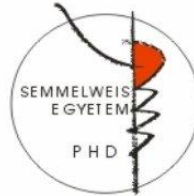


A központi idegrendszeri sejtek metabolikus profilja

Doktori tézisek

Dr. Nagy Ádám Miklós

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezetők:

Dr. Ádám Veronika, *az MTA rendes tagja, egyetemi tanár*

Dr. Tretter László, *az MTA doktora, tanszékvezető egyetemi tanár*

Hivatalos bírálók:

Dr. Kardon Tamás, *PhD, egyetemi docens*

Dr. Márk László, *PhD, egyetemi docens*

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Mandl József, *az MTA rendes tagja, professor emeritus*

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Zelles Tibor, *PhD, egyetemi docens*

Dr. Csala Miklós, *az MTA doktora, egyetemi tanár*

Budapest
2018

„Felfedezni valamit annyit tesz, mint látni, amit mindenki lát és közben arra gondolni, amire még senki.”

Szent-Györgyi Albert

BEVEZETÉS

Míg az agy testünk tömegének mindössze 2%-a, a teljes test oxigén felhasználásának 20%-áért, glukóz felhasználásának pedig akár 50%-áért is felelős lehet. Más szövetekkel összehasonlítva az agy kiemelkedően magas energiaigénnyel rendelkezik, amelynek fedezését térben és időben rendkívül finoman összehangolt szabályozási mechanizmusok teszik lehetővé. Ezen regulált folyamatok közé sorolható a központi idegrendszeri sejtek funkcionális anatómiai szerveződésének dinamikusa, valamint a cerebroszpinális folyadékban megtalálható energiador metabolitok transzport és anyagcsere folyamatai.

Az agyi bioenergetika kutatásában hosszú időn keresztül az idegsejtek anyagcsereje és a glukóz kizárólagos energiador szerepe állt a középpontban. Az utóbbi három évtized kutatási eredményei azonban az anyagcsere korábbi neurocentrikus felfogásánál sokkal komplexebb képet mutatnak. A központi idegrendszerben megtalálható gliasejteket (asztroglia, oligodendroglia és mikroglia sejtek) az idegsejtekkel szemben sokáig metabolikus szempontból közömbös sejtekként tartották számon. Ezt a nézetet megváltoztatta a gliasejtek egyedi funkcióinak felfedezése, különösképpen az energia szubsztrátok metabolizmusában, termelésében, raktározásában és szállításában betöltött szerepük. FDG-PET és fMRI vizsgálatok eredményei igazolják a központi idegrendszeri gliasejtek és neuronok közötti funkcionális anatómiai szerveződést és metabolikus kapcsolatot. A gliasejtek anyagcsere sajátosságainak felfedezése, valamint a neuronok és gliasejtek közötti szerteágazó metabolikus kapcsolatok feltérképezése így alapvető szerepet játszik az agy funkcióinak megértésében.

Doktori munkám során a kifejlett és fejlődő agy sejtípusain végeztem *in vitro* kísérleteket. A gliasejtek közül az aktív hely- és helyzetváltoztató mozgásra képes mikroglia sejtek bioenergetikai funkcióit vizsgáltam. A központi idegrendszer elsődleges immunvédelméért felelős mikroglia sejtpopulációk az agyban rendkívül heterogén eloszlást mutatnak. Ezek a sejtek képesek az agy régiói közötti migrációra, amely során különböző metabolikus környezetbe kerülnek. Felmerül a kérdés, hogy melyek azok az energiadonor vegyületek, amelyeket a mikroglia sejtek képesek energiatermelésre felhasználni? A mikrokörnyezetek energia szubsztrát összetétele egyértelműen meghatározza a mikroglia sejt energianyeréshez szükséges metabolikus útvonalait. A glukóz az elsődleges, de nem kizárólagos energiadonor vegyület az agyban. Egyéb metabolitokat is képesek a központi idegrendszeri sejtek energianyerésre felhasználni. A glutamát-glutamin ciklusban résztvevő glutamin az agyban kiemelkedően magas koncentrációban előforduló aminosav, amely felveti energiadonor szerepét. Az asztrocita sejtek laktát-termelésére és a neuronok laktát-felhasználására az irodalomban számtalan példát találunk. A ketontestek (β -hidroxibutirát és acetoacetát) ugyancsak elérhetik a mM-os koncentráció-tartományt a cerebrospinális folyadékban, különösen éhezés során. Kísérletes munkám célja volt így a mikroglia sejtek által energiatermelésre fordítható szubsztrátok metabolizmusának a vizsgálata. A mikroglia sejtek bioenergetikai funkcióin kívül a fejlődő agyban végbemenő neuronális differenciáció anyagcsere sajátosságaival is foglalkoztam.

