

# Szkizofrénia *in vitro* betegségmodellezése indukált pluripotens őssejt alapú rendszerrel

Doktori értekezés

**Hathy Edit Margit**

Semmelweis Egyetem  
Mentális Egészségtudományok Doktori Iskola  
Pszichiátria program



Témavezető: Dr. Réthelyi János egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Adorján István adjunktus  
Dr. Kobolák Julianna tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Bereczki Dániel egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Barta Csaba egyetemi docens  
Dr. Madarász Emília tudományos főmunkatárs

Budapest  
2020. december

## Tartalom

Rövidítések jegyzéke .....	3
Ábrák jegyzéke .....	6
Táblázatok jegyzéke .....	8
1. Bevezető .....	9
1.1. Az őssejtek általános jellemzői, tulajdonságaik, indukált pluripotens őssejtek, betegségmodellezés .....	9
1.1.1. Az őssejtek általános tulajdonságai .....	9
1.1.2. Pluripotens őssejtek, indukált pluripotens őssejtek és betegségmodellezés .....	11
1.2. A szkizofrénia klinikai tünetei, neurobiológiai és genetikai háttere .....	14
1.3. iPSC alapú betegségmodellezés szkizofréniaiban .....	24
1.4. Neuronális differenciációs protokollok és vizsgálható in vitro fenotípusok .....	28
2. Célkitűzések .....	31
3. Anyagok és módszerek .....	33
3.1. A kísérletek alanyainak kiválasztása, <i>de novo</i> mutációk azonosítása és jellemzése .....	33
3.2. Az iPSC és NPC vonalak létrehozása és jellemzése .....	35
3.2.1 A tesztrendszer kontroll iPSC vonalának létrehozása és tenyésztése .....	35
3.2.2. A betegségmodell iPSC vonalainak létrehozása .....	36
3.2.3. A betegségmodell iPSC vonalainak áramlási citometriás mérései .....	37
3.2.4. A betegségmodell iPSC vonalainak genetikai elemzése .....	37
3.2.5. A betegségmodell iPSC vonalainak spontán differenciációs tesztje .....	37
3.2.6. A kontroll és a betegségmodell iPSC vonalainak NPC és idegsejt irányú differenciáltatása .....	38
3.3. Immuncitokémiai festés .....	39
3.4. Génexpresszió analízis .....	41
3.5. RNS-szekvenálási kísérletek .....	42
3.6. A neurális progenitor sejtek és neuronok funkcionális vizsgálata intracelluláris $Ca^{2+}$ koncentrációjának változása alapján .....	43
3.7. Az NPC vonalak funkcionális fenotípusainak vizsgálata .....	44
3.8. Oxidatív stressz és mitokondriális tesztek .....	45
3.9. Statisztikai analízis .....	46

4. Eredmények.....	47
4.1. Tesztrendszer beállítása kontroll iPSC vonalon .....	47
4.2. Beteg-szülő trió őssejtjeinek molekuláris jellemzése .....	52
4.3. Az iPSC vonalak neurális irányú differenciáltatása és vizsgálata .....	56
4.4. RNS-szekvenálási mérések.....	61
4.5. Kalcium-képződési kísérletek.....	64
4.6. NPC-k proliferációs, sebzés és neuritnövekedési tesztjei.....	65
4.7. A mitokondriális funkció és az oxidatív stressz toleranciájának eredményei ..	69
5. Megbeszélés .....	73
5.1. Kísérleti tesztrendszer optimalizálása, beállítása.....	73
5.2. Az iPSC alapú neurális <i>in vitro</i> beteg-szülő trió modellrendszer.....	75
5.2.1 A betegségmodell iPSC vonalainak megalapítása és jellemzése .....	75
5.2.2. A trió iPSC vonalaiból létrehozott NPC-k és neuronok jellemzése .....	76
6. Következtetések.....	81
7. Összefoglalás .....	83
8. Summary .....	85
9. Irodalomjegyzék.....	87
10. Saját publikációk jegyzéke .....	104
11. Köszönetnyilvánítás .....	106

**Rövidítések jegyzéke**

AFP	Alpha-fetoprotein, alfa fötális fehérje
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic, 2-amino-3-propánsav
APC	Allophycocyanin, allofikocianin
ASD	Autism spectrum disorder, autizmus spektrum zavar
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor, agyi eredetű növekedési faktor
BMP	Bone morphogenetic protein, csont morfogenetikus fehérje
BRACHYURY	T-box transcription factor T, T-sejt eredetű T-box transzkripció faktor
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate, ciklikus adozin-monofoszfát
c-MYC	Proto-oncogenes, proto-onkogén
CNV	Copy number variation, kópiaszám variáció
CRISPRa/i, CRISPR	Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats, mediated gene activation or inhibition
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol, magfesték
DE/DEG	Differentially expressed genes, eltérő szinten expresszálódó gén
DISC1	Disrupted In Schizophrenia 1, DISC1 scaffold fehérje
DNM	De novo mutation, de novo mutáció
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline, Dulbecco módosított PBS
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Mentális zavarok diagnosztikai és statisztikai kézikönyve
EB	Embryoid body, embriótestecske
ESC	Embryonic stem cell, embrionális őssejt
FGF2	Fibroblast growth factor 2, fibroblaszt növekedési faktor 2
FITC	Fluorescein isothiocyanate, fluoreszcein izotiocianát
FOXP1	Forkhead Box G1, forkhead box fehérje G1
GABA	Gamma-aminobutyric acid, $\gamma$ -aminovajsav
GO	Gene Ontology, gén-ontológia
GWAS	Genome wide association study, genom-szintű asszociáció vizsgálat
HBSS	Hanks' Balanced Salt solution, Hanks pufferelt sóoldat

HCN	Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channel, hiperpolarizáció cAMP aktivált csatorna
hESC	Human embryonic stem cell, humán embrionális őssejt
ICC	Immunohistochemistry, immunocitokémiai festés
ICM	Innert cell mass, belső embriócsomó.
iPSC UCB2	Induced pluripotent stem cell from umbilical cord blood 2, köldökzsinórvérből visszaprogramozott indukált pluripotens őssejt 2
iPSC	Induced pluripotent stem cell, indukált pluripotens őssejt
KHSRP	KH-Type Splicing Regulatory Protein, KH-típusú splicing szabályozó fehérje
KIR2DL1	Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor, Two Domains, Long Cytoplasmic Tail, killer sejt immunoglobulin-szerű receptor
KLF4	Kruppel-like factor- 4, Krüppel faktor szerű fehérje
KOS	hKLF4, hOCT3/4, hSOX2, visszaprogramozáshoz használt transzgenek, a Yamanaka faktorok
LRRC7	Leucine rich repeat containing 7, posztszinaptikus denzitás komplex fehérje
MEF	Mouse embryonic fibroblast, egér embrionális fibroblaszt
MIR137	microRNA-137, mikroRNS-137
NANOG	NANOG Homeobox, homeobox pluripotencia transzkripció faktor
NESTIN	Neuroectodermal stem cell marker, neuroektodermális őssejt marker
NMDA	N-methyl-D-aspartate, N-metil-d-aszparaginsav
NPC	Neural progenitor cell, neurális progenitor sejtek
OCT4	Octamer-binding transcription factor-4, pluripotencia marker
PAX6	Paired box protein-6, szem és idegi fejlődésben fontos transzkripció faktor
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells, perifériás mononukleáris sejtek
PNB	Para-nitro-blebbistatin, para-nitro-blebbisztatin

PROX1	Prospero Homeobox 1, gyrus dentatus szemcsesejt marker
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction, kvantitatív valós idejű PCR technika
ROS	Reactive oxygen species, reaktív oxigéngyökök
RPLP0	60S Acidic Ribosomal Protein P0, Riboszóma 60S alegység fehérjéje
SMA	Smooth-muscle actin, simaizom aktin
SNP	Single nucleotide polymorphism, egy pontos nukleotid polimorfizmus
SOX2	Sex determining region Y-box 2, hES sejtekre és idegi őssejtekre jellemző
STR	Short Tandem Repeat, mikroszatellita
SZ	Schizophrenia, szkizofrénia
SZ-HU-FA	Schizophrenia-Hungary-father, apai sejt vonal
SZ-HU-MO	Schizophrenia-Hungary-mother, anyai sejt vonal
SZ-HU-PROB	Schizophrenia-Hungary-proband, beteg sejt vonal
TALEN	Transcription activator-like effector nucleases, transzkripciós aktivátorszerű effektor nukleázok
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta, transzformáló növekedési faktor- $\beta$
Wnt	Wingless-related integration site

## Ábrák jegyzéke

1. ábra Óssejtek kinyerése, differenciáltatása	11
2. ábra iPSC felhasználási lehetőségei és iPSC alapú betegségmodellezés útvonala	14
3. ábra A hippocampális formáció anatómiája, főbb részei, főbb pályái	17
4. ábra Neurális progenitor és hippocampális gyrus dentatus neuronok differenciáltatási protokolljának összefoglaló idővonalai ábrája	39
5. ábra Az iPSC-k, az NPC-k és a 4 hetes hippocampális neuronok génexpressziós vizsgálata	48
6. ábra Az NPC-k és a differenciált hippocampális neuronok vizsgálata immunocitokémiai módszerekkel	48
7- 8. ábra A Fluo-4-gyel töltött NPC-k ligand-indukált mérése	49-50
9. ábra Fluo-4-gyel töltött 4 hetes neuronok spontán és inhibitorral kezelt kalciumjele	51
10. ábra A család tagjaiból létrehozott iPSC immunocitokémiai pluripotencia markerekkel történő jellemzése	52
11. ábra Az áramlási citometriával mért pluripotencia markerek	53-54
12. ábra A trió tagjainak kariogramjai	54
13. ábra A család tagjaiból létrehozott iPSC-k szekvenálási eredményei	54
14. ábra A beteg-szülő trió iPSC vonalainak spontán differenciációja	55-56
15. A. ábra Génexpressziós mintázat a beteg-szülő trióból származó NPC-kben és neuronokban	57
15. B-C. ábra A beteg-szülő trióból származó NPC vonalak immunocitokémiai vizsgálata	58-59
15. D-E. ábra Az érett idegsejt kultúrák molekuláris jellemzése: a KHSRP és LRRC7 célgének vizsgálata	60-61
16. ábra: A trió NPC vonalainak transzkriptomikai különbségei az RNS-szekvenálási mérések alapján	62
17. ábra Eltérően expresszáladott gének megoszlása a trió tagjaiban	62
18. ábra DE gének PATHWAY (piros) és GO (kék) analízise	64
19. ábra Ca <sup>2+</sup> aktivitás vizsgálata NPC-kben	65

