt típusokat (Diez del Corral és mtsai., 2003; Jones, Villeneuve és mtsai., 1983). Korábbi kutatások leírták, hogy az NE-4C sejtekből származó neuronok a tenyésztés 9-10. napjára számos idegi markerrel pl:MAP2, NMDA, NeuN (Jelítai és mtsai., 2002; Schlett és mtsai., 1997) rendelkeznek. Ezen időszakban a sejtenyésztetekben különböző érettségű idegsejtek és asztroglia sejtek is megfigyelhetők.

Az idegi modell akkor megfelelő, ha a kialakított idegsejtek nemcsak marker tulajdonságaikban (pl. idegsejtspecifikus III β -tubulin immunpozitivitás), hanem idegéletteni jellemzőikben is neuronok. Így az NE-4C sejtekből származó neuronok (NE4C-N) elektrofiziológiai jellemzése volt munkám egyik célkitűzése.

⁴ A p53 egy tumor szupresszor gén, mely kiemelkedő szereppel bír a sejtciklus szabályozásában. Hiányában spontán immortalizáció következhet be, és „halhatatlan” sejtvonalhoz juthatunk.

3.3. Humán idegsejtek kialakítása in vitro módszerekkel

Bár a legtöbb idegrendszeri kutatást rágszálómodelleken végzik, az így kapott eredmények humán transzlálhatósága sokszor elmarad a várttól, így az emberi neuronokon végzett vizsgálatok számos előnnyel rendelkeznek. Az ilyen *in vitro* rendszerek kialakítása azonban nehézségekkel jár. Primer idegsejt tenyészeteket csak rendkívül limitáltan lehet kialakítani. Reprodukálhatóságuk alacsony (Park és mtsai., 2020).

3.3.1. Embrionális őssejtek felhasználása (embryonic stem cells, ESC)

Az egyik lehetséges mód, hogy őssejtekből differenciáltatunk neuronokat. A humán idegsejtek létrehozása céljából azonban – az állatmodellekkel ellentétben – a szöveti őssejtek (NSC) kinyerése technikai és etikai okok miatt erősen limitált, így felmerülhet, hogy a neuronokat más sejtforrásból, pluripotens őssejtekből hozzuk létre. Ennek egyik lehetősége az *embrionális őssejtek (ESC)* használata. A humán ESC-ket az *in vitro* fertilizáció során beültetésre nem kerülő megtermékenyített petesejtekből hozzák létre, a donor írásos beleegyezését követően. Blasztociszta állapotban a belső sejtösmegből izolált sejtek sejt kultúrában való tenyésztésével nyerhetők ESC-kolóniák, amelyek megfelelő körülmények között elvben végtelen számú osztódásra képesek, illetve mindhárom csíralemez sejtjeivé képesek differenciálódni. 1998-ban James Thomson izolált először emberi ESC-ket (Thomson és mtsai., 1998). Azonban a humán embrionális őssejt vonalak létrehozásához szükséges humán embriók kinyerése további nehézségekbe ütközik, mind biológiai mind pedig etikai okokból.

3.3.2. Indukált pluripotens őssejtekből nyert neuronok

Az áttörést a Yamanaka és munkacsoportja által 2006-ban felfedezett lehetőség nyújtotta, mely során a már érett és differenciálódott felnőtt szomatikus sejteket genetikai módszerekkel⁵ pluripotens sejtekké átprogramozták, lényegében újrakiatalították (Takahashi és Yamanaka, 2006). Az így kialakított indukált pluripotens őssejtek (iPSC) magukban hordozzák az eredeti testi sejt minden genetikai örökségét (pl. mutációk), de fejlődési potenciáljuk az embrionális őssejteknek felel meg (Shi és mtsai., 2017).

⁵ A klasszikus iPSC eljárásban az Oct-4, Sox2, Klf4, c-Myc transzkripciós faktorok túltermeltetése eredményezi a sejtek epigenetikai visszaprogramozását (Takahashi és Yamanaka 2006)

A megközelítés második kulcslépése, hogy mivé kívánjuk differenciáltatni ezeket a sejteket. A differenciációs protokollok kifejlesztése ugyanis lehetővé teszi, hogy gyakorlatilag bármilyen emberi sejttípust előállítsunk a páciens bőréből vagy véréből származó iPSC-kből, beleértve a neuronokat is (**iPSC-N**) (Svendsen, 2013). Például, a módszer segítségével idegi kórképben szenvedő beteg testi sejtjeiből a kórképet mutató neuronok⁶ alakíthatóak ki. Így alig több mint egy évtizeden belül az iPSC-alapú betegségmodell-rendszerek a mai idegtudományi kutatások szerves részévé fejlődtek (Svendsen, 2013). Az iPSC-N kultúrák különösen értékesnek bizonyultak a komplex idegrendszeri fejlődési rendelleneségek kutatásában, valamint az agy monogenetikus rendelleneségeiben szerepet játszó molekuláris mechanizmusok feltárását is lehetővé tették (Lee és mtsai., 2009). Ugyanakkor mivel az iPSC-k lényegében funkcionálisan és epigenetikailag megfiatalodott sejtek, az életkorral összefüggő idegrendszeri celluláris és molekuláris folyamatok modellezése e rendszerben kihívást jelent (Vera, Bosco és Studer, 2016). Megfigyelték, hogy az iPSC eredetű neuronok működése, valamint elektrofiziológiai tulajdonságai sok szempontból az embrionális neuronokéhoz hasonlít (Lo Sardo és mtsai., 2017; Mertens és mtsai., 2018). Az iPSC-N-ek azonban idővel képesek fiziológiai és funkcionális érettséget elérni, szinaptikus kapcsolatokat létesíteni (Gunhanlar és mtsai., 2018). E fejlődési idő azonban a rágszáló modellekkel összevetve meglehetősen hosszú (5-10 hét).

3.3.3 Direkt átprogramozással nyert neuronok (iN-ek)

Az iPSC rendszereknél tapasztalt teljes genetikai megfiatalítás egy másik megközelítés, a közvetlen átprogramozás esetén elkerülhető. Ebben az esetben a fibroblaszt sejteket nem alakítják iPSC sejtekké, hanem bennük – idegi elköteleződést kiváltó transzkripció faktorok (pl. neurogenin2) túltermeltetésével - közvetlenül indukálják a neur(on)ális sejtors választást (Traxler és mtsai., 2019; Vasan és mtsai., 2021). Bár az így létrehozott indukált neuronok (iN) sok tulajdonsága megegyezik az iPSC-N-ekkel, ugyanakkor az egyik fontos különbség az, hogy az iN-ek megőrzik a donorra jellemző életkorral és egyéb epigenetikai információkkal kapcsolatos tulajdonságaikat (Boland és mtsai., 2017). Ezáltal az iN-eket az egyik legmegfelelőbb modellrendszernek tekintik az életkorral összefüggő idegi rendellenességek, betegségek tanulmányozására (Huh és mtsai., 2016). Ezek az indukált neuronális (iN) sejtek több neuron-specifikus fehérjét expresszálnak, akciós potenciálokat generálnak és funkcionális szinapsziseket képeznek.

⁶ Amennyiben a kórkép az egyént érintő genetikai okokra vezethető vissza.

Újabb kutatások igazolták, hogy az iPSC-N tenyészetek magas fokú korrelációt mutattak a magzati agy transzkriptomikai tulajdonságaival, de viszonylag alacsony korrelációt a felnőtt mintákkal, míg az iN-eknél ennek ellenkezőjét tapasztalták. Az adott életkorban lévő páciensből származó iN-ek genomszintű DNS-metilációs mintázatán alapuló „epigenetikus óra” leírásai azt szemléltetik, hogy az iN-tenyészetek sejtjeinek életkora a felnőttek epigenetikai életkorát is teljes mértékben leképezik (Horvath és mtsai., 2018; Kim és mtsai., 2018). Tehát ezen adatok együttesen arra utalnak, hogy az iN-ek jobban hasonlítanak a felnőtt idegsejt-típusokra.

Az *in vitro* idegi modellek esetén fontos tehát, hogy a kialakított sejtpopulációk milyen idegi tulajdonságokkal rendelkeznek, és ezek a tulajdonságok mennyiben feleltethetők meg egymásnak. Dolgozatomban ennek leírására teszek kísérletet.

4. Célkitűzések

Dolgozatomban egér neuroektodermális őssejtek (**NE-4C**), valamint neurotipikus páciensektől származó **iPSC** és **iN** sejtek *in vitro* indukált idegi fejlődését vizsgáltam. Arra voltam kíváncsi, hogy az így létrehozott idegi tenyészetek sejtjei milyen elektrofiziológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Vizsgálatom során a háromféle modellrendszert azonos patch clamp technikával mértem meg, a sejteket aktív és passzív membrántulajdonságaik alapján hasonlítottam össze.

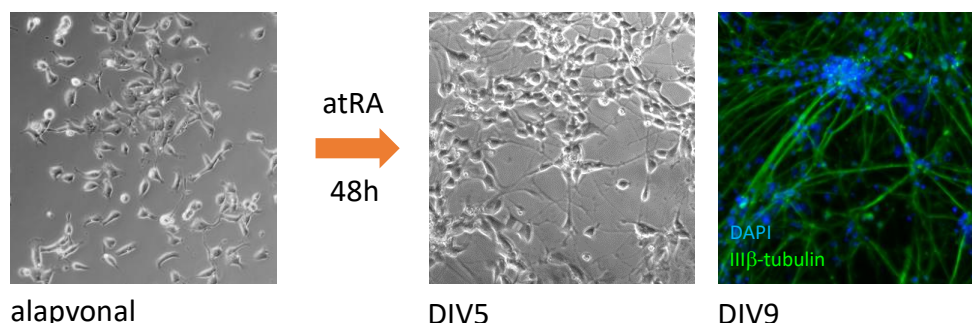
Munkám során az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

- Elektrofiziológiai szempontból azonosíthatóak-e sejttypusok a differenciáltatott neuronális tenyészetekben?
- Mennyiben hasonlóak vagy különbözőek a megfigyelt elektrofiziológiai tulajdonságok és azok korrelációi a sejtrendszerek között?
- Elektrofiziológiai bélyegek alapján elkülöníthetőek-e a három modellrendszer (egér NSC, humán iPSC, közvetlen átprogramozott humán fibroblaszt) neuronjai?