CÉLKITŰZÉSEK

Kutatómunkánk során a kifejlett idegszövetben és a fejlődő agyban előforduló sejtek bioenergetikai sajátosságait, a cerebrospinális folyadékban fiziológiás körülmények között előforduló energia szubsztrátok hasznosulásának mértékét és metabolikus útvonalait vizsgáltuk *in vitro* sejtenyészeten.

I. Egérből izolált primer mikroglia sejt kultúra és immortalizált BV-2 mikroglia sejtek szubsztrát-prefenciáját vizsgáltuk tápanyagmentes médiumban történő éheztetést követően. A sejtek oxigénfogyasztását, H^+ produkcióját, intracelluláris ATP és ADP szintjét, viabilitását, autofágia aktivitását, továbbá az apoptotikus és nekrotikus sejtek hányadát és az m-TOR szignalizációs útvonal fehérjéinek foszforiláltságát mértük és elemeztük ezek változását különböző metabolitok hatására.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

- 1) Milyen tápanyagokat képesek felhasználni a rendkívüli dinamikus sajátossággal rendelkező mikroglia sejtek?
- 2) Milyen anyagcsere útvonalakon nyernek energiát a mikroglia sejtek?
- 3) Milyen metabolikus különbségek és hasonlóságok adódnak a primer és BV-2 mikroglia sejtek között?

II. NE-4C neuronális őssejteken, valamint neuronná differenciáltatott NE-4C sejteken vizsgáltuk a glukóz és glutamin hatását a sejtek metabolizmusára. Az oxigénfogyasztás méréseket összehasonlításképp elvégeztük primer neuronális és asztroglia sejt kultúrán is.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

- 1) Változik-e az idegi őssejtek metabolizmusa a neuronális differenciáció során?
- 2) Az NE-4C őssejt neuronális differenciációja során kifejlődő neuronok anyagcseréje mennyiben hasonlít az embrionális egér agyból izolált primer neuronok metabolizmusához?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtenyészetek létrehozása és fenntartása

Az immortalizált **BV-2 mikrogli**a sejtek (ajándék prof. Rosario Donato-tól - Kísérleti Orvostudományok és Biokémiai Tudományok Intézete, Perugia, Olaszország) műanyag flaskákban tenyésztettük DMEM-alapú tenyészmédiumban. A megfelelő kitapadás eléréséhez a méréseket 24 órával megelőzően ültettük ki a sejteket mikroplate-re.

A **primer mikrogli**a sejteket 1-2 napos, újszülött, CD1 egerok előagyából izoláltuk. Egy kísérlethez elegendő sejt-kultúra előállításához 10-13 egeret használtunk fel, amely megközelítőleg 3×10^6 db mikrogli a sejtet eredményezett. A kialakuló asztrocita-mikrogli a vegyes kultúrát MEM-alapú tenyészmédiumban, petri csészékben tenyésztettük, majd az izolálást követő 24-26. napon a mikrogli a sejteket kétlépéses tripszin kezeléssel elválasztottuk az asztrocita sejtektől és kiültettük mikroplate-re. A primer mikrogli a sejteket a mérést megelőzően 48 órával ültettük ki a megfelelő kitapadás eléréséhez.

Az **NE-4C** p53-/- egérembrío elülső agyhólyagból izolált idegi összejtvonalat MEM-alapú tápoldatban, petri csészékben tenyésztettük. A sejtek passzálásával mindaddig vártunk, amíg a sejtprolifерáció el nem érte a petri csésze 85%-os lefedettségét. A tripszin kezelés során az aljzatról leváló sejteket szérum-tartalmú tenyészmédiummal felfuszuspendáltuk, majd Bürker-kamrás sejt számlálást követően a sejteket az új petri csészében egyenletesen eloszlattuk. A tenyészmédiomot hetente háromszor cseréltük a sejteken.