20. A-F ábra A trió NPC vonalainak proliferációs, sebzéses és neuritnövekedési tesztjei  
66-69
21. A-D ábra A mitokondriális funkció és az oxidatív stressz tolerancia vizsgálata a trió  
NPC vonalakban. 70-72



**Táblázatok jegyzéke**

1. táblázat A szkizofrénia biológiai és pozicionális kandidáns génjei	20
2. táblázat A genom-szintű vizsgálatok során azonosított szkizofrénia rizikóvariánsok	21
3. táblázat Pszichiátriai kórképek kialakulásában feltételezhetően szerepet játszó funkcionális genetikai variánsok őssejt alapú betegségmodellezései	22-24
4. táblázat A szkizofrénia iPSC alapú betegségmodellezésének átfogó táblázata	26-27
5. táblázat A vizsgált eset-szülő trió, a kiterjesztett család és a független egészséges kontroll egyén demográfiai és klinikai adatai	33-34
6. táblázat A szkizofrénia betegben azonosított mutációk leírása.	34-35
7. táblázat Az immuncitokémiai festésekhez használt elsődleges ellenanyagok összefoglaló táblázata	40
8. táblázat Az immuncitokémiai festésekhez használt másodlagos ellenanyagok összefoglaló táblázata	41
9. táblázat A génexpressziós kísérletekhez használt TaqMan esszék listája	41-42
10. táblázat A disszertáció főbb eredményeinek táblázatos összegzése	79-80

## 1. Bevezető

### 1.1. Az őssejtek általános jellemzői, tulajdonságaik, indukált pluripotens őssejtek, betegségmodellezés

#### 1.1.1. Az őssejtek általános tulajdonságai

Kutatási és orvosbiológiai szempontból a XX. század nagy felfedezettjei az őssejtek. Az első szakirodalmi megnevezésük után (Haeckel 1868), az 1960-as évekbeli kísérleti bizonyításuk hozta őket be újra az orvosi kutatások és érdeklődés homlokterébe (Becker és mtsai 1963). Definíció szerint az őssejtek önmegújító képességgel bíró, korlátlan ideig fenntartható, potenciáljuktól függően maguknál differenciáltabb sejtípusok létrehozására képes sejtek. Különleges osztódási képességgel bírnak, kétféleképpen is osztódhatnak: egyrészt szimmetrikusan, amely során önmagukkal megegyező sejteket hoznak létre az őssejt „pool” növekedésének érdekében, másrészt aszimmetrikusan, amellyel, az önmagukkal megegyező sejt mellett egy másik, már differenciáltabb, érettebb utódsejtet is képesek megalkotni. Differenciációs képességük és eredetük, valamint létrehozási módszerük alapján is csoportosíthatjuk őket. Potenciáljuk alapján megkülönböztetünk toti-, pluri-, multipotens sejteket, míg eredetük alapján beszélünk embrió eredetű (toti-, pluripotens), indukált (pluripotens) és szöveti (multipotens) őssejtekről (Zakrzewski és mtsai 2019).

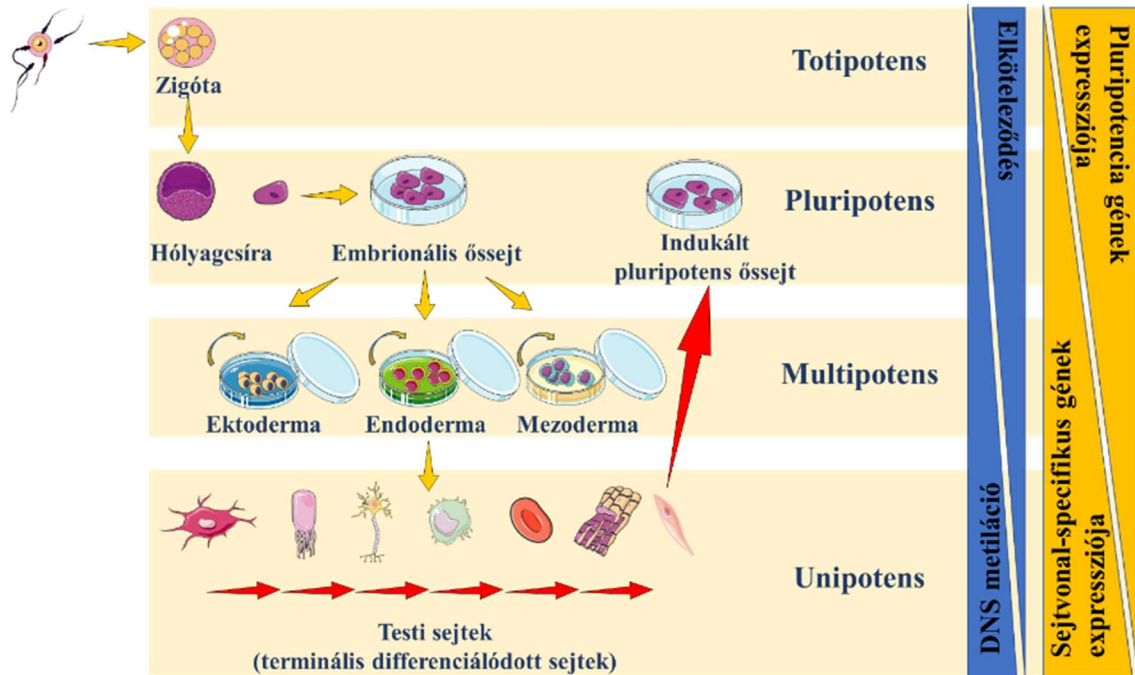
**Totipotens őssejteknek** tekinthetőek a megtermékenyített petesejttől a szedercsíra fejlődési állapotig terjedő szakaszban kialakult sejtek. Ezen a fejlődési szinten a sejtek extraembrionális és embrionális sejteket, szöveteket egyaránt képesek létrehozni. Felhasználhatóak súlyos genetikai betegségek szűrésére preimplantációs diagnosztika segítségével, valamint a korai egyedfejlődés és sejtek érési folyamatainak megfigyelésére.

Az extraembrionális szövetek létrehozására már nem képes, de mindhárom csíralemez kialakítására elegendő potenciállal rendelkező sejteket **pluripotens őssejteknek** nevezzük. Legtöbbször ezen őssejtek az *in vitro* betegségmodellek résztvevői, mivel belőlük sejtvonalak alapíthatók és a test bármely szomatikus sejtje létrehozható megfelelő laboratóriumi körülmények között, differenciálási protokollok, specifikus faktorok használatával.

A **humán embrionális őssejtek** (human embryonic stem cell, hESC) olyan pluripotens őssejtvonalak, amelyeket az *in vitro* fertilizációs programok során felhasználásra nem kerülő hólyagsíra állapotú embriókból hoztak létre (Thomson és mtsai 1998), ezért kutatási célú alkalmazása máig etikai kérdéseket vet fel és különböző szabályozási rendszerek alakultak ki világszerte. Felhasználhatóak betegségmodellezés, érési és differenciációs folyamatok vizsgálatára.

Az **indukált pluripotens őssejtek** (induced pluripotent stem cell, iPSC) a pluripotens őssejtek egy olyan csoportját képezik, amelyben a sejtek egy szomatikus, már differenciált sejt visszaprogramozásával nyerik vissza pluripotens differenciációs képességüket. A pluripotens őssejtek és a belőlük létrehozott sejtípusok a humán szövetek modelljeiként használhatóak fel, így az *in vitro* betegségmodellezés eszközei. A hESC-kel szembeni előnyük a betegségmodellezés szempontjából, hogy egy felnőtt, már fenotípussal, például valamilyen betegséggel rendelkező egyénből is létrehozhatók, és etikai szempontból is más megítélés alá esnek. Sejtterápiás felhasználásukat is intenzív érdeklődés övezi.

A **multipotens őssejtek**, más néven **szöveti őssejtek** már sokkal szűkebb differenciálódási lehetőséggel bír, de egész életünk során szervezetünkben jelen levő, homeosztázisért és regenerációért felelős sejtek. Szöveti őssejteknek tekinthetőek például a neurális progenitor, vagy neurális őssejtek (neural progenitor cell, NPC, neural stem cell, NSC), a hematopoietikus őssejtek, vagy a mezenchimális sejtek. Ezek a sejtek *in vitro* kultúrában már csak korlátozott ideig tarthatók fent differenciálatlan állapotban. Főként a regeneratív medicina használja őket, például csontvelőtranszplantációs, bőrtranszplantációs eljárásokra (1. ábra).



**1. ábra: Őssejtek kinyerése, differenciáltatása.** A piros nyilak a terminálisan differenciálódott sejtek átprogramozási lehetőségeit mutatják. A testi sejtek fenotípusváltását transzdifferenciációnak, míg pluripotenciájuk visszaállítását visszaprogramozásnak nevezzük.

Az ábra a <https://smart.servier.com> oldalon közzétett képek felhasználásával készült.