5. Anyagok és módszerek

5.1. NE-4C sejtek tenyésztése és differenciáltatása

Munkám során az NE-4C neuroektodermális őssejtvonalat (1. ábra) használtam (Schlett és mtsai.,1997). A sejtvonalat szubkonfluens állapotban poli-L-lizin (PLL) bevonatú szövettenyésztő edényekben tartottam fenn, 5% FCS tartalmú MEM (minimal essential medium, Sigma) tápfolyadékban, melyet 4mM glutaminnal valamint 40µg/mL gentamicinnel (Sanofi) és 2,5µg/mL Amphoterin B-vel (Sigma) egészítettem ki. Az elektrofiziológiai és immuncitokémiai vizsgálatokhoz a sejteket oxigén plazmával tisztított, poli-L-lizinnel (Sigma) és Geltrex-szel (Thermo) bevont 0,17 mm vastagságú boroszilikát fedőlemezekre (12mm átmérő, VWR) ültettem ki, 2×10^5 sejt/cm² sűrűségben differenciáltató médiumban (Neurobasal Plus, 2% B27⁺, 2mM GlutaMax, 1% CultureOne Supplement, 200 µM aszkorbinsav, 40µg/ml gentamicin és 2,5µg/ml amfotericinB). Az idegi differenciációt 48 órás, 10⁻⁶M-os atRA kezeléssel váltottam ki, majd a sejteken 3 naponta 50 %-os tápcserét hajtottam végre (BrainPhys, 2% SM1, 40µg/ml gentamicin, 2,5µg/ml amfotericinB). Az elektrofiziológiai mérésekre a kiültetést követő 9. napon került sor. A sejtenyészeteket inkubátorban 37°C-on 5%-os CO₂ koncentrációban neveltem (1. ábra).

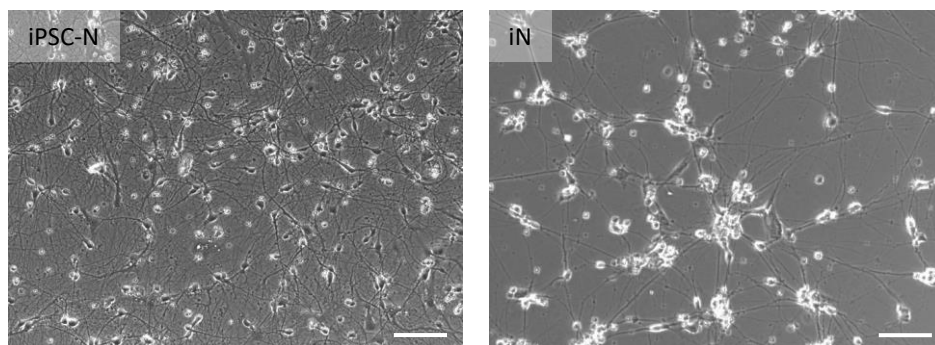


1. ábra Az NE-4C sejtek neuronális differenciációja. Az egér neuronális őssejtekben az idegi elköteleződést 48 órás *all-transz* retinsav (atRA) kezeléssel indítottam el. A tenyésztés 5 napjára (DIV5) nyúlványos sejtek jelennek meg, melyek a vizsgált időszak végére neuronspecifikus IIIβ-tubulin immunpozitivitást (zöld szín) mutató neuronokká fejlődnek. A sejtmagokat DAPI festés (kék) jelöli. A mérce: 100 µm (*saját felvétel*)

5.2. A humán sejt kultúrák fenntartása

A humán fibroblasztok a Kalifornia Egyetem San Diego-i tagozatának (UCSD) Shiley-Marcos Alzheimer-kór kutatóközpontjából (ADRC) származtak. A tenyészetek elkészítését a Dr. Jerome Mertens által vezetett Neuronal Aging Laboratory végezte az Innsbruck-i

Egyetemen. Mind a közvetlen átprogramozással nyert **iN**, mind az **iPSC**-eredetű neuronokat az innsbrucki laboratóriumban hozták létre, majd ezt követően a már idegsejt irányba differenciáltatott, Thermanox (Nunc) fedőlemezre ültetett sejteket hoztuk át saját laboratóriumunkba további vizsgálatokra. A tenyészeteken 3-4 naponta 50 %-os tápcserét végeztünk (BrainPhys basal media, Laminin, db-CAMP, GDNF, BDNF, B27, N2) (Mertens és mtsai., 2018; Traxler és mtsai., 2022). A sejttenyészeteket inkubátorban 37°C-on 5%-os CO₂ koncentrációban neveltük (**2.ábra**).



2. ábra Humán neuronális tenyészetek. 5 hetes, indukált pluripotens őssejt eredetű (iPSC-N) és fibroblasztokból közvetlen reprogramozással nyert (iN) idegi sejttenyészetek áttekintő fáziskontraszt felvétele. A mérce: 100 μ m (*saját felvétel*)

5.3. Elektrofiziológia

A differenciált humán neuronokat DIV 40-50-es korban mértem meg. Az egérből nyert **NE-4C** sejt kultúrák esetében a mérés DIV 9-dik napon történt. Az intracelluláris méréseket egészsejt patch clamp technikával hajtottam végre. A sejteket Zeiss Axiovert inverz mikroszkóppal, 40x-es nagyítású objektív segítségével figyeltem meg. A használt boroszilikát kapillárisok külső átmérője 1,5 mm volt (World Precisions Instruments). Ezen üveggapillárisokat/patch elektródákat a laboratóriumunkban található vízszintes pipettahúzó (Sutter Model P-87) segítségével készítettem, amelyek ellenállása 6-11 M Ω értékek közé esett. Az elektródákat intracelluláris oldattal (mM-ban meghatározva: K-glükonát 100, KCl 10, KOH 20, MgCl₂ 2, NaCl 2, HEPES 10, EGTA 0,2, D-glükóz 5; pH=7,3) töltöttem fel.

A tenyészetek a mérés ideje alatt ACSF-ben (mM-ban: NaCl 140, KCl 5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES 5, D-glükóz 10; pH 7.4), szobahőmérsékleten (21-23°C) tartottam. A membránpotenciált Multiclamp 700B erősítővel (Molecular Devices) mértem, current clamp üzemmódban. A bemeneti stimulus hullámformákat (áramlépcsők) a DASyLab v.11 (National Instruments) mérőprogram segítségével hoztam létre, és ugyanezzel a programmal regisztráltam a neuronok membránpotenciálját és tüzelési válaszait is.

Az általam alkalmazott technika segítségével a sejt membránpotenciálját mérjük meg az injektált áram függvényében⁷. A stimulus az elektródára adott áram. Az áramlépcsőkből felépített protokollok segítségével a nyugalmi membránpotenciált, az akciós potenciálok adatait, valamint a sejtmembrán számos élettani tulajdonságát tudjuk meghatározni. Kísérleteimben az inkrementált lépcsők -20 pA -tól indultak és egyenként 0,4 s hosszúak voltak. A regisztrált feszültségválaszokból számos idegélettani paramétert nyerhetünk ki. Ezek a membránellenállás, a membránfeszültség depolarizáló behajlása (voltage sag), az időállandó, a reobázis és még sok egyéb. Az áramlépcsős stimuláció esetén a reobázis jelöli az első spike-ot kiváltó áram küszöbértékét. Mindezen adatok függvényében tudjuk a modell rendszereinkben mért sejteinket fiziológiai szempontok szerint jellemezni, osztályozni. A TDK munkám során összesen 172 neuron (104 NE4C-N, 36 iPSC-N és 32 iN sejt) egészsejt patch clamp mérését és elektrofiziológiai jellemzését végeztem el. A mérések kis részében a sejt élettani tulajdonságait nem lehetett pontosan megmérni, mert a sejtmembrán túl érzékenyen reagált a patch pipettával történő beszakításra (fluktuáló membránpotenciál, megnövekedett szivárgási áram), ezeket az adatokat nem vettem be az elemzésbe. A végső esetszám 144 sejt lett.

5.4. Fiziológiai tulajdonságok számszerű elemzése, statisztika

Az elektrofiziológiai adatok kiértékelését a laboratóriumunkban fejlesztett NeuroExpress⁸ programmal végeztem, az adatok grafikai ábrázolását pedig az Origin Pro (OriginLab)⁹ alkalmazással készítettem el (www.originlab.com). A NeuroExpress a tanszékünkön kifejlesztett elektrofiziológiai paramétereket meghatározó program, melynek segítségével az általam mért sejtek élettani tulajdonságait részletesen elemeztem. Ezen program a regisztrált sejtek áramlépcsőre adott feszültségválaszait használja, valamint az emittált akciós potenciálok számos paramétere is meghatározható. A statisztikai elemzéseket Jamovi programmal¹⁰ (R program környezet) végeztem. Az adatokat normáeloszlású minták esetén egyutas ANOVA analízissel, Tukey poszt-hoc teszttel, nem-normáeloszlású minták esetén Kruskal-Wallis teszttel, Dwass-Steel-Critchlow-Fligner páros összehasonlítással vettem össze, 5%-os szignifikancia szint mellett.