A konfluens NE-4C neuronális összejttenyészethez 10^{-6} M végkoncentrációjú all-transz retinsavat adtunk a neuronális differenciálódás megindítására. 48 óra elteltével a

médiomot retinsav- és szérummentes tenyészmédiomra cseréltük. A differenciált NE-4C tenyészeteken végzett metabolikus vizsgálatok az indukciót követő második héten történtek.

A *primer idegsejtek* izolálása CD1 típusú embrionális egerek (E15-E16) előagyából történt. Az agyszövet mechanikai disszociációját és a sejtek szuszpendálását MEM-alapú médiomban végeztük. A sejtszuspenziót 40-42 μm pórusátmérőjű hálón keresztül szűrtük, majd kiültettük 96 lyukú mikroplate-re az oxidáció vizsgálatához. A kiültetést követő második héten a médiomot szérummentes neuronális médiomra cseréltük. A Seahorse műszerrel végzett metabolikus vizsgálatra a sejtek kirakását követő 11-13. napon került sor.

A *primer asztrocita* sejtek izolálását késői magzati és perinatális CD1 egerek előagyából végeztük. Tenyészmédiomként MEM-alapú tápoldatot használtunk. A sejteket 96 lyukú mikroplate-re ültettük ki a mérést megelőzően 24 órával a megfelelő kitapadás eléréséhez.

Mitokondriális oxigénfogyasztás és extracelluláris pH változás mérése mikrofluorimetriás módszerrel

A letapadt sejtek oxigénfogyasztását (amely elsődlegesen a mitokondriális oxidációról ad információt), valamint az extracelluláris médiom pH változását (amely elsődlegesen a glikolízis mértékét mutatja) a mikrofluorimetriás elven működő Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyzer műszerrel követtük. A szubsztrát hozzáadása előtt a sejteket energia szubsztrátot nem tartalmazó, mesterséges cerebrospinális folyadékban (ACSF) éhezettük két órán keresztül, majd a műszerrel detektáltuk az O_2 tenzió és pH értékeket, amelyekből az XF96 Analyzer szoftver oxigénfogyasztás és extracelluláris pH csökkenés értékeket számolt. A mérés kezdetén fél órás alapvonalat vettünk fel

tápanyagmentes ACSF-ben, így alakult ki az összesen két órán át tartó éheztetés. A mérés során mérési médiumban oldott szubsztrátot (glukóz, glutamin, piruvát, laktát, β -hidroxibutirát, acetoacetát) és metabolikus gátlószert/szétkapcsolószert (oligomycin, DNP, FCCP, antimycin A, nátrium-oxamát) injektáltunk a mérési wellékbe.

Intracelluláris ATP és ADP szintek detektálása kemilumineszcens módszerrel

Intracelluláris ATP és ADP szintek detektálását teszi lehetővé a kemilumineszcens elven működő, végpontjelzéses ATP assay kit. Méréseinket Galaxy Bio-Orbit 1258 dedikált luminométeren, fehér, 96 lyukú mikroplate-ben végeztük. Kísérleteink a tenyészmédium ACSF-re történő lecserélésével kezdődött. Két óras éheztetést követően az ACSF-et egy energiadonor metabolittal (szubsztrát) egészítettük ki (ezalól kivételt képeznek a kontroll sejtek), majd további két óra után, ACSF-fel történő mosást követően detergensenl lizáltuk a sejteket. Az így szabaddá váló ATP mennyisége mérhető a kit-ben található termostabil luciferáz enzim segítségével. Az ADP szint meghatározására egy parallel lyukban a sejtízátumhoz foszfoenol-piruvátot és piruvát kináz enzimet adtunk. Az így kialakuló ATP mennyisége az eredeti lizátum ATP+ADP tartalmának felel meg, amelyből könnyen kiszámolható kezdeti intracelluláris ADP szint az intracelluláris ATP mennyiségének ismeretében. A mérés végén standard mennyiségű ATP hozzáadásával kalibráltunk.