### 1.1.2. Pluripotens őssejtek, indukált pluripotens őssejtek és betegségmodellezés

A pluripotens őssejtek kutatásában az első áttörést 1998-ban James Thomson kísérletei hozták meg (Thomson és mtsai 1998). Először neki sikerült hólyagszíra állapotú zigóta belső embriócsomójából (inner cell mass, ICM) izolált embrionális pluripotens őssejtekből humán embrionális őssejtvonalakat létrehozni. Ezek a sejtvonalak megfelelő körülmények között korlátlan ideig differenciálatlan állapotban fenntarthatók voltak és a differenciációs kísérletekben mindhárom csíralemez sejtjeit képesek voltak létrehozni. Thomson eljárásával egy szinte korlátlan mennyiségben hozzáférhető, fenntartható, fagyasztható, és a pluripotens őssejtek definíciójából adódóan, bármely szomatikus sejtet létrehozni képes eszköz került az orvosbiológiai kutatás fegyvertárába.

Mindössze egy évtizedet kellett várni a következő mérföldkőig, az indukált pluripotens őssejtekig. Shinya Yamanaka és kutatócsoportja előzetes egérsérletek után (Takahashi és Yamanaka 2006), humán szomatikus differenciált sejteket is vissza tudott juttatni pluripotens állapotba, ezzel létrehozva egy új típusú humán őssejtet, az indukált

pluripotens őssejtet. A folyamat során, amelyet visszaprogramozásnak („reprogramming”) neveztek el, mesterregulátor transzkripciós faktorok, vagy pluripotencia gének (OCT3/4, KLF4, SOX2, c-MYC, melyet később Yamanaka faktoroknak neveztek el) bevitelével és exogén kifejeztetésével fibroblasztokat programoztak vissza, visszaállítva pluripotens differenciációs képességüket (Takahashi és mtsai 2007). Az OCT3/4 és a SOX2 a pluripotencia kialakításáért, a KLF4 a pluripotencia fenntartásáért felelős magmodul, míg a c-MYC a sejtciklus során a DNS replikációjáért és hibajavításáért felelős modul tagja (Uher 2017).

A Yamanaka munkacsoport által létrehozott humán iPSC vonalak hasonlóak voltak a hESC-ekhez mind morfológiájukban, proliferációjukban, felületi antigénjeikben, génexpressziós mintázatukban, mind a pluripotens sejt-specifikus gének epigenetikus állapotában és telomeráz aktivitásukban. Továbbá ezek a sejtek képesek voltak *in vitro* mindhárom csírvonal irányába differenciálódni és teratomát létrehozni (Takahashi és mtsai 2007). Azóta több érett sejttypusból, mint például fehérvérsejtekből, vizeletből nyert urothel hámsejtekből, hajhagyma sejtekből is sikerült humán iPSC vonalakat létrehozni. A transzkripciós szabályozó faktorok kifejeztetése a szomatikus sejtekbe történhet expressziós plazmidokkal vagy vírusrendszerrel. Vektortípustól függően ezek lehetnek integrálódó, eltávolítható, nem integrálódó vagy DNS-mentes módszerek. Jelenleg legelterjedtebb a Sendai-vírus, a retrovírus és lentivírus alapú, az episzómális és a módosított RNS bevitelén alapuló rendszerek, mivel ezek biztosítják a legjobb hatékonyságot a visszaprogramozáshoz. Az exogén bevitelű faktorok endogén génkifejeződést fognak indukálni, miáltal a sejtek visszatérnek egy korábbi, pluripotens állapotba (Yamanaka 2009). A különféle technikák hatékonyságukban (0,002%-tól 5-10%-ig), a visszaprogramozási folyamat idejében és mutagenitásukban különböznek. Összességében azonban elmondható, hogy bármely technikát választjuk is, a visszaprogramozás teljes folyamata hosszú időt vesz igénybe, akár hónapokig is eltarthat. Mivel a folyamat során a sejteknek számtalan már elért fejlődési szintet kell visszafelé legyőznie, így nem meglepő az a megfigyelés, hogy az iPSC-ben maradnak olyan epigenetikai markerek, amelyek megmutatják, hogy milyen testi sejtéből készültek (Uher 2017).

Az iPSC visszaprogramozási technológia kiváltotta a blasztociszta állapotból való sejtkenyerést, feloldotta az etikai kérdések egy részét, általa vizsgálhatóvá vált a

pluripotencia epigenetikai szabályozása is, és kaput nyitott az *in vitro* betegségmodellezés előtt. Lehetővé tette, hogy egy adott genetikai mutációt hordozó betegből származó szomatikus sejteket vissza lehessen juttatni pluripotens állapotba és ezáltal őssejtvonalakat lehessen belőlük alapítani. Ezek után az indukált pluripotens őssejtvonalakat *in vitro* tenyésztben többféle szomatikus sejté differenciáltatva követhetjük nyomon a megjelenő fenotípusokat. A betegség kialakulását okozó génváltozat molekuláris biológiai hatásait vizsgálhatjuk az adott sejtípus különböző fejlődési, differenciálódási állapotaiban is, illetve alkalmasak lehetnek gyógyszerhatóanyag tesztelésre (Benam és mtsai 2015, Yamanaka 2010). Etikai szempontból az iPSC vonalak alapítását és kísérletekben történő felhasználását megelőzően is szükséges etikai engedély benyújtása és a donor beleegyező nyilatkozata, informálása.

Pszichiátriai zavarok molekuláris hátterének felderítésére korábban leginkább *post mortem* agyminták vagy állatmodellek szolgáltak eszközül, ugyanis humán *ex vivo* kísérletet nagyon limitált számban lehet csak végezni. A *post mortem* minták egyfelől korlátozott mértékben hozzáférhető forrást jelentenek, másfelől a betegség végállapotára jellemző elváltozásokat, jellegeket viselnek, így csak egy pillanatfelvételnélként szolgálhatnak a betegség megismerésében. Eredményeik értékelésénél figyelembe kell venni még a fehérje és RNS lebomlásának lehetőségét. Az állatkísérletek során ok-okozati hatásokat tudunk tesztelni, de eredményeik sok esetben nehezen átültethetők a humán rendszerre, a fajok közötti különbségek, valamint a mentális zavarok humán-specifikussága miatt. A pszichiátriai zavarok molekuláris hátterének tanulmányozásában használt állatmodellek általában nagy hatású, ritka mutációk esetén szolgálnak hasznos információkkal, sejtbiológiai folyamatokkal vagy viselkedési endofenotípusokkal kapcsolatos kérdésekben (2. ábra).

Ezért ezen modellrendszerek limitációinak áthidalására, valamint megfigyeléseinek kiegészítésére lehet alkalmas az előzőekben bemutatott iPSC alapú *in vitro* betegségmodellezés a pszichiátriai betegségek celluláris szintű vizsgálatában és feltárásában.



**2. ábra: iPSC felhasználási lehetőségei és iPSC alapú betegségmodellelés útvonala.** Az ábra összefoglalja, hogy egy testi sejt milyen lépésekkel válik újra pluripotens sejté. A piros nyillal jelölt útvonal az értekezés témájának alapja.

A kép a felsorolt hivatkozások képei felhasználásával készült:

[http://www.bodorzoltan.hu/?m=orvosi\\_illusztraciok&id=31](http://www.bodorzoltan.hu/?m=orvosi_illusztraciok&id=31), <https://www.understanding-stemcells.info/basics/reprogramming.aspx>, [https://www.pinclipart.com/pindetail/iwJixi\\_human-body-systems-clipart-3-by-michael-human](https://www.pinclipart.com/pindetail/iwJixi_human-body-systems-clipart-3-by-michael-human)

## 1.2. A szkizofrénia klinikai tünetei, neurobiológiai és genetikai háttere

A pszichiátriai betegségek (mint például a szkizofrénia, a bipoláris affektív zavar, szorongásos zavarok, vagy a major depresszió) a lakosság jelentős hányadát érintik, együttes élettartam prevalenciájuk majdnem 50%, ezért népegészségügyi szempontból kiemelt jelentőségük van. A pszichiátriai zavarok jellemzően multifaktorális jellegűek, genetikai kockázati tényezőik komplex háttérrel rendelkeznek, nem teljesen ismertek a beindító (ún. „trigger”) faktorok, és egyelőre nincsenek megbízható biomarkereik sem. Jelenleg a legtöbb rendelkezésre álló kezelés a tünetek megszüntetését, nem pedig az alapbetegség definitív kezelését szolgálja. Elengedhetetlennek tűnik, hogy olyan terápiákat alakítsunk ki, amelyek a betegségek etiológiájának és patogenezisének jobb megértésén alapulnak. A neurodegeneratív betegségektől eltérően, amelyek elsősorban az idegrendszer specifikus sejtípusait érintik, a pszichiátriai zavarokban az idegrendszer számos területe és különféle

sejttípusok lehetnek érintettek. Az összegzett bizonyítékok arra utalnak, hogy a hippocampus szerkezeti és funkcionális rendellenességei többféle mentális betegséggel társulhatnak, ami azt jelzi, hogy ez a jól körülírt régió olyan agyterület lehet, amely fokozottan kiszolgáltatott ártalmas környezeti hatásoknak, és ezáltal az új típusú, bizonyítékon alapuló (evidence based) terápiák speciális célpontjává válhat (Kang és mtsai 2016).

A szkizofrénia (SZ) az egész személyiséget megváltoztató, minden szociális réteget egyformán érintő, komplex poligénes öröklődésű pszichiátriai zavar (Henriksen és mtsai 2017). Súlyos tünetekkel járó, krónikus lefolyású, a lakosság mintegy 1%-át érintő mentális betegség. Ez az Egészségügyi Világszervezet nyilvántartása alapján számokban kifejezve azt jelenti, hogy a szkizofrénia világszerte körülbelül 80 millió embert érint. A diagnózis felállítása a pszichiátriai betegvizsgálaton, az anamnézis felvételén és a beteg mentális státuszán alapszik, mivel máig nem áll rendelkezésre olyan biológiai marker, képalkotó, vagy laboratóriumi teszt, amely megbízhatóan jelezné a betegséget (Sadock és mtsai 2015). A Magyarországon diagnosztizált betegek megközelítőleg fele részesül minden szempontból megfelelő kezelésben (Réthelyi és Sawalhe 2011). Kialakulásában mind környezeti (például prenatális hatások, lakókörnyezet, droghasználat), mind genetikai tényezők szerepet játszanak. A SZ kialakulásának rizikója, ha az elsőfokú rokonságban érintett valaki, az átlagpopulációhoz képest 10-szeres. Az ikervizsgálatok alapján, magas heritabilitású betegségről beszélünk, melynek értéke  $\sim 0,81$  (0-1 közötti skálán) (Henriksen és mtsai 2017).