⁷ $V_m = V_m(I, t)$ V_m =membrán potenciál, I = injektált áram, t =idő

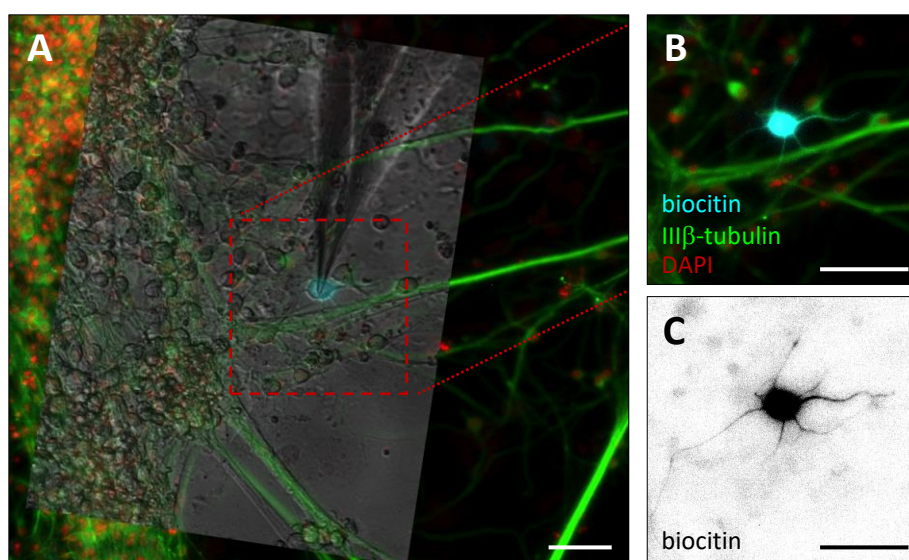
⁸ <https://www.researchgate.net/project/NeuroExpress-Analysis-software-for-whole-cell-electrophysiological-data>

⁹ <https://www.originlab.com/index.aspx?go=Products/Origin>

¹⁰ www.jamovi.org

5.5. Immuncitokémia – A biocitinnel jelzett sejtek visszakeresése

A sejteket patch clamp mérés során az IC oldatba beoldott 1mM koncentrációjú biocitinnel¹¹ töltöttem fel. A sejt kultúrákat a mérést követően 4%-os PBS-ben oldott paraformaldehid oldattal (20 min) fixáltam. PBS-sel történt mosás után a sejtmembránt 5 percig 0,1% -os TritonX (PBS)-el permeabilizáltam, majd PBS-sel történt mosás után a nem specifikus kötőhelyeket 2% BSA, 0,1% NaN₃ tartalmú oldattal szobahőmérsékleten 1 órán keresztül blokkoltam. A mintákat anti-III β -tubulin (egér; 1:1000, Exbio) ellenanyaggal 4°C-on egy éjszakán át inkubáltam. PBS-sel történt mosás után a mintákat anti-egér-Alexa488-al (kecske; 1:500, Invitrogen) és a feltöltött sejtekben lévő biocitinhez kötődő Streptavidin-TRITC-el (kecske; 1:300, Invitrogen) szobahőmérsékleten 1 órán keresztül inkubáltam. A lemezek fedését Mowiol fedőanyaggal végeztem. A mikroszkópos felvételeket Zeiss Observer Z1 fluoreszcens mikroszkóppal, 20x nagyítás mellett Zen (Zeiss) szoftverrel készítettem (3.ábra).



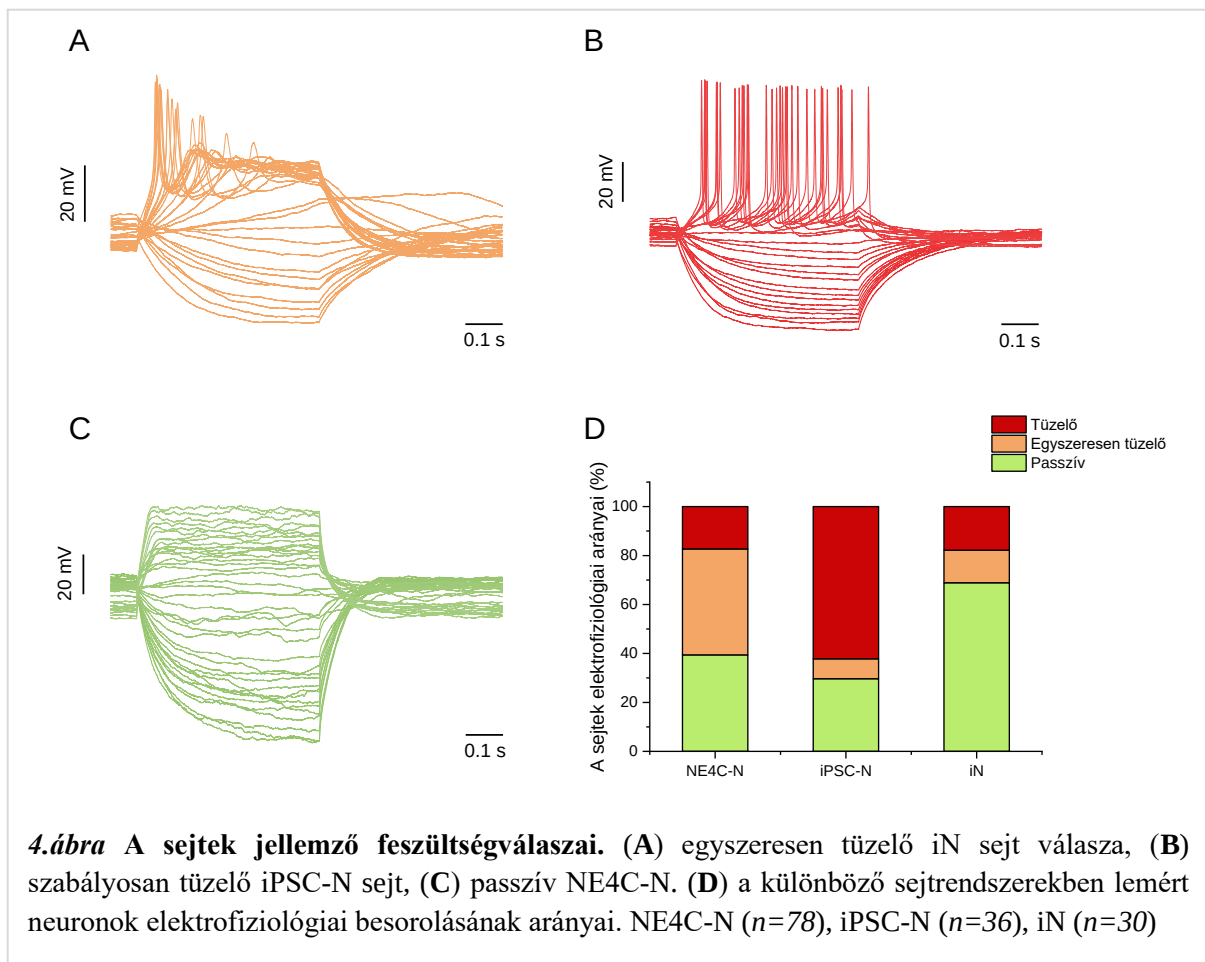
3. ábra A patch-clamp mérés során jellemzett neuronok immuncitokémiai azonosítása. A megszúrta sejtet (NE4C-N, A) a patch-clamp mérés alatt biocitinnel töltöttem fel, melynek jelét immunfestéssel azonosítottam (C, A, B: cián), neuronális markerként III β -tubulin immunjelölést használtam (A, B: zöld). A sejtmagokat DAPI festéssel (A, B: piros) tettem láthatóvá. A patch mérés mikroszkópos képét az immunjelöléssel korreláltam (A). A, B, C kép az A ábra jelzett területét mutatja nagyítva. A mérce: 50 μ m.

¹¹ A biocitin a sejtek utólagos immuncitokémiai azonosítását segíti elő, a sejtekre nincs toxikus hatással.

6. Eredmények

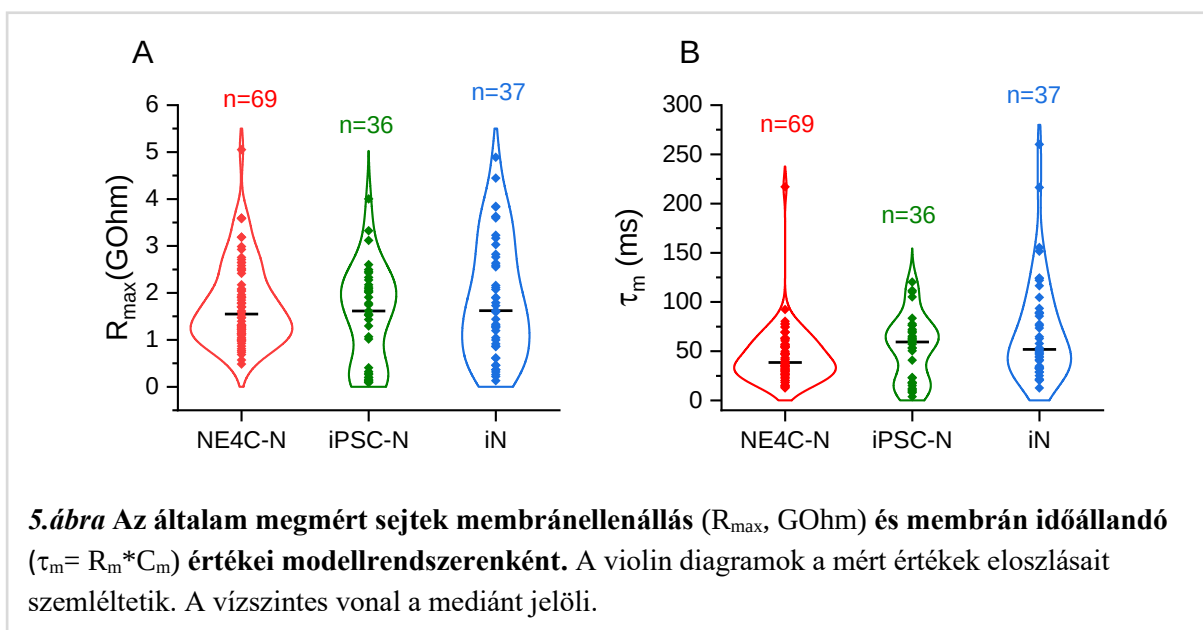
6.1. Különböző érettségű és fenotípusú neuronok azonosítása