Sejtviabilitás mérése MTT spektrofotometriás módszerrel

A sejt redukciós kapacitásának vizsgálatára alkalmaztuk az MTT reagenst, amely a sejtviabilitásról ad információt. A mikroglia sejteket 2 órán keresztül éhezettük szubsztrátmentes ACSF médiumban, majd további két órán keresztül inkubáltuk egy-egy szubsztráttal kiegészített ACSF médiumban (ezalól kivételt

képeztek a kontroll sejtek). A 4 órás inkubálást követően a sejtekhez hozzáadtuk az MTT reagenst, amellyel további egy órán keresztül inkubáltuk 37°C-on a sejteket. Ezidő alatt kialakultak a formazán kristályok, amelyeket sósavas izopropanol elegyében feloldottunk, majd az oldat abszorbanciáját 570 nm-en vakkal szemben mértük.

Apoptózis- és nekrozisvizsgálat

Élő sejtek apoptózis vizsgálatára Annexin fluoreszcens festést használtunk. A sejtmembrán integritásáról a calcein-AM fluoreszcens festés adott információt. A festést megelőzően a sejteket 2 órán keresztül szubsztrátmentes ACSF-ben, majd további két órán keresztül szubsztráttal kiegészített ACSF-ben inkubáltuk. A 4 órás kezelést, majd festést követően a sejteket Zeiss Axiovert 200 M fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Kizárólag calcein-AM-mel festődnek az ép sejtmembránnal rendelkező életképes sejtek, míg Annexinnel is festődnek azok a sejtek, amelyek a korai apoptózis fázisba léptek. Nekrozisra utal, ha a sejt csak Annexinnel festődik.

Western-blot

BV-2 mikrogliá sejtekkel Western-blot vizsgálatokat végeztünk. A sejteket 6 lyukú plate-re raktuk ki a mérést megelőző napon. Az éheztetés körülményei a fent leírtakkal megegyező volt: a két órás éheztetést követően az ACSF médiumot szubsztráttal egészítettük ki, majd további két órán keresztül inkubáltuk. A 4 órás kezelést követően lizáltuk a sejteket. A fehérje mennyiségi meghatározásához BCA kitért használtunk. Minden egyes lizátumból 12-16 µg fehérjét TRIS-Glicin SDS poliakrilamid gélen futtattunk. Az elválasztott fehérjemintákat átvittük polivinilidén difluorid membránra. A primer antitestek a következők voltak: i) autofágia markerek: microtubule-associated protein 1 light chain 3 A/B; ii) mTOR útvonal

markerei: foszfo-mTOR; mTOR, foszfo-S6; ribosomális S6; foszfo-AMP-aktivált protein kináz α ; AMPK α . Immunoreaktivitás vizsgálatra a megfelelő horseradish peroxidázzal konjugált szekunder antitestet használtuk. A kemilumineszcens jel detektálását a Chemidoc XRS+ műszerrel végeztük (Bio-Rad, Hercules, CA, US). A foszforilált építópokhoz kötődő antitestek eltávolítására Pierce Stripping puffert használtunk.

Immuncitokémia

Az áramlási citometriás vizsgálatokhoz minden egyes kondíció esetén 5×10^5 BV-2 sejtet permeabilizáltunk PerFix-nc kit segítségével a gyártó ajánlásának megfelelően. A p-S6 expresszió meghatározása direkt jelölt, monoklonális p-S6 antitesttel történt. A vizsgálat Navios áramlási citométeren történt, míg az adatok kiértékeléséhez a Kaluza szoftvert használtuk.

EREDMÉNYEK

A kifejlett idegszövet anyagcseréje

Mikroglia sejtek szubsztrát-preferencia vizsgálata

A cerebrospinális folyadékban megtalálható energia metabolitok hatását *in vitro* kísérletekben vizsgáltuk primer mikroglia sejteken és a BV-2 mikroglia sejtvonalon a Seahorse XF Analyzer műszer segítségével. A mitokondriális oxigénfogyasztás intakt sejteken történő mérésével közvetlen információ nyerhető az energia szubsztrátok hasznosulásáról és az *in situ* mitokondriális funkciókról. ACSF médiumban, **energia szubsztrátok hiányában** a mikroglia sejtek alaplégzése és maximális oxigénfogyasztása csökkent, továbbá a sejtek intracelluláris ATP szintjében is csökkenést tapasztaltunk, amely súlyos energiahányra utal ilyen körülmények között. A primer mikroglia sejtekben, ellentétben a BV-2 mikroglia sejtekkel az éheztetés nem eredményezte a sejtek viabilitásának a csökkenését, illetve nem indukált szignifikáns mértékű apoptózist. A BV-2 sejtek csökkent mTOR és S6 foszforilációt mutattak éheztetést követően, amely a fehérjeszintézis redukciójára utal. Az intenzív autofágiát mutató emelkedett LC3 II/I arány az ACSF médiumban inkubált BV-2 mikroglia sejtekben az önmérsztési folyamatok kezdetére utal. Következtetésképpen elmondható, hogy a primer mikroglia sejtek kevésbé érzékenyek a szubsztrátmegvonásra, mint a BV-2 mikroglia sejtek.