A SZ spektrumbetegségnek tekinthető, vagyis változatos megjelenésű tünetekkel járó állapot, ezért gyakran szkizofrénia-betegségcsoportról, vagy szkizofrénia-spektrum zavarról is beszélnek (Tringer 2010). Általában fiatal felnőtt korban (nemtől függően 15-35 évesen) jelentkeznek az első tünetek, férfiak és nők között a betegség egyenlő arányban fordul elő, azonban a kezdete és lefutása különböző lehet. Férfiaknál az incidenciasűrűség maximuma a 15-25 éves, míg nőknél 25-35 éves korosztályban figyelhető meg. A betegség tüneteinek többféle felosztása ismert, általában pozitív és negatív tünetekbe csoportosítják ezeket. Pozitív tünetek lehetnek hallucinációk/érezéscsalódások, téveszmék, fellazult asszociációk, bizarr viselkedés, míg negatív tünetként említhetjük a szociális élet negatív irányú változását, beszűkült



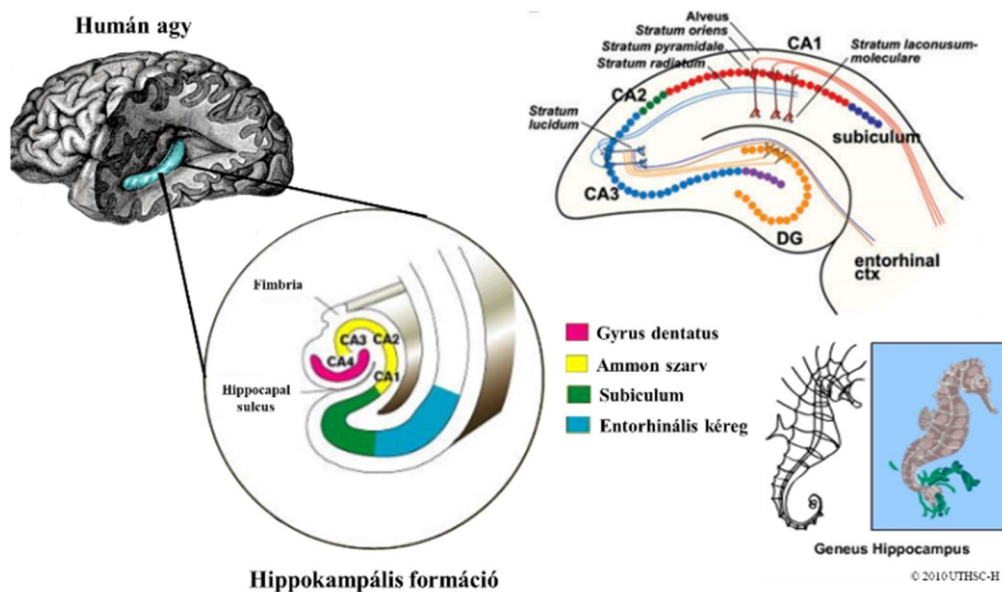
szociális kapcsolatokat, az érzelmi sivárságot, a motiváció hiányát, illetve a lassult, színtelen beszédet. A Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV, American Psychiatric Association 2000) ajánlása alapján megkülönböztetünk paranoid, dezorganizált, katatón, differenciálatlan és reziduális szkizofréniát. Kraepelin és Bleuler leírásai óta a betegség diagnosztikája számos pontban, tüneti, kritériumok, altípusok, változott ugyan, de munkásságuk a mai napig meghatározó pilléreként szolgál. Kraepelin nevéhez fűződik a dementia praecox fogalmának megalkotása. Az etiológiáról és a pszichiátriai rendellenességekről alkotott elméletei alapján születtek meg a mai fő diagnosztikai rendszerek. Bleuler ismerte fel elsőként a SZ heterogentitása mellett az összekötő jegyeit, ő alkotta meg a szkizofréniát szót is (Réthelyi és Sawalhe 2011). A jelenleg használt DSM-5 rendszer a korábban bemutatott klinikai altípusokat már nem használja (Nussbaum 2013). A szkizofréniának máig nincs olyan azonosított tünete, amely kétséget kizáróan igazolná vagy cáfolná a SZ meglétét. Tünettani sokszínűsége miatt két megközelítést alkalmaznak a SZ diagnosztikában, az alcsoportokat létrehozó kategóriális, és a tünetek súlyosságán alapuló dimenzionális szemléletet (Réthelyi és Sawalhe 2011).

A SZ kezelésének egyik alapját az antipszichotikus gyógyszeres kezelés adja, de fontos szerepet kap a betegek pszichoedukációja és a kognitív szemléletű pszichoterápia is. A leghatékonyabb eredményt azonban ezen módszerek együttes, kiegészítő alkalmazása eredményezi (Sadock és mtsai 2015). A farmakológiai és pszichoszociális terápiás lehetőségek jelentős fejlődése ellenére azonban a betegek egyharmada nem reagál a meglévő kezelési beavatkozásokra (Kahn és Keefe 2013, Van Os és Kapur 2009). A gyógyszeres kezeléseknél fennálló problémák, illetve a betegség molekuláris és neurobiológiai hátterének ismeretlen volta új kutatási megközelítések szükségességére mutat rá a szkizofréniát etiológiájának felderítésében.

A SZ kialakulásának szempontjából érdekes felismerés például, a felnőtt hippokampális neurogenesisben megfigyelhető körülmények és az öregedés, az epilepszia, valamint egyes neurodegeneratív illetve pszichiátriai zavarok közötti kapcsolat (Fabel és Kempermann 2008).

A hippokampális formáció az agy archikortikális területe, a limbikus rendszer részét képezi. Henger alakú, görbült test az agyvelő oldalsó kamrájában, nevét is innen kapta. Tengeri csikóra emlékeztető kinézete alapján a görög „hippo”, mint ló és a

„kampos”, mint tengeri szörny alkotta szóval nevezték el. Két tekervényből, az Ammon-szarv (Cornus Ammonis: CA, összeköttetések alapján CA1, CA2, CA3, CA4 szektorok) és a gyrus dentatus (GD), valamint egy átmeneti zónából, a subiculumból áll (lásd 3. ábra). Három rétege a következő sejteket tartalmazza: 1. molekuláris réteg: granula sejtek, entorhinalis kéreg afferensei, moharostok a nucleus dentatusból. 2. piramissejtek rétege. 3. oriens réteg: kosársejtek, interneuronok. Többségében glutamaterg principális sejtek (~90%), kisebb részben pedig GABAerg interneuronok alkotják (Woodson és mtsai 1989). A hippocampusz reciprok kapcsolatban áll az asszociációs kéregterületekkel. A deklaratív memória és a kognitív tulajdonságok egyik központja. Szekvenciális információfeldolgozás jellemzi. Ez azt jelenti, hogy képes a neokortikális „sűrű” mintázatot „ritka” mintázattá alakítani, azaz a tárolt információ-mintázatok interferenciáját csökkenti.



**3. ábra: A hippocampális formáció anatómiája, főbb részei, főbb pályái.** A hippocampusz kapcsolatait a triszinaptikus kör írja le, amelyben a bemeneti perforáns pálya az entorhinalis kéregből a granulasejteken végződik. Azok axonjai, a moharostok a CA3 piramissejteket idegzik be. A CA3 piramissejtek axonjai a Schaffer kollaterálisok a CA1 piramissejtekhez és ellenkező oldali hippocampuszba haladnak tovább. A CA1 kimenete a fornix, a subiculumba, az entorhinalis kéregbe, a limbikus rendszer egyéb részeibe mutat.

A kép a felsorolt hivatkozások alapján készült: [https://en.wikipedia.org/wiki/Hippocampus\\_anatomy](https://en.wikipedia.org/wiki/Hippocampus_anatomy),  
<https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/m/s4/chapter05.html>,  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6761599/>,  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982202707781#FIG1>

A hippocampus azért is nagyon érdekes agyterület, mert az oldalsó agykamrák szubventrikuláris zónái mellett itt marad csak meg a neurogenesis folyamata felnőtt korban. Az 1960-as években Smart (1961) munkássága, majd Altman és munkatársai (Altman és Das 1965, Altman és mtsai 1970) tríciummal megjelölt timidin (3 H-TdR) autoradiográfia segítségével végzett kísérletei is bizonyították a felnőttkori neurogenesis meglétét számos emlős agyban. Azonban csak Gross 2000-ben megjelent cikke döntötte meg az addig elfogadottnak számító dogmát, miszerint „új idegsejtek nem alakulnak ki a felnőtt emlős agyban” (Gross 2000).

Azt azonban még nem tudjuk biztosan, hogy a károsodott felnőttkori hippocampus neurogenesis közvetlenül hozzájárul-e a pszichiátriai rendellenességek patogeneziséhez. Továbbra is kérdés, hogy ezek a hippocampális változások csupán válaszok a különböző patológiai eltérésekre, avagy a betegségek patofiziológiás részét képezik, vagy mindkét folyamatnak részét képezik. Érdekes módon a legtöbb pszichiátriai kórkép, például súlyos depresszió, szkizofrénia, szorongásos zavarok és szerfüggőség esetén is a GD sejtek proliferációjának és a hippocampus térfogatának csökkenéséről számoltak be, amelyek összefüggésben vannak a hippocampus-függő funkciókkal, mint például a munkamemória, a kontextustól függő memória és felismerési memória, valamint a térbeli minták szétválasztása (Lie és mtsai 2004, Mirescu és mtsai 2006, Reif és mtsai 2007, Revest és mtsai 2009). Számos tanulmány kimutatta a hippocampus kisebb térfogatát mind fiatalok, mind felnőtt szkizofrén betegeknél (Kálmán és mtsai 2016). A hippocampus térfogatának csökkenése leginkább a szürkeállomány csökkenését jelenti, ami memóriahiányhoz és a kognitív funkciók romlásához vezethet (Goldman és Mitchell 2004). Fontos megfigyelés, hogy pszichiátriai kórképekben szenvedő betegek hippocampusának ezek a szerkezeti és funkcionális változásai csillapíthatók vagy megfordíthatók antidepresszánsokkal, antipszichotikumokkal vagy fokozott fizikai testmozgással (Erickson és mtsai 2014, Kempermann és mtsai 2010).