Az általam mért sejteket azok feszültségválaszai és elektrofiziológiai tulajdonságai alapján 3 csoportra osztottam fel: **passzív** (4.C ábra, *akciós potenciált nem produkáló*), **egyszeresen tüzelő** (4.A ábra, *single spiking*), illetve **ismétlődő tüzelést mutató** (4.B ábra, *firing*) sejteket különböztettem meg. A vizsgált sejtek mérsékelt depolarizáltak voltak, tipikusan -30 és -45 mV közötti nyugalmi membránpotenciállal. Ahhoz, hogy megfigyelhessem a neuronok akciós potenciált generáló képességét, célszerű volt azok membránpotenciálját -50 mV-ra leszállítani, ezt egy folyamatos „holding áram injekcióval” értem el. Az áramlépcsőket +2 pA -es inkrementummal erről az szintről indítottam, a legnegatívabb lépcső -20 pA volt.



A folyamatosan tüzelő neuronok a beinjektált áramlépcső hatására 5-10 Hz frekvencián képesek akciós potenciálokat generálni, míg más neuron csoportokban sokkal lassabb, adaptálódó frekvenciájú akciós potenciálokat lehet csak kiváltani. Az aktív membránok

esetében a biofizikai jellemzők mellett megjelennek a passzív membrán tulajdonságok jellegzetességei is. Az általam megmért sejtek spike amplitúdó (SpAmp, mV), spike félszélesség (SpHW, ms), membránellenállás (R_{max} , GOhm), illetve membrán időállandó ($\tau_m = R_m * C_m$, ms)¹² értékeit modellrendszerenként ábrázoltam (5-6. ábra). A *passzív sejtek* esetében időnként rektifikációs jelenség volt észlelhető, amely a kimenő feszültségfüggő kálium áramok működése miatt jön létre, ez a depolarizáló áramimpulzusok adásakor a membránellenállás csökkenését okozza (4.C ábra). Depolarizáló irányú feszültség-hajlás, az ún. voltage sag nem volt megfigyelhető. A mérések során modellrendszerenként meghatároztam az egyes tüzelési típusba tartozó neuronok arányát is (4.D ábra).



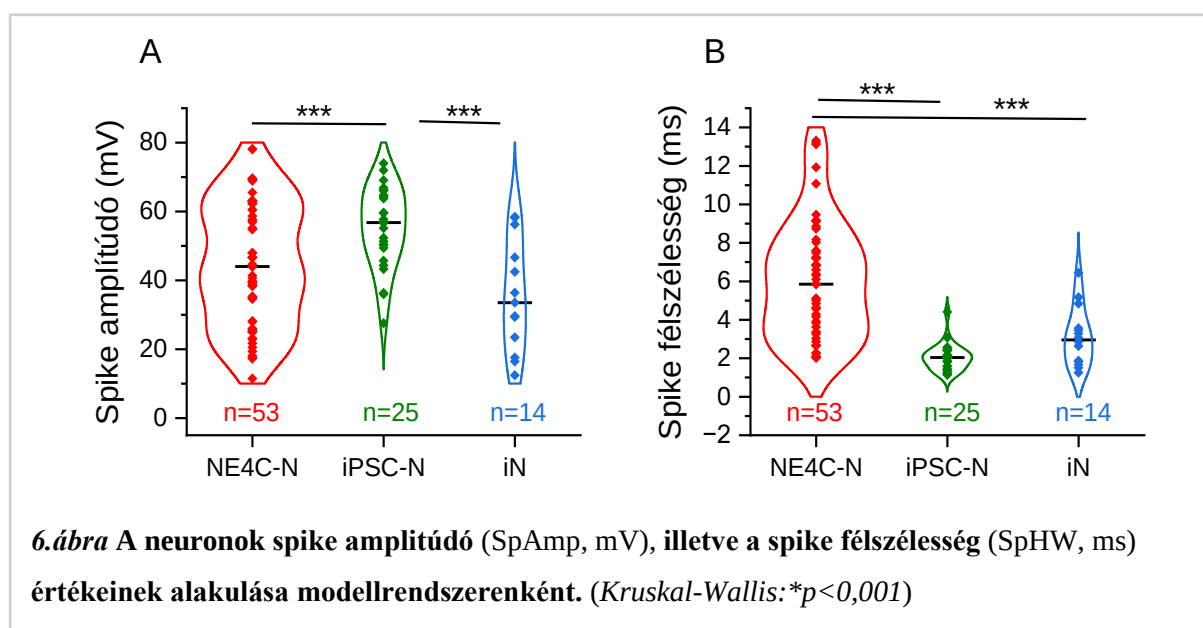
6.2. Az NE-4C egér neuroektodermális őssejtvonalból differenciálódó idegsejtek (NE4C-N) vizsgálata

Az egér neuronális őssejtekből képzett tenyészetekben többféle elektrofiziológiai tulajdonságú sejt volt azonosítható, amelyek a sejtek érettségi szintjét is jól reprezentálták. A sejtek membránpotenciálja az esetek többségében időben fluktuáló, „zajos” volt (4.C ábra). Ez a membránzaj nem szinaptikus bemenetek következménye volt, hanem valószínűsíthetően a membrán ioncsatornáinak szabálytalan működését jelezte. A bemenő rektifikációt okozó káliumáram (K_{ir} -áram) hatása is megfigyelhető volt egyes esetekben. Ezen káliumcsatornák hiperpolarizáció hatására aktiválódnak, ezáltal a membránellenállás csökken, amikor a sejt

¹² τ_m (membrán időállandó), R_m (membránellenállás), C_m (membránkapacitás)

negatív áram stimulációt kap. A spike amplitúdó és a félszélesség is a Na^+ és K^+ ionáramok erősségétől függ. Ha az adott sejt sok Na^+ - és K^+ - iont képes ioncsatornáin átengedni, akkor egy magas és keskeny szélességgel rendelkező akciós potenciál jelenik meg, ha pedig ezen ionáramok gyengébbek a sejtben, akkor az elektrofiziológiai válasz is egyre elnyújtottabb, szélesebb lesz (ún. spikelet). Az egyes neuroncsoportok elektrofiziológiai tulajdonságainak hátterében a csoportokra specifikusan jellemző, egyedi membrán ioncsatorna összetétel állhat.

A **NE-4C neuronok (NE4C-N)** esetén a válaszok mindkét formája megfigyelhető volt. Az $R_{\max}$ értékek az érett központi idegrendszeri neuronok esetében tipikusan a pár száz MOhm-os tartományban variálnak, az általam mért sejtekben ezen értékek többsége viszont 1 GOhm felett volt. A három sejtszisztéma esetében ezen értékek mediánja közel megegyező volt (**5.A ábra**). Az **NE4C-N** sejtek spike amplitúdó értékei leggyakrabban 45 mV-os értékeknél találhatók (**6.A ábra**). A félszélesség értékek 4-8 ms-os tartományba esnek (**6.B ábra**), ennek megfelelően az akciós potenciálok még nem gyors lefutásúak. A membrán időállandó az NE4C-N esetében a legkisebb értéket mutatta (50 ms alatti értékek) (**5.B ábra**). Az általam mért sejtek eloszlása a következő volt: 17,3% tüzelő, 43,3% egyszeresen tüzelő és 39,4% passzív sejt (**4.D ábra**).