A sejtekben történő szubsztrát-hasznosítás vizsgálata során a mikroglia sejteket oxidatív vagy glikolitikus szubsztráttal kiegészített ACSF médiumban tartottuk. A kiválasztott energia metabolitok a cerebrospinális folyadékban fiziológiás körülmények között előforduló szubsztrátok voltak (glukóz,

glutamin, piruvát, laktát, ketontestek). Az agyi kortexre vonatkozó respirációs kvóciens 1 körüli érték, amely a **glukóz** aerob oxidációjára utal. Kísérleteinkben a glukóz csökkentette mind a primer, mind pedig a BV-2 mikroglia sejtek oxigénfogyasztását. A glukóz ehhez hasonló akut hatását (Crabtree-effektus) az elsősorban glikolitikus anyagcserét folytató sejteknél (tumoros sejtek) már korábban is megfigyelték. A mikroglia sejtek oxigénfogyasztásának csökkenése oligomycin hozzáadására glukóz jelenlétében azonban csekély oxidatív foszforiláció jelenlétére is utal. Az ACSF médiumban tartott mikroglia sejtek extracelluláris acidifikációját a glukóz hozzáadása emelte, amely a sejtek intenzív glikolízisét mutatja. Ellentétben a BV-2 mikroglia sejteknél megfigyeltékkel, a primer mikroglia sejtek éheztetést követő intracelluláris ATP szint csökkenését a glukózból keletkező ATP részben kompenzálta. BV-2 sejtekben az ACSF-ben éheztetett sejtekhez képest sem a sejtvitalitás növekedése, sem az apoptotikus sejtek számának a csökkenése, sem pedig a p-mTOR/t-mTOR arányának a növekedése nem következett be glukóz hatására. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a BV-2 mikroglia sejtekben a glukóz nem volt képes visszafordítani az éheztetés következményeként létrejövő katabolikus folyamatokat. Kísérleteket végeztünk a glukóz jelenlétében létrejövő akut, oxidációt csökkentő hatás hátterének a vizsgálatára. A piruvát dehidrogenáz komplex (továbbiakban PDHc) teljes gátlása nem állhat fenn, hiszen a mitokondriális szétkapcsolószert a primer mikroglia sejtek oxidációját fokozta, amely csak magas PDHc aktivitás mellett elképzelhető. Mindemellett a laktát dehidrogenáz enzim gátlása a glukóz jelenlétében mért alacsony mitokondriális oxigénfogyasztást fokozta, a glikolízis mértékét pedig csökkentette.

Piruvát szubsztrát jelenlétében a glukóz hatásának diszkuálásánál leírt PDH inaktiváció nem lépett fel, hiszen glukóz hiányában nem történik glikolítikus ATP termelés, amely részben inaktiválná a PDH enzimet. Primer mikroglia sejtekben a piruvát az alaplégzést fokozta, továbbá az intracelluláris ATP szintet növelte, míg BV-2 sejtekben ez nem volt tapasztalható. A BV-2 mikroglia sejtek esetén azonban a piruvát nem volt képes az éheztes során fellépő intracelluláris ATP szint és sejtviabilitás csökkenést, valamint apoptózis indukciót gátolni.