Mindezen tanulmányok felvetik annak a lehetőségét, hogy a felnőttkori neurogenesis diszfunkciója okozati szerepet játszhat a pszichiátriai tüneteknél, és hogy a felnőttkori neurogenesis új terápiás célpontként szolgálhat, különösen az antidepresszánsok neurogenesis által közvetített hatásaival (Kang és mtsai 2016). Így a felnőttkori neurogenesis szabályozó endogén mechanizmusok megértése kritikus

betekintést adhat a pszichiátriai rendellenességek sikeres kezelésébe, és megkönnyítheti a specifikusabb terápiás stratégiák kidolgozását.

A szkizofrénia neurodevelopmentális modellje szerint a SZ az idegfejlődési diszreguláció viselkedési eredménye, amely jóval a klinikai tünetek megjelenése előtt kezdődik (Owen és O'donovan 2017, Singh és Grange 2006). Ezt a hipotézist különböző kutatási irányok támasztották alá. Például, strukturális változásokat dokumentáltak a prodromális tünetekkel küzdő gyermekek agyában (Rapoport és mtsai 2012). A szkizofrén betegekben megfigyelt változások magukba foglalják a megnagyobbodott laterális és harmadik kamrákat, a csökkent szürke- és fehérállományt (Lawrie és Abukmeil 1998, Wright és mtsai 2000). Ezek a csökkenések túlnyomórészt a hippocampusban (Nelson és mtsai 1998), a thalamuszban (Konick és Friedman 2001) és a frontális lebenyekben voltak megfigyelhetők (Davidson és Heinrichs 2003). *Post mortem* agyminták génexpressziós vizsgálatai többek között a preszinaptikus funkcióval, a mielinizációval és a migrációval összekapcsolható gének expressziójában bekövetkezett változásokat mutattak ki, amelyek az idegi fejlődés zavaraira utalnak. Meg kell azonban jegyezni, hogy ezen eredmények többsége viszonylag kis mintaszámmal rendelkező vizsgálatokból származik, és a betegek farmakológiai kezelésének szempontjából sem kontrolláltak (Kumarasinghe és mtsai 2012). A neurodevelopmentális hipotézist alátámasztó eddigi legerősebb indirekt bizonyíték a genom-szintű vizsgálatokból származik, amelyek számos, idegi fejlődésben fontos genetikai polimorfizmust azonosítottak SZ rizikó variánsként (Rapoport és mtsai 2012).

Az az elképzelés, hogy a kóros felnőttkori hippocampális neurogenesis szerepet játszhat a szkizofrénia tüneteiben vagy patogenezisében, *post mortem* és funkcionális képalkotó vizsgálatokon alapul. A szkizofrénia szenvedő betegek *post mortem* agymintáin ugyanis megfigyelték a hippocampus sejtproliferációs markereinek csökkent expresszióját (Reif és mtsai 2007), illetve GD sejtjeinek károsodását. Ezzel a megfigyeléssel korrelálnak a képalkotó vizsgálatokat összegző meta-analízisek eredményei, melyek egyrészt csökkent hippocampális térfogatot, másrészt neuronok csökkent számát írtak le szkizofrén betegekben (Maxwell és mtsai 2019). Érdekes, hogy számos tanulmány összefüggést mutatott a SZ viselkedési és kognitív tüneteinek enyhülése és a hippocampus térfogatának normalizálása között, összekapcsolva ezzel a rendellenesség anatómiai és kognitív tüneteit a hippocampuszal (Kang és mtsai 2016).

A felnőttkori hippokampusz károsodott neurogenézise, mint a diszregulált fejlődésneurológiai folyamatok egyik formája, hozzájárulhat a szerkezeti változásokhoz és a hippokampusz-függő affektív és kognitív tünetekhez (Kang és mtsai 2016).

A SZ neurodevelopmentális elmélete mellett fontos megemlíteni az ezeket kiegészítő, részben egymással vetekedő neurokémiai elméleteket, melyek szintén állatkísérletes, neuropatológiai és humán farmakológiai eredményeken alapulnak. Számos eredmény utal a dopaminerg és glutamáterg neurotranszmisszió eltéréseire, ezen belül az NMDA-receptor alulműködésére, valamint GABAerg diszfunkcióra szkizofréniában (Crowley és mtsai 2013, Réthelyi és mtsai 2013).

A szkizofréria genetikai hátterének vizsgálatai, - melyek az etiológia felderítésének másik fontos vonulata, - asszociációs vizsgálatokkal, biológiai kandidáns és pozicionálisan kandidáns gének feltérképezésével indult. Ezek során olyan gének kerültek a figyelem középpontjába, mint például a katekol-O-metiltransferáz, a neuregulin, avagy a disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) (1. táblázat).

**1. táblázat: A szkizofréria biológiai és pozicionális kandidáns génjei (Benkovits és mtsai 2016)**

Gén	Pozíció	Biológiai funkció
Neuregulin1 (NRG1)	8p12	Parakrin és juxtakrin aktiváció révén szinaptikus plaszticitás, neuronális migráció, neuron-glia kapcsolat
Katekol-O-metiltransferáz (COMT)	22q11.2	Prefrontális kortexben dopamin lebontás metiltransferáció révén
Disrupted In Schizophrenia 1 (DISC1)	1q42.2	Neuronális proliferáció, neurogenézis, migráció a citoszkeleton stabilizálása révén
Dystrobrevin Binding Protein 1, Dysbindin-1 (DTNBP1)	6p22.3	Glutamáterg neurotranszmisszió szabályozása NMDA-receptorok révén, BDNF-fel interakcióban működik
Regulator of G-protein signalling 4 (RGS4)	1q23.3	GTP-áz aktivátor, negatívan regulálja a metabotróp glutamát receptort

Később, a technika fejlődésével, az úgynevezett SNP-chipek elterjedt használatával (melyek egy millió feletti, a populációban elterjedt egy pontos nukleotid polimorfizmust tudnak egyszerre vizsgálni), mérhetővé váltak a genom-szintű asszociációk és a ritkább kópiaszám variációk (copy number variation, CNV) is. Érdekes módon a CNV-k gyakoribb előfordulása volt kimutatható, azonban ezek nem bizonyultak SZ specifikusnak (Farrell és mtsai 2015). A genom-szintű asszociációs

vizsgálatokkal (genome wide association studies, GWAS) új kandidáns géneket, illetve kromoszómális régiókat fedeztek fel, mint például a CACNA1C kalcium csatorna, 6p21-23 régió, avagy a MIR137 mikro-RNS gén (He és mtsai 2018). A GWAS eredményei – többek között – a szkizofrénia poligénes jellegét erősítették meg és felhívták a figyelmet a ritka genetikai variánsok lehetséges szerepére is (2. táblázat).

**2. táblázat: A genom-szintű vizsgálatok során azonosított szkizofrénia rizikóvariánsok (Füredi és mtsai 2015)**

Génnév	Pozíció	Biológiai funkció	Hivatkozás
Különböző CNV-k	1q21 2p25 15q11 16p11 22q11	Számos gén expresszióját szabályozzák mikrodelécio és mikroduplikáció révén.	(Stefansson és mtsai 2008)
mikroRNS 137 (MIR137)	1q21.3	Számos szkizofrén kandidáns gén posztranszkripció szabályozásában vesz részt.	(Ripke és mtsai 2011)
Dopamin 2 receptor (DRD2)	11q23.2	Klasszikus biológiai kandidáns gén. Gi G-proteinen keresztül csökkentik a cAMP-szintet, és így a PKA-aktivitást	(Ripke és mtsai 2013)
Major hisztokompatibilitás komplex (MHC) gének	6q21.3-22.1	Felelősek a celluláris immunválaszhoz kötött antigén-prezentációért. Szerepük lehet a szinaptikus plaszticitásban.	(Stefansson és mtsai 2009), (Ripke és mtsai 2011), (Shi és mtsai 2009)

A legújabb exom- és teljes-genom-szekvenálási adatokkal sem sikerült a SZ genetikai hátterét egyértelműen feltérképezni, megmagyarázni. Új lehetséges magyarázatként megjelent a retrotranszpozonok aktivitásának növekedése (Misiak és mtsai 2019), a ritka genetikai variánsok (mutációk) egyedenként nagyobb hatásának szerepe, valamint számolnunk kell a gén-gén és gén-környezet kölcsönhatás meghatározó befolyásával is (Cheong és mtsai 2017).

A *de novo* mutációk (DNM) az egy pontos nukleotid polimorfizmusok (single nucleotide polymorphism, SNP) egy alosztályát jelentik azokban az esetekben, amikor a mutációk újonnan (tehát nem szülőitől örököltén) jelennek meg egy adott generációban, és ezzel egyedülálló genetikai variációs forrásként járulnak hozzá például egyes betegségek kialakulásához.

A pszichiátriai zavarok hátterében feltárt különböző genetikai variánsok molekuláris hatásait vizsgálhatjuk iPSC-alapú módszerrel. Ennek a megközelítésnek az

összefoglalása olvasható a 3. táblázatban. (Hoffmann és mtsai 2020). A speifikusan SZ-re vonatkozó iPSC vizsgálatokat a következő fejezetben foglaltuk össze.