6.3. Humán iPSC-N sejtek elektrofiziológiai elemzése

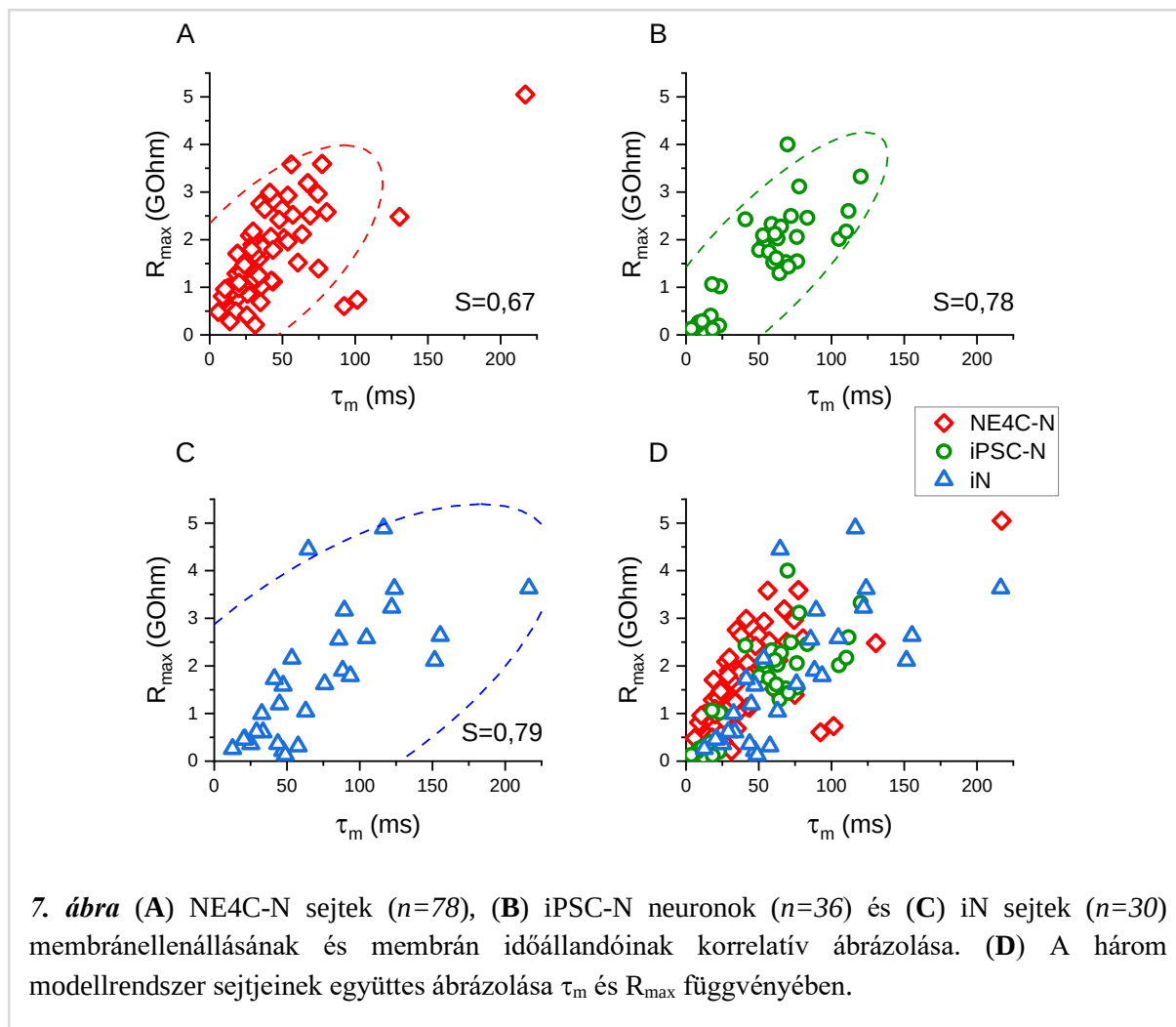
Az esetek többségében az iPSC-N sejtek élettani tulajdonságait a DIV 40-50-es korokban mértem meg, és az NE-4C sejtekkel nagyrészt megegyező elektrofiziológiai tulajdonságokat figyeltem meg.

Az iPSC-N sejtek spike amplitúdó értékeit megfigyelve a következőket állapíthatjuk meg. A sejtekben markáns Na- és K-ionáramok fejeződnek ki, amelyek éles spike-ok genereálását teszik lehetővé. Az érettségi állapotuk a spike amplitúdók értékeiben és félszélességben megfelelően tükröződött (**6.A-B ábra**). Az $R_{\max}$ értékek leginkább 2 és 3 GOhm körül csoportosultak (**5.A ábra**). Ezen neurális modell rendelkezett a legnagyobb membránellenállással. A repetitíven tüzelő sejtek ezen modellben jelentek meg a legnagyobb számban (**4.D ábra**). A sejtek megoszlása következőképpen alakult: 62,2% tüzelő, 8,1% egyszeresen tüzelő és 29,7% passzív sejt.

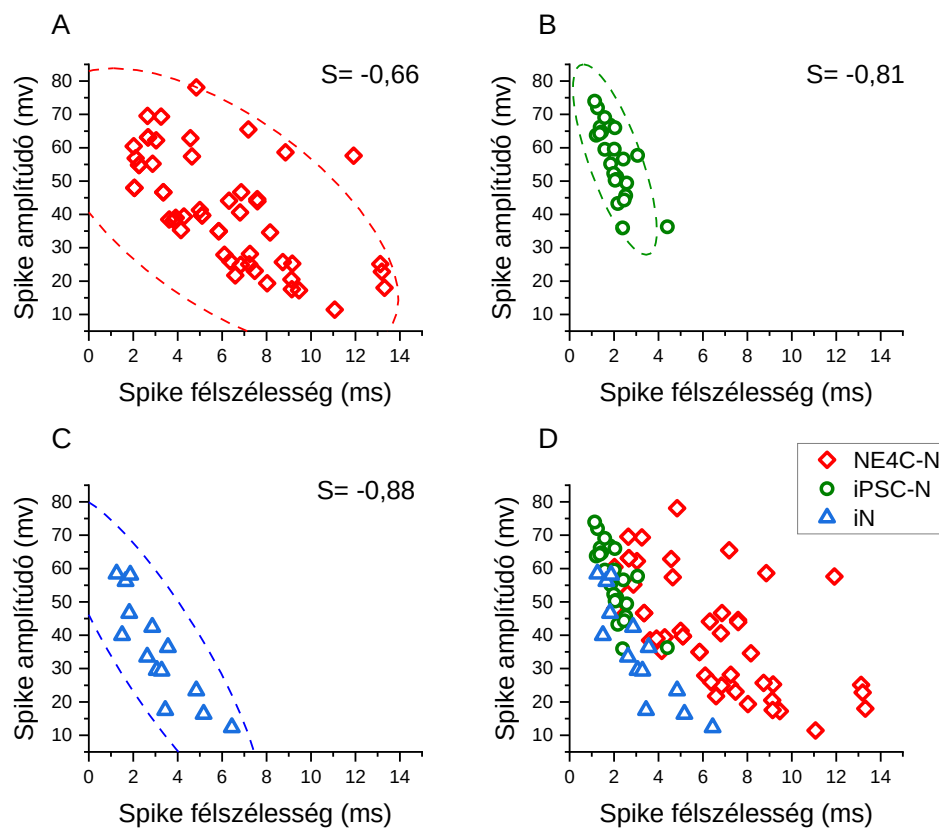
6.4. Humán iN sejtek vizsgálata

A spike félszélesség és az amplitúdó ábrázolásakor jól megfigyelhető, hogy az iN neuronok értékei a másik két modelltől markánsan elkülönültek (**6. ábra**). A patch clamp méréseim során ezen sejttrendszerből keletkezett a legkevesebb mérési eredményem. Az időállandó és a membránellenállás értékei eléggé szórnak (**5. ábra**). A membránellenállás medián értéke 1,5 GOhm-nál látható (**5.A ábra**), míg a másik két csoportnál az értékek jobban koncentrálnak. Ezen jelenség a humán iN sejtek magas élettani, biofizikai diverzitására enged következtetni. A sejtek csoportosítása az alábbi arányok szerint alakult: 17,8% tüzelő, 13,3% egyszeresen tüzelő és 68,9% passzív sejt (**4.D ábra**). A sejtek spike amplitúdó értékei leggyakrabban 60 mV-os értékeknél találhatók (**6.A ábra**). A félszélesség értékek 2-4 ms-os tartományba esnek (**5.B ábra**).

A sejttípusok kvantitatív osztályozásánál a sejtre jellemző paraméterek közül többek között a membránellenállás, a tüzelés áramküszöbe (reobázis), valamint a spike-ok száma és szélessége is meghatározó. A modellek összeállításának talán egyik leglátványosabb módja az $R_{\max}$ és τ_m értékek korrelációs ábrázolása (**7. ábra**). Ennek meghatározásához a sejttrendszerek adatait külön is ábrázoltam (**7.A-C ábra**), és a kapott adatokra statisztikai korrelációt alkalmaztam (Spearman korreláció). A korrelációs koefficiensekre pozitív értékeket kaptam, ami nem meglepő, hiszen a membránellenállás és a membrán időállandója egyszerű matematikai összefüggéssel írható le: a membrán időállandója az ellenállás és a membránkapacitás szorzata. Az iN és iPSC-N sejt kultúrák ezen paraméterek függvényében közel megegyezők voltak (**7. B-C ábra**).

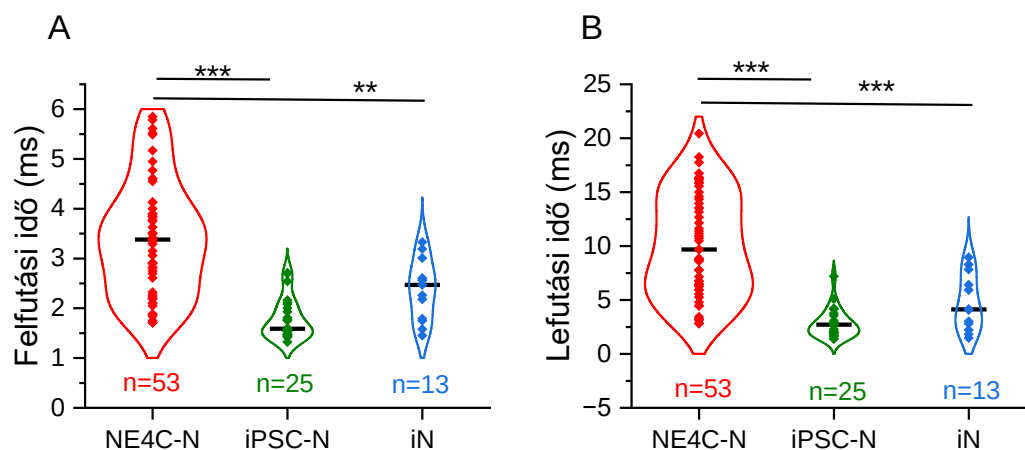


A sejttrendszerek ellentétes viselkedése miatt külön is megvizsgáltam a spike amplitúdó és a spike szélesség kapcsolatát. Ennek érdekében a spike amplitúdó függvényében ábrázoltam a spike félszélességet. Eredményként egy negatív meredekségű pontthalmaz rajzolódott ki, ami tisztán demonstrálja a két paraméter közötti negatív korrelációt (8.D ábra). Az adatokra meghatározott Spearman korrelációs együtthatók (S_{corr}) szintjének értékei a modellek közötti szoros kapcsolatot támasztják alá. A korreláció értékei jól demonstrálják a modellek elektrofiziológiai elkülönülését, illetve közös tulajdonságait (8. ábra). A Spearman korrelációban negatív értékek is megfigyelhetők, ezen statisztikai értékek a spike szélesség csökkenését jelzik (8.A-C ábra). Az adatok szórása az NE4C-N sejtekben a legmagasabb, és ez populáció jól elkülönül a humán sejtektől.