A **laktát** a központi idegrendszer egyik bizonyítottan fontos energia metabolitja. Kísérleteinkben a primer mikroglia sejtek és a BV-2 sejtek alaplégzését és maximális légzését a laktát fokozta. Primer mikroglia sejtekben a laktát az ATP termelést szignifikáns mértékben fokozta az ACSF-ben éhező kontroll sejtekhez képest. Annak ellenére, hogy a BV-2 mikroglia sejtek képesek a laktát hatékony oxidációjára, az ACSF-ben 4 órán keresztül éheztesett sejtekben megfigyelhető intracelluláris ATP szint és MTT viabilitás csökkenés jelentkezett laktát jelenlétében is. Érdekes összehasonlítani a laktát és piruvát oxidációra kifejtett hatását. Primer mikroglia sejtekben mind az alaplégzést, mind pedig a maximális légzést a laktátnál nagyobb mértékben fokozta a piruvát. Erre magyarázatot adhat az, hogy a piruvát mitokondriális transzportot követően közvetlen szubsztrátként szolgál a PDH enzim számára, míg a laktát átalakulása piruváttá sebességmeghatározó lehet. A citoszólikus NADH oxidáció csekély, így a LDH által katalizált reakcióban keletkező NADH elektronjai úgynevezett ingák (malát-aszpartát inga és glicerofoszfat-inga) útján jutnak el a mitokondriális elektrontranszport láncba és eredményezik az ATP szintézisét. Éhezés következtében azonban az ingát működtető szubsztrátok alacsony koncentrációja miatt ezen ingák funkcionálisan inaktív állapotba kerülnek.

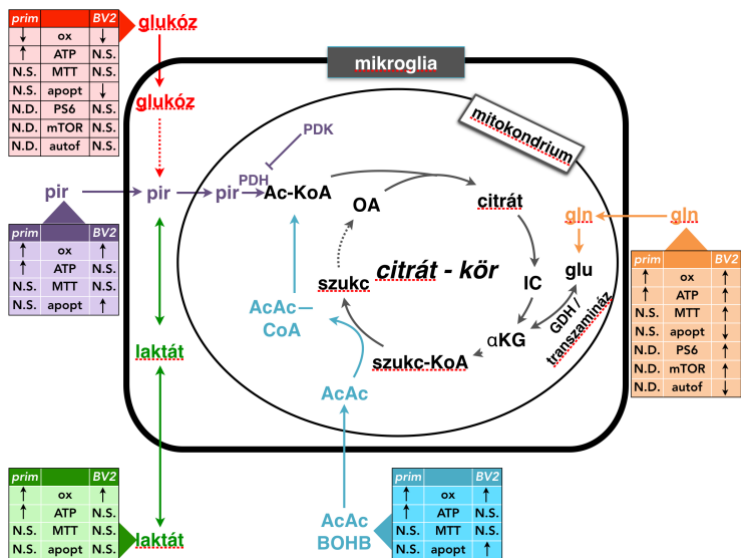
Kísérleteinkben a **glutamin** egyedüli szubsztrátként a primer - és BV-2 mikroglia sejtek alaplégzését fokozta és ez az alaplégzéshez viszonyított oxigénfogyasztás növekedés ATP szintézishez köthető. A mitokondriális szétkapcsolószerrel elért maximális respiráció glutamin jelenlétében volt a legmagasabb. BV-2 mikroglia sejtekben a glutamin a tenyészmédiumban tartott kontroll sejtekével összemérhető, magas intracelluláris ATP/ADP arányt és MTT viabilitást eredményezett. A glutamin az ACSF-ben éhező kontroll sejtekhez képest az mTOR aktivitás és fehérjeszintézis (p-S6 szint) fokozását eredményezte. Bár glutamin szubsztrát jelenlétében az LC3 II/I és a p-AMPK/t-AMPK arányban szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk az ACSF médiumban éheztetett kontroll BV-2 sejtekhez képest, a más sejtípusoknál leírt, mTOR és autofágia közötti, reciprok szabályozás azonban itt is jól megfigyelhető. A glutamin így a mikroglia sejtekben az éheztetés következtében kialakuló katabolikus folyamatokat visszafordította.

Éheztetett körülmények között a **β -hidroxibutirátot** képesek mind a primer, mind pedig a BV-2 mikroglia sejtek hasznosítani. β -hidroxibutirát jelenlétében a mikroglia sejtek alaplégzése és maximális légzése is megemelkedett, azonban a szubsztrátok közül ez volt a legcsekélyebb hatás. A ketontestek éheztetett mikroglia sejtek metabolizmusára kifejtett hatásának vizsgálatára **acetoacetáttal** is végeztünk kísérleteket. Glutamin jelenléte nélkül az acetoacetát jelentős mértékben nem fokozta az alaplégzést, a maximális respirációt is csak átmenetileg emelte meg az ACSF médiumban éhező kontroll sejtekhez képest.