**3. táblázat: Pszichiátriai kórképek kialakulásában feltételezhetően szerepet játszó funkcionális genetikai variánsok összejt alapú betegségmodellezései.**

A táblázat a Hoffmann és mtsai 2020 összefoglaló táblája alapján készült. A táblázatban elsőként használt rövidítések: AD: Alzheimer-kór, ALS: amyotrófiás laterális szklerózis, ASD: autizmus spektrum zavar, BD: bipoláris zavar, EB: embriótestecske, iN: induced neuron (indukált idegsejt), MD: major depresszió, mEPSC: miniature excitatory postsynaptic current (serkentő poszt-szinaptikus áram), PD: Parkinson-kór, PMDS: Phelan-McDermid szindróma (22q13 deléció, mely a SHANK3 gént is érinti)

Betegség	Variáció	Gén	Kísérleti rendszer	Sejttípus	Kulcsfontosságú megállapítások	Ref.
ASD, SZ	CNV (2p16.3)	NRXN1	Izogenikus hESC, kondicionális heterozigóta mutációk	Kortikális glutamaterg iN, kortikális neuron	Sérült preszinaptikus neurotranszmisszió, csökkent spontán mEPSC frekvencia és amplitúdó.	(Pak és mtsai 2015)
SZ	CNV (15q11.3)	CYFIP1	Beteg-kontroll iPSC	Neuronális rozettából létrehozott NPC	Csökkent adherens kapcsolódás és apikális-bazális polaritás.	(Yoon és mtsai 2014)
BD, SZ	CNV	PCDH15 RELN1	Beteg-kontroll iPSC, kontrollból létrehozott iPSC-ben izogenikus homozigóta mutációk	EB, glutamaterg és GABAerg iN	A beteg neuronok fokozott AMPA és GABA receptor szenzitivitással rendelkeztek.	(Ishii és mtsai 2019)
BD, MD, SZ	Exon 12 4-bp deléció	DISC1	Beteg-kontroll iPSC, kontroll iPSC-ben izogenikus heterozigóta mutáció, beteg iPSC-ben mentett izogenikus mutáció	EB-ből létrehozott vegyes előagyi neuronok	A károsodott preszinaptikus funkciók vizsgálata a beteg és a génszerkesztett kontroll iPSC-ben. A hibát a génszerkesztett beteg iPSC-ben mentették.	(Wen Z. és mtsai 2014)
BD, MD, SZ	Exon 12 4-bp deléció	DISC1	Beteg-kontroll iPSC	EB-ből létrehozott vegyes előagyi neuronok	A mutáns DISC1 és az ATF4 közötti kölcsönhatás aberráns génexpressziót eredményez, amelyet az overexpresszált ATF4 ment.	(Wang és mtsai 2019)
BD, MD, SZ	Exon 2 és exon 8 deléciók	DISC1	Izogenikus homozigóta exon 2 vagy heterozigóta	EB-ből létrehozott vegyes előagyi	A mutációk a fokozott Wnt-jelátvitel miatt a dorzális elköteleződést támogatja. Ez elősegíti a	(Srikanth és mtsai 2015)

Betegség	Variáció	Gén	Kísérleti rendszer	Sejttípus	Kulcsfontosságú megállapítások	Ref.
			exon 8 deléciók	neuronok	korai NPC differenciálódást és a kortikális réteg károsodását. Mentés Wnt-antagonistákkal.	
BD, MD, SZ	Exon 2 és exon 8 deléciók	DISC1	Beteg-kontroll iPSC, kontroll iPSC-ben izogenikus heterozigóta mutáció, beteg iPSC-ben mentett izogenikus mutáció	Kortikális glutamaterg iN	A csökkent neuritkinövéseket az UNCD5 aktiválása menti, valamint a UNCD5 csendesítése a vad típusú idegsejtekben a mutáció fenotípusát utánozza.	(Srikanth és mtsai 2018)
ASD, PMDS	deléció	SHANK3	Beteg-kontroll iPSC	Vegyes előagyi neuronok	A megnövekedett input ellenállás és a sérült excitatórikus transzmisszió kevesebb serkentő szinapszissal és glutamát receptorral társul. SHANK3 komplementációja a sérült transzmissziót menti csak.	(Shcheglov és mtsai 2013)
ASD, PMDS	deléció	SHANK3	Izogenikus hESC, kondicionális heterozigóta mutációk	Kortikális glutamaterg iN	A SHANK3 mutációk erősen csökkentik a HCN csatorna működését, és a dendritikus arborizáció károsodását, a szinaptikus válaszok csökkenését, valamint a bemeneti ellenállás és az idegsejtek ingerelhetőségének növekedését okozza.	(Yi és mtsai 2016)
SZ	SNP	MIR137	SZ betegből izogenikus iPSC	Kortikális glutamaterg iN	Az eredeti (vad típusú) gén variáns csökkenti a miR-137 expresszióját és érettebb idegsejt fenotípushoz vezet <i>in vitro</i> a génmódosított állélhez képest.	(Forrest és mtsai 2017)
SZ	SNP	FURIN TSNARE1 CLCN3 SNAP91	Kontroll izogenikus iPSC	Kortikális glutamaterg iN (NPC és érett neuron), GABAerg iN, indukált asztrocita	A FURIN-ban megjelenő SNP csökkenti a neurit hosszát és az idegsejtek aktivitását a serkentő iN-ekben. A többszörös rizikógének CRISPRa/i történő szabályozása szinaptikus	(Schrode és mtsai 2019)



Betegség	Variáció	Gén	Kísérleti rendszer	Sejttípus	Kulcsfontosságú megállapítások	Ref.
					rendellenességeket, szinergikus hatásokat okoznak.	
SZ	SNP	FOXG1	Primer főtális progenitor	Primer főtális neuron	Az FOXG1-től 760 kb távolságra lévő SNP szabályozza az FOXG1 expresszióját.	(Won és mtsai 2016)
SZ	SNP		Egészséges donorból izogenikus iPSC	Kortikális NPC	A GWAS lókuszokban lévő SNP-k kromatin kölcsönhatás révén szabályozzák az ASCL1, EFNB1 és MATR3 génexpresszióját.	(Rajarajan és mtsai 2018)
AD, ALS, ASD, BD, MD, SZ	SNP		Egészséges donorból izogenikus iPSC	Serkentő és motoros iN, gyrus dentatus idegsejtek, elsődleges magzati asztrociták	PIR (promoter interacting region) dúsulása figyelhető meg a sejtorsot meghatározó génekben, valamint a pszichiátriai kórképek rizikó faktorainál.	(Song és mtsai 2019)
ASD, BD, MD, SZ	CNV (2p16.3)	NRXN1	Beteg-kontroll iPSC	Glutamaterg (NGN2) és GABAerg (ASCL2 / DLX2) iN	A heterozigóta NRXN1 deléció érinti a neuronális és szinaptikus funkciókat. Az NRXN1 deléciós eredetű <i>de novo</i> izoformái potenciálisan domináns negatív módon hatnak.	(Flaherty és mtsai 2019)

### 1.3. iPSC alapú betegségmodellezés szkizofréniában

Az első iPSC alapú betegségmodellezési tanulmányok monogénes betegségekre összpontosítottak. A kutatások következő hullámában elkezdték a poligénes pszichiátriai és neurológiai betegségeket is vizsgálni, beleértve az emberi populációkban elterjedt genetikai variációk szerepét is (Zeltner és Studer 2015). A következő lépés a betegség-specifikus iPSC-k voltak, amelyek az ok-okozati folyamatok feltérképezésének elsődleges eszközivé váltak. Az iPSC-k bizonyos vélemények szerint olyanok lesznek, mint az elmúlt két-három évtizedben az egérmodellek voltak. Az elkövetkező néhány év során folyamatosan összeáll az iPSC-modellek gyűjteménye, gyakorlatilag bármilyen betegség és bármilyen betegséggel összefüggő génmutáció számára. Ezeket a sejtmódelleket egyre inkább más feltörekvő technológiákkal együtt

használják, ideértve az organoidokat és más CRISPR-izogén rendszereket, a szerveket a chipeken és az xenograftokat (Ho és mtsai 2018).

Az iPSC alapú betegségmodellezés központi gondolata, hogy betegekből származó sejtvonalak neurális irányú differenciáltatásával olyan molekuláris és funkcionális fenotípusokat tudunk vizsgálni, amelyek különbségeket mutatnak egészséges kontroll személyekből létrehozott sejtvonalakhoz képest. Ezek az *in vitro* vizsgálatok előrébb vihetnek minket az *in vivo* folyamatok, molekuláris betegségútvonalak megértésében. A betegségmodellezés elsődleges célja tehát nem a sejterápiás, sejtranszplantációs lehetőség kialakítása.

A neuropszichiátriai zavarok iPSC-kből származó modelljeinél az első kutatások leginkább olyan neurodegeneratív kórképekre irányultak, ahol a betegség patológiai leírása sokkal előrébb tart, úgymint az Alzheimer-kór (Essayan-Perez és mtsai 2019), a Parkinson-kór (Parmar és mtsai 2020, Schwamborn 2018) és a Huntington-kór (Wu és mtsai 2019). Azért is indult meg ez az irányvonal hamarabb, mert az őssejt-alapú terápiák könnyebben megvalósíthatóknak tűntek ezekben a jobban definiált betegségekben. Azonban hamar felzárkóztak az autizmus spektrum zavarokról (autism spectrum disorder, ASD) és szkizofréniáról szóló tanulmányok is (Brennand és mtsai 2015, Hoffmann és mtsai 2020, Russo és mtsai 2009). Később olyan monogénes, illetve kromoszóma-aberrációs rendellenességekről is számos kísérletes munka született, melyek pszichiátriai fenotípusokat (is) okoznak, mint például a 22q11.2 (DiGeorge) vagy a 22q13.3 (Phelan-McDermid) mikrodelécós szindrómák, amelyek autizmus spektrum zavarral járnak (Drew és mtsai 2002), illetve a nagyobb kromoszóma régiókat érintő Down-szindróma (Faundez és mtsai 2018), Törékeny X-szindróma (Faundez és mtsai 2018) és Timothy-szindróma (Coskun és Lombardo 2016).