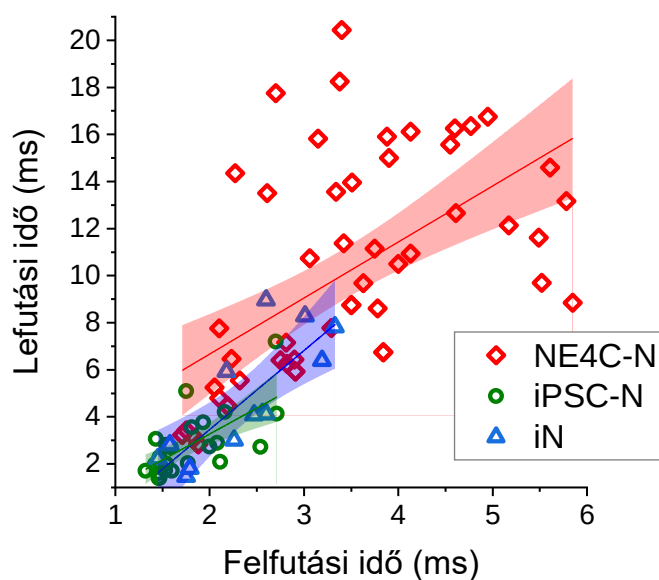


8. ábra: (A) Az NE-4C sejtek ($n=34$) (B) az iPSCN sejt-kultúrából mért sejtek akciós potenciál-jellemzői ($n=25$) és (C) az iN sejtek adatai ($n=13$). (D) A három modell együttes ábrázolása- spike amplitúdó értékei a spike szélesség függvényében. A korrelációk mértékét a Spearman korrelációs együtthatóval jelöltem az egyes diagramokon.

A neuronok dinamikus tulajdonságait az általuk kialakított akciós potenciálok szempontjából is megvizsgáltam. A jellemzéséhez az *akciós potenciál-csúcs* legmagasabb értéke, valamint az *akciós potenciál csúcsát követő lefutási szakasz/időszak* értékeit ábrázoltam (9. ábra). Ezen esetben az egér és humán sejtmodellrendszerek közötti különbség a legszembetűnőbb. Az NE4C-N sejtekre lényegesen lassabb lefutású és kevésbé gyors akciós potenciál jellemző. Ezzel ellentétben az iN és iPSC-N sejttenyészeteknél sokkal dinamikusabb és érettebb akciós potenciál alak, valamint az ezt követő rövidebb lefutási idő volt a jellemző (9. ábra). A két paraméter kapcsolatát ez esetben is megvizsgáltam. (10. ábra) A spike lefutási időket a felfutási idők függvényében ábrázolva pozitív korrelációkat kaptam. A pontfelhőkre illesztett regressziós egyenesek meredeksége meglepő módon nagyon hasonló volt a 3 modell esetén (10. ábra). Eszerint a felfutási és lecsengési idők aszimmetriájának mértéke meglehetősen konzisztens a sejt típusok között, nem függ a differenciációs protokolltól.



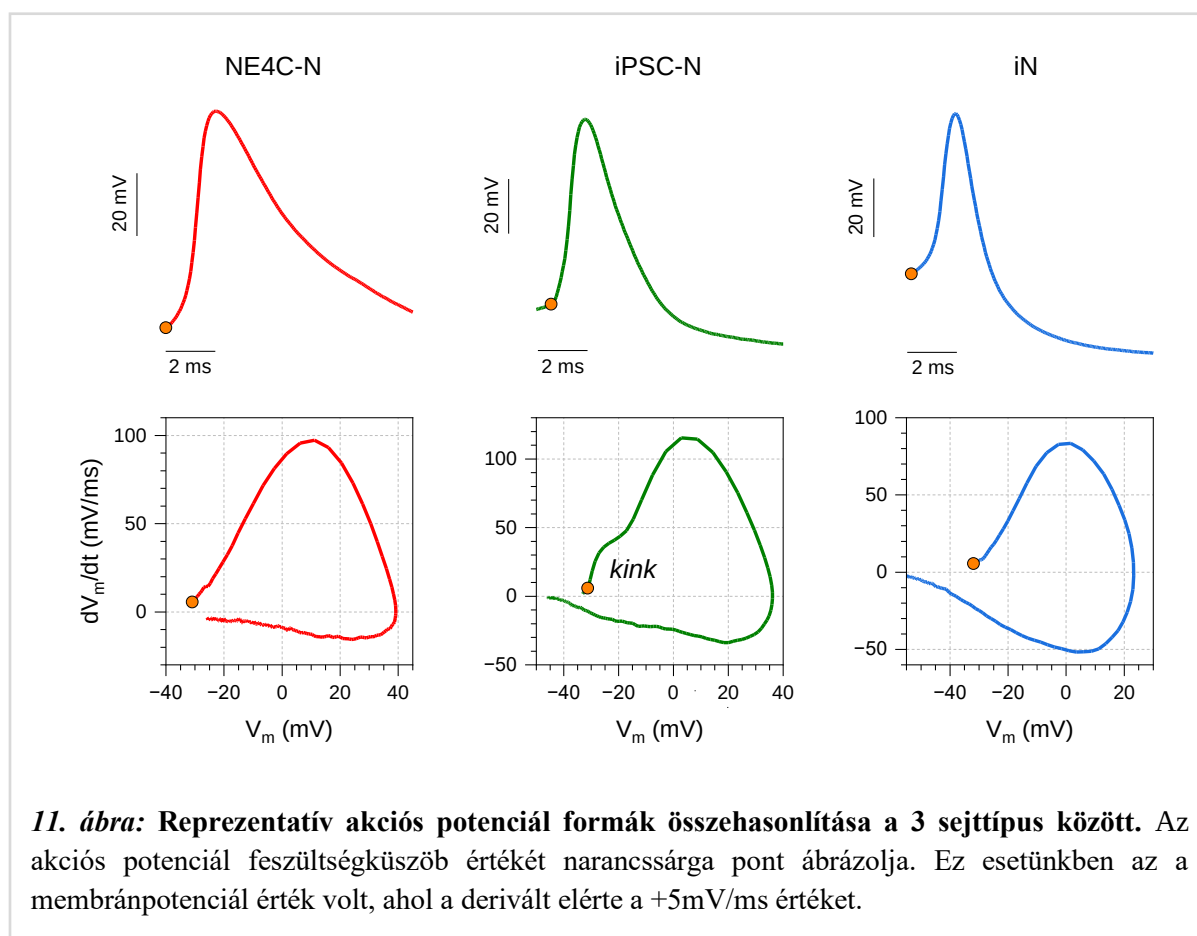
9. ábra Spike felfutási (A) és lecsengési (B) időértékek eloszlása a 3 modellrendszerben. A legnagyobb szórást az NE4C-N sejteknél látjuk, az iPSC-neuronok pedig a leghomogénebb populációt alkotják.



10. ábra A lefutási idő a felfutási idő függvényében. A kapott adatokon egy ANOVA tesztet futtattam le. A p értéke ($p < 0.001$). A humán sejt kultúrák között szignifikáns különbség nem volt észlelhető, ezzel szemben az egér eredetű sejtek egy jóval szétterültebb adatteret rajzoltak ki.

6.5. A modellrendszerek neuronjaiban megfigyelhető akciós potenciálok kinetikai összehasonlítása

Észleléseim arra utaltak, hogy a 3 modellrendszer neuronális fenotípusainak akciós potenciáljai különböző paraméterekkel rendelkeznek. Emiatt az analízist további vizsgálatokkal egészítettem ki. Ismeretes, hogy az emlős idegrendszer neuronjai által generált akciós potenciálok alakjának elemzésével információt nyerhetünk a szomatikus, illetve axonális Na-spike-ok működéséről, valamint az axon iniciális szegmentum (AIS) érettségi szintjéről (Bean, 2007). A sejttestbe helyezett elektródával regisztrált akciós potenciál felfutásakor a membránpotenciálban időnként kisebb betörést, behajlást figyelhetünk meg (angol szakirodalomban "kink"-ként említik) (Bean, 2007). Ez a behajlás sokkal feltűnőbben jelentkezik akkor, ha az akciós potenciált nem az idő függvényében ábrázoljuk, hanem a spike időbeli meredekségét (deriváltját) ábrázoljuk a membránpotenciál függvényében (*fázisporté ábrázolás*). A fázisporté ebben a formában általában elliptikus hurkot rajzol ki, és a *kink* a hurok felszálló szakaszán jelenik meg (11. ábra, középen).



11. ábra: Reprezentatív akciós potenciál formák összehasonlítása a 3 sejtípus között. Az akciós potenciál feszültségküszöb értékét narancssárga pont ábrázolja. Ez esetünkben az a membránpotenciál érték volt, ahol a derivált elérte a +5mV/ms értéket.