Glutamin jelenlétében az acetoacetát tartósan fokozta mind a primer mind a BV-2 sejtek oxigénfogyasztását. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a ketontestek oxidációjának éhezett körülmények között határt szab a

szukcinil-KoA alacsony mennyisége. Ez jól tükröződik a szétkapcsolószert jelenlétében mért acetoacetát oxidáció csökkenésében. Amennyiben glutamint is tartalmaz az ACSF médium acetoacetát mellett, a glutamin metabolizmusa során, időegység alatt keletkező szukcinil-KoA mennyisége elegendő ahhoz, hogy a ketontest oxidációja megtörténjen. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy éheztetett körülmények között a citrát-köri intermedierek depléciója következik be, amely során a ketontestek oxidációja gátolt. Azonban a megfelelő szubsztrát-kombinációk alkalmazásával a citrát-ciklus intermedierek mennyisége és a ciklus sebessége helyreállítható.

A glutamin-ketontest szubsztrát-kombináción kívül más energia metabolit-pár is képes volt növelni az oxidációt a BV-2 sejteken. Az ACSF médium aszpartáttal történő kiegészítése fokozta a sejtek glukóz, piruvát és laktát jelenlétében mért oxidációját. A primer- és BV-2 mikroglia sejteken végzett vizsgálatok során kapott eredmények összefoglalása látható az 1. ábrán.



1. ábra

Mikroglia sejtek bioenergetikai vizsgálata – primer- és BV-2 sejteken kapott eredmények összefoglaló ábrája

Az ábrán az egyirányú nyilak egyirányú mitokondriális transzportot/reakciót, míg a kétirányú nyilak a kétirányú transzport lehetőségét, illetve reverzibilis reakciót feltételeznek. A szaggatott nyíl több reakción alapuló átalakulást jelöl. Rövidítések/jelölések: fokozás (↑), gátlás (↓), nincs szignifikáns hatás (N.S.), nem detektált paraméter (N.D.), primer mikroglia sejt kultúra (prim), oxidáció (ox), apopt (apoptózis indukció), autof (autofágia aktivitás), pir (piruvát), AcAc (aceto-acetát), BOHB (β-hidroxibutirát), szukcínil-KoA (szukc-KoA), oxálacetát (OA), acetyl-KoA (Ac-KoA), izocitrát (IC), glutamát (glu), glutamin (gln).

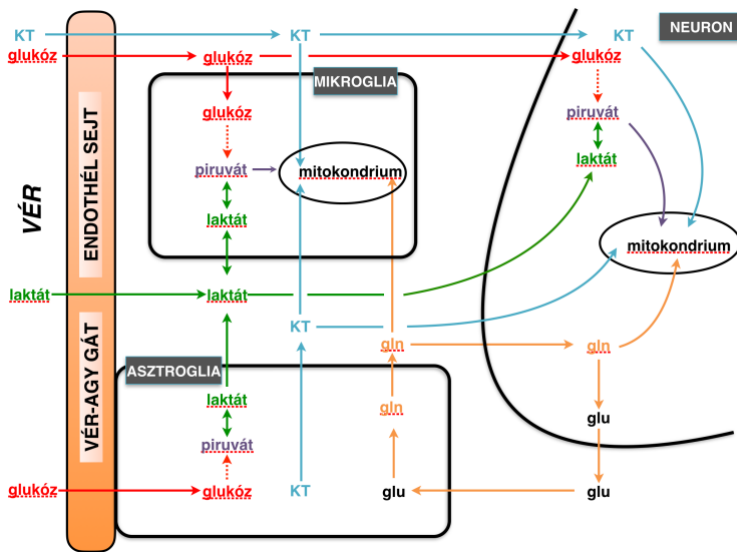
II. Anyagcsereváltozás a neuronális fejlődés során