A SZ-asszociált genetikai variánsok hatásait közvetlenül és közvetve is vizsgálták iPSC-kben, azaz ismert genetikai variánsokkal rendelkező sejtvonalak (például DISC1, 22Q11DS), illetve szórványos SZ-esetekből azonosított genetikai változatok tanulmányozásával (Mcneill és mtsai 2020). Az szkizofrénia iPSC alapú betegségmodellezési területén Brennand munkacsoportja úttörő volt (Brennand és mtsai 2011), melyet egy sor tanulmány követett. Ezek a tanulmányok nagyrészt glutamaterg szinaptikus diszfunkciót azonosítottak, valamint megnövekedett oxidatív stresszválaszt, mint potenciálisan szignifikáns *in vitro* SZ fenotípust találtak (4. táblázat). A 4.

táblázatban szereplő publikációk igazolják az *in vitro* betegségmodellek pszichiátriai zavarok kutatásában történő relevanciáját és felhasználhatóságát, miközben betekintést adnak a lehetséges metodikai megközelítésekbe, részletezve a kiindulási sejtek, a visszaprogramozási technikák és a differenciáltatott sejtek sokféleségét.

A 4. táblázat is mutatja, hogy a rendelkezésre álló technikák segítségével sok fajta sejtből, többféle visszaprogramozási módszerrel nyerhetünk indukált pluripotens őssejteket, amelyekből különböző differenciálási protokollok közül választva hozhatjuk létre a számunkra releváns sejteket. A cél mindig a legkevesebb beavatkozással elérni a betegség szempontjából releváns sejtípust.

**4. táblázat: A szkizofrénia iPSC alapú betegségmodellezésének átfogó táblázata (Mcneill és mtsai 2020)**

<b>Biológiai ismétlés (n)</b>	<b>Testi sejt eredete</b>	<b>Visszaprogramozási technika</b>	<b>iPSC differenciáció</b>	<b>Hivatkozás</b>
4 beteg; 3 kontroll	Fibroblaszt	Lentivírus	NPC	(Brennand és mtsai 2011)
3 beteg; 2 kontroll	Fibroblaszt	Retrovirális	Glutamaterg neuron	(Pedrosa és mtsai 2011)
1 beteg; 1 kontroll	Fibroblaszt	Retrovirális	NPC	(Paulsen Bda és mtsai 2012)
3 beteg; 2 kontroll	Hajhagyma keratin sejt	Lentivírus	NPC, Glutamaterg neuron	(Robicsek és mtsai 2013)
2 beteg; 2 kontroll	Fibroblaszt	Lentivírus	Neuron	(Bundo és mtsai 2014)
4 beteg; 5 kontroll	Fibroblaszt	Lentivírus	NPC	(Hashimoto-Torii és mtsai 2014)
4 beteg; 3 izogenikus kontroll	Fibroblaszt	Episzómális	Előagyi NPC, kortikális neuron	(Wen Zhexing és mtsai 2014)
3 beteg; 3 kontroll	Fibroblaszt	Episzómális és Sendai vírus	NPC	(Yoon és mtsai 2014)
4 beteg; 6 kontroll	Fibroblaszt	Lentivírus	Előagyi NPC	(Topol és mtsai 2015)
4 beteg; 6 kontroll	Fibroblaszt	Lentivírus	Előagyi NPC	(Brennand és mtsai 2015)
1 beteg; 1 kontroll	Fibroblaszt	Lentivírus	NPC, Glutamaterg neuron	(D'aiuto és mtsai 2015)

<b>Biológiai ismétlés (n)</b>	<b>Testi sejt eredete</b>	<b>Visszaprogramozási technika</b>	<b>iPSC differenciáció</b>	<b>Hivatkozás</b>
2 beteg; 1 kontroll	Fibroblaszt	Sendai vírus	NPC, Neuron	(Das és mtsai 2015)
3 beteg; 5 kontroll	Fibroblaszt	Sendai vírus	NPC, Neuron, OPC	(Lee és mtsai 2015)
1 beteg; 4 izogenikus kontroll	Fibroblaszt	Lentivírus	NPC, Neuron	(Srikanth és mtsai 2015)
8 beteg; 7 kontroll	Fibroblaszt	Episzómális	Neuron	(Lin és mtsai 2016)
6 beteg; 6 kontroll	Fibroblaszt	Episzómális	Neuron	(Zhao és mtsai 2015)
2 beteg; 3 kontroll	Fibroblaszt	Episzómális	NPC	(Murai és mtsai 2016)
4 beteg; 10 kontroll	Fibroblaszt	Lentivírus, Sendai vírus	NPC	(Topol és mtsai 2016)
2 beteg; 3 kontroll	Fibroblaszt	Retrovirális	Neuron	(Toyoshima és mtsai 2016)
2 beteg	Fibroblaszt, limfocita	Lentivírus, Sendai vírus	Glutamaterg előagyi neuron	(Forrest és mtsai 2017)
1 beteg; 1 kontroll	Fibroblaszt	Episzómális	Előagyi organoid	(Ye és mtsai 2017)
2 beteg; 2 kontroll	Hajhagyma keratin sejtek	Lentivírus	Glutamaterg neuron	(Robicsek és mtsai 2018)
2 beteg; 7 kontroll; 1 izogenikus kontroll	Fibroblaszt, T-limfocita	Episzómális, Retrovirális	Glutamaterg és GABAerg neuron	(Ishii és mtsai 2019)

Számos DNM-t azonosítottak szkizofrén betegek és szüleinek vizsgálatával, azonban a legtöbb esetben ezen mutációk biológiai jelentősége továbbra sem tisztázott. Az egyes betegekben azonosított DNM-k biológiai funkcióinak feltárására az izogenikus sejt vonalak vizsgálata ad lehetőséget, amikben a mutációk létrehozása, illetve korrekciója genom-editálási módszerekkel (TALEN, CRISPR) történik.

Izogenikusnak tekintjük, nevezzük azokat a vonalakat, amelyek genetikailag mindössze egy elemben (mutáció) térnek el egymástól, lehetővé téve ezzel, hogy azonos háttér esetén az adott elem hatását vizsgálni tudjuk. Egy másik vizsgálati mód a családi (case-parent, eset-szülők) triók használata, amelyben az érintett betegből és mindkét szülőből létrehozott sejtvonalak összehasonlításával próbálják a mutációk lehetséges hatásait azonosítani. Kísérleteink során a beteg-szülő trió modellel dolgoztunk (Hathy és mtsai 2020). Későbbi terveink között szerepel ugyanezen rendszer izogenikus modelljének megvalósítása is.

#### 1.4. Neuronális differenciációs protokollok és vizsgálható *in vitro* fenotípusok

Ahhoz, hogy az idegrendszeri betegségek molekuláris mechanizmusait *in vitro* rendszerünkben vizsgálni tudjuk, a pluripotens őssejt állapotból el kell juttatni sejtjeinket a betegség szempontjából releváns érett, posztmitotikus neuronoknak megfelelő érettségi állapotba, differenciáltatnunk kell a sejtjeinket. A differenciálódási folyamat során a sejtek először még osztódó neuronális progenitorokká alakulnak, amelyek az idegrendszer neuronális őssejtjeihez hasonló sejtípust képviselnek. Számos protokoll a differenciálódásnak ezen első lépését laboratóriumi körülmények között az embriótestecske (embryoid body, EB) állapoton, majd rozztaképződésen keresztül is éri el. A differenciálódás második szakaszában a sejtek érett neuronális identitás irányában köteleződnek el, elvesztik osztódási képességüket, majd nyúlványokat növesztenek, hogy a többi idegsejttel közösen hálózatot alakítsanak ki. Bár a különböző differenciációs protokollok az *in vivo* idegfejlődésről rendelkezésünkre álló ismereteken alapulnak és a kutatási eredmények szerint a neuronok mikroszkopikus, elektrofiziológiai és ingerületátviteli tulajdonságaikban az emberi agy idegsejtjeihez hasonlítanak, nem szabad elfelejteni, hogy ez egy mesterséges modellrendszer, melynek nem ismerjük még pontosan minden tulajdonságát.

Az elmúlt évek kutatásai arra utalnak, hogy a laboratóriumi körülmények között előállított neuronok funkcionális értelemben közelebb állnak a neonatális korai neuronpopulációkhoz, mind elektrofiziológiai tulajdonságaikat, mind hálózati kapcsolataik tekintetében. *In vitro* körülmények között nem tudunk (és általában nem is célnünk) minden idegsejtípust egyszerre előállítani, hanem célzott protokollokkal speciális típusokat szeretnénk létrehozni. Ennek megfelelően külön protokollok léteznek

kortikális neuronok, előagyi GABA-erg interneuronok, hippocampális neuronok, középagyi dopaminerg neuronok, vagy gerincvelői motoneuronok *in vitro* előállítására. A különböző protokollok más és más morfogének, növekedési faktorok és kis molekulák alkalmazásával érik el, hogy a kezdetben pluripotens sejtek egy adott irányba differenciálódjanak. Ezek a morfogének *mutatis mutandis* az agyi fejlődés során *in vivo* érvényesülő hatásokat imitálják.

A pszichiátriai és neurológiai betegségek modellezése esetében elsősorban az előagyi, telencephalonból kifejlődő agyrészek neuronpopulációi lehetnek érdekesek, mert *in vivo* vizsgálati módszerekkel ezeknek az agyterületeknek a patológiai (morfológiai) és funkcionális (elektrofiziológiai) eltéréseivel találkozunk a legtöbb neuropszichiátriai kórkép vonatkozásában. Hasonlóképpen több elmélet létezik arra vonatkozóan, hogy a SZ patológiájának központjában a frontális lebeny interneuronjainak nem megfelelő működése áll (Lewis és mtsai 2012). A legújabb kutatások pedig a hippocampális neurogenesis zavarára hívták fel a figyelmet számos pszichiátriai zavarban, például major depresszióban, illetve szkizofréniában. Ezért a SZ modellezésekor többféle neuronpopulációt is érdemes vizsgálni. Az *in vitro* betegségmodellezésben a tényleges kihívást a megfelelő sejtszintű fenotípus megtalálása és annak megbízható mérése jelenti” (Hathy és mtsai 2016).