Ennek a behajlásnak a jelenléte és mérete az axon iniciális szegmentum és a szóma elkülönülését jellemzi, minél feltűnőbb a *kink*, annál távolabb helyezkedik el az AIS a szómától (Shu és mtsai., 2007). Vizsgálatunkban mindhárom sejttypusban szemügyre vettük az akciós potenciálok fázisportréit (**11. ábra**). Vizsgálatomban mindhárom sejttypusban szemügyre vettem az akciós potenciálok fázisportréit (**11. ábra**) és meghatároztuk a *kink* előfordulási gyakoriságát. Ezen elemzésemben értelemszerűen a folyamatosan tüzelő, illetve az egyszeresen tüzelő sejtek szerepelnek.

A *kink* előfordulási gyakorisága az **NE4C-N** modellben 0%, az **iN** modellben 8,3% (1/12) míg az **iPSC-N** modellben 35,7% (10/28) volt. Az **NE4C-N** modellek esetén a spike-ok nagy amplitúdója ellenére azok lefutása viszonylag lassú volt (**11. ábra, bal szél**). Az **iN** sejtek akciós potenciáljai érettebbnek mutatkoztak, és a derivált értékeik is gyakran 100 mV/ms-ot értek el (**11. ábra, jobb szél**). Az **iPSC-N** sejt kultúrákban tapasztaltam a kinetikailag legérettebb, leggyorsabb spike-okat, és itt volt a *kink* is gyakran észlelhető (**11. ábra, középen**).

7. Diszkusszió

TDK munkámban egy egér és két különböző humán eredetű modellrendszer összehasonlítását végeztem el elektrofiziológiai módszerek segítségével. Méréseim során áramzár (current-clamp) üzemmódot használtam. Ebben az üzemmódban, a sejtbe vezetett áram nagysága sokféleképpen változtatható az idő függvényében. Ezen alapszik, az egyik gyakran alkalmazott megközelítés az „áramlépcsők” használata, amikor meghatározott ideig állandó nagyságú áramot injektálunk a sejtbe, illetve ennek az áramnak a nagyságát az egymást követő futtatásokban változtatjuk (Czirják, 2022).

Az általam alkalmazott current clamp technika az áramlépcsőkből felépített protokollok segítségével a nyugalmi membránpotenciált, az akciós potenciálok adatait, valamint a sejtmembrán számos élettani tulajdonságát tudtam meghatározni. Kísérleteimben a regisztrált feszültségválaszokból számos idegéletti paramétert nyerhettem ki. Ezek a membránellenállás, a membránfeszültség az időállandó és még sok egyéb. Az általam használt modellrendszerekben mért sejteket fiziológiai szempontok szerint jellemeztem és osztályoztam. A eredményeimet összesen 144 neuron (78 **NE4C-N**, 36 **iPSC-N** és 30 **iN** sejt) egészsejt patch clamp mérését és elektrofiziológiai jellemzését végeztem el.

A kutatásaim alapján megállapítható, hogy a humán **iPSC-N** sejtek alkotják a legegységesebb populációt. Emellett eredményeim jól mutatják a neurális őssejtek neuronképzésének különbségeit a két fajban. A humán idegsejtek képződése, érése a rágszálóéval összevetve lényegesen lassabb. A különböző programozási technikákkal nyert humán sejtpopulációk érési menetrendje, karaktere is eltérő. Az **iN** modell esetében észleltem a legváltozatosabb elektrofiziológiai tulajdonságokat, és az adatok szórása is magasabb volt itt, mint az **iPSC** neuronoknál tapasztalt érték. Valószínűleg többféle feszültségfüggő ionáram kifejeződése indult meg ezen sejttypusban. Ez a feszültségválaszok alakjában is megfigyelhető volt, pl. a hiperpolarizáló áramimpulzusok alatt időnként depolarizáló visszahajlást tapasztaltunk (voltage sag), vagy membránellenállás csökkenést, rektifikációt. Előbbi jelenség a hiperpolarizáció-aktiválta kationáram (h-áram) kifejeződésére utal, míg a másik jelenség a bemenő rektifikációt okozó K_{ir} -csatornák jelenlétét mutatja. Az **NE-4C** és **iPSC-N** sejtrendszerek esetében sokkal kisebb diverzitási érték volt jellemző, tehát a feszültségválaszok homogénebbek voltak, rektifikációt egyáltalán nem észleltünk.

Az **NE-4C** eredetű neuronok nem tudtak megfelelő tüzelési profilt kialakítani, valamint a sejtdegradációs értékei is magasabbak voltak a humán sejtekhez képest. Az **iPSC-N** rendszerek hosszabb ideig fenntarthatók, valamint érettebb elektrofiziológiai tulajdonságokat mutatnak.

Több esetben is jellemző volt a kifejlett neuronális morfológia, viszont ez nem mindig jelezte a sejtek érett fiziológiai tulajdonságait és markáns tüzelési válaszait. Eszerint a jellegzetes neuronális morfológiai jegyek (a biocitinnel feltöltött sejt nyúlványhálózata) és az elektrofiziológiai paraméterek csak gyengén korreláltak (nincs bemutatva). Másik megfigyelésem, hogy a felnőtt központi idegrendszeri serkentő neuronokban gyakran megfigyelhető depolarizáló feszültségvisszahajlást (voltage sag) csak elenyésző számú mérésünkben tapasztaltam és kizárólag az **iN**-ekben. Ez az észlelés a HCN-csatornák (hyperpolarization activated cyclic nucleotidic gated nonselective cationic channels) hiányára utal az **NE4C-N** és **iPSC-N** sejtpopulációkban. Tehát megállapítható, hogy a direkt közvetlenül fibroblaszokból differenciáltatott **iN** neuronok biofizikailag érettebb profillal rendelkeztek, mint az **iPSC-N** modellekben. Ez utóbbiakban viszont a gyakori *kink* strukturális érettségre utal. Az **iPSC** sejtekből viszonylag nagyobb arányban keletkeznek neuronok, amelyek megfelelő tüzelési karakterisztikával rendelkeznek, biofizikailag egyszerűbbek. A közvetlen átprogramozás kisebb számú neuront (**iN-t**) eredményez, viszont azok változatosabb biofizikai tulajdonságokat mutatnak, valószínűleg feszültségfüggő ionáramaik is divezebbek.

Megfigyeléseim egyik legvalószínűbb magyarázata a sejt kultúrák eltérő életkorában, valamint a sejtek eltérő differenciálási eljárásaiban keresendő. Az **iPSC-N** és **NE4C-N** sejt kultúrák esetében az összejtekből kezdődik meg a differenciáció, míg az **iN** sejtek esetén a minta tartalmazza a páciens genetikai tulajdonságait is. Az **iPSC-N** modellek identitásukat "elfelejtve", genetikai visszafiatalítást követően esnek át a differenciáció folyamatán. Ezen túlmenően a *kink* jelenléte is jól szemléltette, hogy az **iPSC-N** sejtmodellek esetében sokkal nagyobb arányban fordultak elő érett karakterisztikával jellemezhető neuronok, míg az **NE4C-N** és **iN** sejt kultúrákban ezen tüzelési profil nem, vagy csak egyszeri esetben volt jelen. Az akciós potenciálok szimmetriai tulajdonságai meglehetősen konzisztensek/invariánsak mind három modellrendszer esetében. Ezt a lineáris illesztés is igazolja.

Összegezve a neuronális összejt kultúrák nagyon ígéretes modellként szolgálnak a celluláris neurobiológiai kutatásokban. A közeljövőben a méréseknél még tovább szeretnénk növelni az elemszámot, mivel az adatok szórása jelentős, így ezek csak előzetes eredménynek tekinthetők. További vizsgálatokat fogok végezni az **iPSC-N** és **iN** neuronális sejttenyészetekben.

A megfigyelt eredmények az alkalmazott differenciációs protokolloktól rendkívül eltérőek lehetnek és az így kialakult neuronok elektrofiziológiai tulajdonságai is különbözhetnek egymástól. Az adatok relevanciája sokszor bizonytalan és a fajok közötti összehasonlíthatóság mindig kérdéses lesz. Ezért a különböző modellrendszerek mély szintű összevetésénél gyakran kaphatunk különbségeket, melyek részben az eltérő fejlődési sebességből (egér és humán),

részben pedig a differenciáltatási eljárásból adódhatnak. A dolgozatban bemutatott összehasonlítások abban segíthetnek a tudományos közösségnek, hogy megtaláljuk azokat a paramétereket, amelyek mentén a neuronális jellemzés megfelelő küszöb szintjeit határozhatjuk meg. A későbbiekben az említett eljárások csökkenthetik a publikációkban megfigyelhető adatok variációját és összehasonlíthatóbbá teszi a kísérleteket, abban az esetben, hogy ha érett neuronnak az adott küszöb feletti paramétert vagy tulajdonságot mutató sejtet tekintik a kutatók.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetem témavezetőimnek, Dr. Szűcs Attilának és Dr. Tárnok Krisztiánnak. Általuk ismerhettem meg az elektrofiziológia és az idegi sejtbiológia világát. Hálás vagyok, hogy munkámat mindvégig türelemmel, megértéssel és bizalommal kísérték végig. Nemcsak szakmai inspirációt, de emberi példát is mutattak számomra. Köszönettel tartozom Dr. Jerome Mertens és doktorandusza, Jessica Lagerwall szíves közreműködéséért, valamint a humán sejttenyészetek kivitelezéséért. Szeretném megköszönni Dr. Schlett Katalinnak, aki az ELTE Élettani és Neurobiológiai Tanszék Idegi Sejtbiológiai Kutatócsoportjába befogadott, valamint a kutatómunka lehetőségét biztosította. Továbbá külön köszönet illeti Rátkai Anikót és Bauer Krisztinát a folyamatos segítségért, amit a tenyészetek előállításában, fenntartásában, valamint a mikroszkóp használat során nyújtottak. Nem utolsó sorban hálával tartozom a kutatócsoport minden tagjának a támogató, családi környezet megteremtéséért.