A neuronális differenciáció metabolikus aspektusainak vizsgálatára *in vitro* kísérleteket végeztünk NE-4C neuronális őssejteken, illetve nem differenciált NE-4C sejteken. Az összehasonlító vizsgálat részeként primer neuronális és primer asztroglia sejt kultúrán is végeztünk kísérleteket. A sejtek éheztetését követően oxigénfogyasztás méréseket végeztünk a központi idegrendszerben fiziológias körülmények között előforduló két leggyakoribb energia metabolit, a glukóz és a glutamin jelenlétében. A mitokondriális oxigénfogyasztás és a glikolitikus aktivitás mérését végeztük el a négy különböző sejt típuson. A nem differenciált NE-4C sejtek esetén aktív glikolízist tapasztaltunk, míg a differenciált NE-4C sejteknél inkább az oxidatív anyagcsere volt jellemző glukóz jelenlétében. A glutamin hasznosításában is különbségek adódtak a differenciált és nem differenciált sejt típus között. Míg az NE-4C őssejtek alaplégzését a glutamin fokozta, addig a differenciált NE-4C neuronok oxigénfogyasztásában nem tapasztaltunk emelkedést glutamin hatására.

KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a mikroglia sejtek metabolikus sokszínűséget mutatnak. A cerebroszpinális folyadékban rendelkezésre álló szubsztrátok széles skáláját képesek energiatermelésükre fordítani, így glukózt, piruvátot, laktátot, ketontesteket, illetve aminosavakat is. Ez a metabolikus flexibilitás lehetővé teszi, hogy a mikroglia sejt energia homeosztázisát fenntartsa az agy eltérő metabolikus környezetében. A vizsgált energia metabolitok közül a glutamin jelenti a leghatékonyabb szubsztrátot. A mikroglia sejtek nagyfokú transzaminálási kapacitással rendelkeznek, amely aszpartátból (és malátból) az acetil-KoA akceptor oxálacetát képződését eredményezi. Így a mikroglia sejt képes szabályozni a lokális glutamát/glutamin szintet. Kísérleteink eredményei alapján feltételezhetjük, hogy a mikroglia, oligodendroglia, asztroglia sejtek és neuronok között metabolikus kooperáció áll fenn, amely hozzájárul a központi idegrendszerben megtalálható sejtek energia homeosztázisának a fenntartásához (2. ábra).

Az NE-4C embrionális idegi őssejteken és differenciált NE-4C neuronokon végzett kísérletek eredményei alapján megállapítható, hogy a differenciálódás során anyagcsere változás történik, amely biztosítja a sejtek számára a megfelelő energiát és intermediereket a neuronális fejlődéshez. A differenciáció során az idegi őssejtek a glikolitikus energiatermelésből fokozatosan átválnak a glukóz oxidatív úton történő hasznosítására.



2. ábra

Neuron, asztroglia és mikroglia sejt közötti metabolikus kooperáció modell

Az ábrán az egyirányú nyilak egyirányú transzportot/reakciót, míg a kétirányú nyilak a kétirányú transzport lehetőségét, illetve reverzibilis reakciót feltételeznek. A szaggatott nyíl több reakción alapuló átalakulást jelöl. Rövidítések: ketontest (KT), glutamát (glu), glutamin (gln).

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A tézisek alapjául szolgáló közlemények:

Nagy AM, Fekete R, Horvath G, Koncsos G, Kriston C, Sebestyen A, Giricz Z, Kornyei Z, Madarasz E, Tretter L. (2018) Versatility of microglial bioenergetic machinery under starving conditions. *Biochim Biophys Acta*. 1859:201-214.

IF: 4.280

Jady AG, **Nagy AM**, Kohidi T, Ferenczi S, Tretter L, Madarasz E. (2016) Differentiation-Dependent Energy Production and Metabolite Utilization: A Comparative Study on Neural Stem Cells, Neurons, and Astrocytes. *Stem Cells Dev* 25:995-1005.

IF: 3.562

Egyéb közlemények:

Harami-Papp H, Pongor LS, Munkacsy G, Horvath G, **Nagy AM**, Ambrus A, Hauser P, Szabo A, Tretter L, Gyorffy B. (2016) TP53 mutation hits energy metabolism and increases glycolysis in breast cancer. *Oncotarget*. 7:67183-67195.

IF: 5.168

Nemeth B, Doczi J, Csete D, Kacso G, Ravasz D, Adams D, Kiss G, **Nagy AM**, Horvath G, Tretter L, Mocsai A, Csepanyi-Komi R, Iordanov I, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. (2016) Abolition of mitochondrial substrate-level phosphorylation by itaconic acid produced by LPS-induced Irg1 expression in cells of murine macrophage lineage. *FASEB J*. 30:286-300.

IF: 5.498