Kutatásunkat a Richter Gedeon Nyrt. RG-IPI-2020-TP14/025 számú témapályázata (T. K.) és az NKFIH ANN_135291 számú alapkutatási pályázata (Sz. A.) támogatta.

9. Szerzői hozzájárulás

- A dolgozatban bemutatott mérésekhez felhasznált NE-4C tenyészeteket én állítottam elő. Az iPSC-N és iN tenyészetek kialakítását együttműködő partnerünk (Mertens Laboratory Innsbruck) végezte, a sejtek Budapestre érkezését követően a tenyészek fenntartását a laboratórium munkatársaival közösen végeztem.
- Az elektrofiziológiai kísérleteket Dr. Szűcs Attila felügyelete alatt, de alapvetően önállóan végeztem. Az adatok kiértékelését a NeuroExpress és Origin Pro és programokkal önállóan végeztem el, valamint a dolgozatban bemutatott ábrákat is én készítettem.
- Az elektrofiziológiai mérések során biocitinnel feltöltött sejtek immuncitokéimai azonosítása, a mintákról mikroszkópos felvételek készítése szintén saját munkám.

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

10. Irodalomjegyzék

1. Dawson, T.M.; Golde, T.E.; Lagier-Tourenne, C. Animal models of neurodegenerative diseases. *Nat. Neurosci.* 2018, 21, 1370–1379.
2. Cummings, J. Lessons Learned from Alzheimer Disease: Clinical Trials with Negative Outcomes. *Clin. Transl. Sci.* 2018, 11, 147–152.
3. Pasteuning-Vuhman, S., de Jongh, R., Timmers, A. and Pasterkamp, R. J. Towards Advanced iPSC-based Drug Development for Neurodegenerative Disease. *Trends in Molecular Medicine* 27, 263–279 (2021).
4. Smith, A. (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 441(7097), 1060.
5. Szabó G. Sejtsorsok és differenciálódás, in *Sejtbológia*, G. Szabó, Editor. 2009, Medicina Budapest: Könyvkiadó; p. 557–572.
6. Vasan, Lakshmy, Eunjee Park, Luke Ajay David, Taylor Fleming, and Carol Schuurmans, 'Direct Neuronal Reprogramming: Bridging the Gap Between Basic Science and Clinical Application', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9 (2021)
7. Avior, Y., Sagi, I., & Benvenisty, N. (2016). Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(3), 170–182.
8. Siller R, Greenhough S, Park IH, Sullivan GJ. Modelling human disease with pluripotent stem cells. *Curr Gene Ther.* 2013 Apr;13(2):99-110.
9. Schlett K, Herberth B, Madarász E. In vitro pattern formation during neurogenesis in neuroectodermal progenitor cells immortalized by p53-deficiency. *Int J Dev Neurosci.* 1997 Oct;15(6):795-804.
10. Tárnok K, Pataki A, Kovács J, Schlett K, Madarász E. Stage-dependent effects of cell-to-cell connections on in vitro induced neurogenesis. *Eur J Cell Biol.* 2002;81(7):403-412.
11. Zhang J, Yang H, Wu J, Zhang D, Wang Y, Zhai J. Recent progresses in novel *in vitro* models of primary neurons: A biomaterial perspective. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:953031. Published 2022 Aug 17.
12. Yang W, Yuste R. In vivo imaging of neural activity. *Nat Methods.* 2017;14(4):349-359.
13. Jones-Villeneuve EM, Rudnicki MA, Harris JF, McBurney MW. Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 1983 Dec;3(12):2271-9.

14. Renart, Alfonso, and Christian K Machens, 'Variability in Neural Activity and Behavior', *Current Opinion in Neurobiology, Theoretical and computational neuroscience*, 25 (2014), 211–20
15. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.
16. aShi, Y.; Inoue, H.; Wu, J.C.; Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017, 16, 115–130.
17. Svendsen, C.N. Back to the future: how human induced pluripotent stem cells will transform regenerative medicine. *Hum Mol Genet*, 2013. 22(R1): p. R32-8
18. Czirják G., Bevezetés a cellurális elektrofiziológia területére; 2022, Semmelweis Budapest: Könyvkiadó; p. 99–100.
19. Zeltner, N. and Studer, L. Pluripotent stem cell-based disease modeling: current hurdles and future promise. *Curr Opin Cell Biol*, 2015. 37: p. 102-10.
20. Park TI, Schweder P, Lee K, et al. Isolation and culture of functional adult human neurons from neurosurgical brain specimens. *Brain Commun*. 2020;2(2):fcaa171. Published 2020 Oct 17.
21. Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., Tabar, V., Sadelain, M., and Studer, L. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*, 2009. 461(7262): p. 402-6.
22. Vera, E., Bosco, N., and Studer, L. Generating Late-Onset Human iPSC-Based Disease Models by Inducing Neuronal Age-Related Phenotypes through Telomerase Manipulation. *Cell Rep*, 2016. 17(4): p. 1184-1192.
23. Lo Sardo, V., Ferguson, W., Erikson, G.A., Topol, E.J., Baldwin, K.K., and Torkamani, A. Influence of donor age on induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2017. 35(1): p. 69-74.
24. Mertens, J., Reid, D., Lau, S., Kim, Y., and Gage, F.H. Aging in a Dish: iPSC-Derived and Directly Induced Neurons for Studying Brain Aging and Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Genet*, 2018. 52: p. 271-293.
25. Gunhanlar, N., Shpak, G., van der Kroeg, M., Gouty-Colomer, L.A., Munshi, S.T., Lendemeijer, B., Ghazvini, M., Dupont, C., Hoogendijk, W.J.G., Gribnau, J., de Vrij, F.M.S., and Kushner, S.A. A simplified protocol for differentiation of electrophysiologically mature neuronal networks from human induced pluripotent stem cells. *Mol Psychiatry*, 2018. 23(5): p. 1336-1344.

26. Traxler, L.; Edenhofer, F.; Mertens, J. *Next-generation disease modeling with direct conversion: a new path to old neurons*; 2019;
27. Boland, M.J., Nazor, K.L., Tran, H.T., Szücs, A., Lynch, C.L., Paredes, R., Tassone, F., Sanna, P.P., Hagerman, R.J., and Loring, J.F. Molecular analyses of neurogenic defects in a human pluripotent stem cell model of fragile X syndrome. *Brain*, 2017. 140(3): p. 582-598.
28. Huh, C.J., Zhang, B., Victor, M.B., Dahiya, S., Batista, L.F., Horvath, S., and Yoo, A.S. Maintenance of age in human neurons generated by microRNA-based neuronal conversion of fibroblasts. *Elife*, 2016. 5.
29. Kim, Y., Zheng, X., Ansari, Z., Bunnell, M.C., Herdy, J.R., Traxler, L., Lee, H., Paquola, A.C.M., Blithikioti, C., Ku, M., Schlachetzki, J.C.M., Winkler, J., Edenhofer, F., Glass, C.K., Paucar, A.A., Jaeger, B.N., Pham, S., Boyer, L., Campbell, B.C., Hunter, T., Mertens, J., and Gage, F.H. Mitochondrial Aging Defects Emerge in Directly Reprogrammed Human Neurons due to Their Metabolic Profile. *Cell Rep*, 2018. 23(9): p. 2550-2558.
30. Horvath, S., Oshima, J., Martin, G.M., Lu, A.T., Quach, A., Cohen, H., Felton, S., Matsuyama, M., Lowe, D., Kabacik, S., Wilson, J.G., Reiner, A.P., Maierhofer, A., Flunkert, J., Aviv, A., Hou, L., Baccarelli, A.A., Li, Y., Stewart, J.D., Whitsel, E.A., Ferrucci, L., Matsuyama, S., and Raj, K. Epigenetic clock for skin and blood cells applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and ex vivo studies. *Aging (Albany NY)*, 2018. 10(7): p. 1758-1775.
31. Traxler, L., Herdy, J. R., Stefanoni, D., Eichhorner, S., Pelucchi, S., Szücs, A., Santagostino, A., Lagerwall, J., Schlachetzki, J. C. M., Galasko, D., Gage, F. H., D'Alessandro, A., & Mertens, J. (2022). Warburg-like metabolic transformation underlies neuronal degeneration in sporadic Alzheimer's disease. *Cell Metabolism*, 1–16.
32. <https://www.originlab.com/index.aspx?go=Products/Origin>
33. Abu-Abed S, Dollé P, Metzger D, Beckett B, Chambon P, Petkovich M. The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev.* 2001 Jan 15;15(2):226-40.
34. Diez del Corral R, Olivera-Martinez I, Goriely A, Gale E, Maden M, Storey K. Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal

- differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron*. 2003;40(1):65-79.
35. M. Jelitai and others, 'Role of γ -Aminobutyric Acid in Early Neuronal Development: Studies with an Embryonic Neuroectodermal Stem Cell Clone: GABA in Early Neuronal Development', *Journal of Neuroscience Research*, 76.6 (2004), 801–11
 36. Madeline A. Lancaster and others, 'Cerebral Organoids Model Human Brain Development and Microcephaly', *Nature*, 501.7467 (2013), 373–79
 37. Thomas Vierbuchen and others, 'Direct Conversion of Fibroblasts to Functional Neurons by Defined Factors', *Nature*, 463.7284 (2010)
 38. Bruce P. Bean, 'The Action Potential in Mammalian Central Neurons', *Nature Reviews Neuroscience*, 8.6 (2007)
 39. Shu Y, Duque A, Yu Y, Haider B, McCormick DA. Properties of action-potential initiation in neocortical pyramidal cells: evidence from whole cell axon recordings. *J Neurophysiol*. 2007;97(1):746-760.
 40. <https://www.researchgate.net/project/NeuroExpress-Analysis-software-for-whole-cell-electrophysiological-data>