Munkánk során hippocampális neuronok létrehozására a Yu és mtsai (2014) által alkalmazott protokollt optimalizáltuk. Először a pregasztruláció és a korai gasztruláció szimulálásaként szabadon lebegő embriótestecskéket hoztunk létre. Az előagy anterior-posterior mintázatát létrehozó fejlődési kaszkádokat utánozva az EB-ket antikaudalizációs faktorok (DKK1, Noggin és SB431542) koktéljával kezeltük, amelyek blokkolták a Wnt (Wingless-related integration site), a csont morfogenetikus fehérje (bone morphogenetic protein, BMP) és a transzformáló növekedési faktor- $\beta$  (transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ) által indukált telencephalikus elköteleződési útvonalakat (Watanabe és mtsai 2005). Ezenkívül ciklopamint, a Sonic Hedgehog út antagonistáját alkalmaztuk a dorzális előagyak progenitorainak feldúsítása érdekében. A differenciációs folyamat első 20 napjának elteltével a létrehozott sejteket Wnt3a-val kezeltük, ugyanis a Wnt fehérje korábban fontosnak bizonyult a hippocampális progenitorok fenntartása és GD sejtek differenciálódása szempontjából. Sejteinket az agyi eredetű növekedési faktoral (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) is

kezeltük, amely elősegíti a hippocampusz neurogenezisének és a PROX1+ gyrus dentatus szemsesejtek képződését (Yu és mtsai 2014).

A beteg és egészséges egyénekből létrehozott neuronok esetében elsőként a sejtek morfológiáját érdemes összehasonlítani. Ebben benne foglaltatik a neuronok nyúlványainak, dendritjeinek, fizikai szinapszisokat létrehozó képességének vizsgálata. Emellett lehetőségünk van specifikus gének expressziójának vizsgálatára valós idejű PCR segítségével vagy a transzkriptom felmérésére RNS-szekvenálási technikával, melynek során a neuronpopulációkra jellemző transzkripció faktorokat, strukturális és szinaptikus fehérjéket kódoló gének expresszióját vizsgálhatjuk. A leginkább releváns celluláris fenotípusok funkcionális mérésekkel tárhatók fel. Kalcium-képzalkotási technikával vizsgálhatjuk a neuronális hálózat spontán és receptor-ligandok hatására megváltozó működését, a sejtek depolarizációját és a kalcium intracelluláris szintjének változását. Elektrofiziológiai mérésekkel a neuronok membránján létrejövő ionáramokat mérhetjük meg. Valós idejű képalkotó módszerek segítségével órákon vagy napokon keresztül követhetjük a neuronok differenciálódását és a nyúlványok növekedését. Fontos kiemelni, hogy a neuronok természetes éréséhez kulcsfontosságú a szomszédos sejtek kapcsolata, amit *in vitro* differenciálás során nem tudunk biztosítani, ezért erre ko-kultúrás tenyésztési módszerek jöhetnek szóba. Speciális megoldásként humán neuronális progenitor sejteket kísérleti állatok agyába beültetve természetes szöveti környezetben lehetséges vizsgálni fejlődésüket (Yu és mtsai 2014). Mertens és munkatársainak összefoglaló tanulmánya (Mertens és mtsai 2016) részletesen foglalkozik a visszaprogramozási technikákkal és a potenciálisan használható *in vitro* celluláris fenotípusokkal.

## 2. Célkitűzések

A szkizofrénia farmakológiai és pszichoszociális kezelési lehetőségeinek jelentős fejlődése ellenére a betegek egyharmadánál nem garantált a jelenleg elérhető terápiák sikeressége. A betegség molekuláris és neurobiológiai folyamatai komplexek és heterogének, illetve feltérképezésük, megértésük még hiányos. A betegség kialakulásában szerepet játszó molekuláris útvonalak korlátozott ismerete új megközelítéseket tesz szükségessé a szkizofrénia jobb megismerése, etiológiájának felderítésének érdekében. Ilyen eszköz lehet a betegek szomatikus sejtjeinek visszaprogramozásával létrehozott őssejtek és a belőlük differenciáltatott neuronpopulációk vizsgálata, mivel a visszaprogramozás során olyan iPSC vonalak, majd az ezt követő differenciációs lépések során olyan neurális progenitorok, majd neuronok jönnek létre, amelyek a betegekben kialakult genetikai variánsokat hordozzák. Munkánk során egy beteg-szülő trióból alkotott *in vitro* betegségmodell rendszerben vizsgáltuk a *de novo* mutációk hatásait.

Céljaink az alábbiak voltak:

1. ***In vitro* neuronális modellrendszer protokolljának beállítása kontroll vonalon, tesztrendszerben.** *Tesztrendszernek* egy a Salk Institute for Biological Studies genetikai laborjában Sendai-vírus alapú rendszerrel visszaprogramozott egészséges, kontroll iPSC-t és a későbbiekben belőle differenciáltatott neurális progenitor sejteket és idegsejteket tekintjük.

Első lépésként célunk volt irodalmi adatok alapján beállítani és optimalizálni egy neurális differenciációs protokollt, humán fibroblaszt alapú Sendai-vírusal visszaprogramozott iPSC rendszeren:

1.1. **Hippokampális neurális progenitor sejtek létrehozása,** a fejlődésbiológiai háttér vizsgálatának érdekében.

1.2. A hippokampális NPC-kből **PROX1 pozitív gyrus dentatus szemcsesejtek differenciáltatása,** amely populáció irodalmi adatok alapján érintett a SZ kialakulásában, illetve jellemzik az NPC differenciálódási potenciálját (Yu és mtsai 2014).



1.3 **Egy vizsgálati panel megalkotása és beállítása** a fibroblaszt alapú kontroll iPSC, NPC és neuron vonalakon, amellyel a későbbiekben létrehozott modelljeink molekuláris és funkcionális jellemzői összehasonlíthatóvá válhatnak. **Molekuláris** jellemzésükre immuncitokémiai festést, kvantitatív PCR-t, áramlási citometriát, RNS-szekvenálási módszereket használtunk. **Funkcionális** jellemzésükre kalcium-képző mérésekkel karakterizáltuk rendszerünket.

2. ***In vitro* szkizofrénia betegségmodell iPSC vonalainak alapítása.** Következő lépésként a fibroblaszton alkalmazott Sendai **virosszaprogramozási technikát** a pszichiátriai kutatásokban könnyebben hozzáférhető, **perifériás mononukleáris sejteken alkalmaztuk** egészséges (szülők, mint kontroll) és beteg (gyerek) iPSC vonalak alapítása és jellemzése céljából.

3. ***In vitro* szkizofrénia betegségmodell NPC és idegsejtjeinek differenciáltatása.** A fenotípus vizsgálatokhoz a kontroll iPSC-ken beállított protokoll szerint NPC-k és neuronok differenciáltatása és visszaellenőrzését végeztük.

4. **Molekuláris és funkcionális fenotípusok vizsgálata és összehasonlítása.** Betegségmodellünkben neurális progenitor állapotban kerestük azokat a megfelelő sejtszintű fenotípusokat, amik az egészséges szülők és a beteg gyerek vonalai között megfigyelhetőek és összefüggésbe hozhatóak a szkizofrénia kialakulásával.

4.1. **Neurodevelopmentális potenciál összehasonlítása.** Karakterizálni kívántuk a korábban beállított vizsgálati panel alapján a trió iPSC vonalak differenciálódási képességét (neurális progenitor, neuron képzése).

4.2. **Stresszválaszok megfigyelése.** Vizsgálni kívántuk a neurális progenitorok celluláris szintű válaszadási képességeit **sebzés indukálta sejtviándorlási és sejtosztódási** viselkedésük, **neuritnövekedési képességük**, továbbá az **oxidatív stresszre** adott válaszuk és a **mitokondriumokban** megfigyelhető **morfológiai** különbségeik alapján.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. A kísérletek alanyainak kiválasztása, *de novo* mutációk azonosítása és jellemzése

Kísérleteinkhez 4 humán alanyból származtatott sejtvonalat használtunk: egy szkizofréniában szenvedő beteg (SZ-HU PROB) és szülei (SZ-HU-MO és SZ-HU-FA), azaz egy eset-szülő trió és egy független egészséges kontroll (iPSC UCB2), részletes adataik az 5. táblázatban láthatók.

Az eset-szülő triót egy korábbi vizsgálatunk eredményei alapján választottuk ki, amikor a SZ kialakulásának szempontjából relevánsnak tartott DNM-kat kerestünk exom-szekvenálás segítségével. Az Exome Seq elemzést 100 bp hosszúságú párosított (paired-end) szekvenálással Illumina HiScan (TM) SQ platformon végeztük, amellyel mintánként átlagosan 50 M adatot („read”) nyertünk. Az eredményeket egy standard bioinformatikai processzáls (ún. pipeline) segítségével elemeztük. A 16 szkizofrén beteg és szüleinek exom-szekvenálása során 1500 lehetséges mutáció volt fellelhető új-generációs szekvenálással, majd ezek bioinformatikai filterezése révén 66 valószínű DNM-t azonosítottunk. Ezt követően Sanger-szekvenálással 12 mutációt sikerült validálni, amik között 9 DNM missense vagy nonsense mutáció volt. Ezek eloszlása egyenlőtlen volt, ugyanis 8 trióban nem találtunk DNM-t, 5 trióban volt 1-1 DNM, míg 2 családban 2 és egy családban 3 DNM-t azonosítottunk.

Az iPSC-vizsgálatba továbbvitt trió (5. táblázat) kiválasztása a DNM-k által érintett gének neuronális expressziója és funkciói, valamint a DNM-k potenciális neuronális hatásai alapján történt (6. táblázat).

**5. táblázat: A vizsgált eset-szülő trió, a kiterjesztett család és a független egészséges kontroll egyén demográfiai és klinikai adatai (Hathy és mtsai 2020)**

Kísérleti alany	Nem	Kor	Orvosi háttér	Vissza-programozási módszer	Azonosító
Szülő (Apa)	Férfi	59	Nem áll pszichiátriai kezelés alatt és nincs más ismert betegsége sem.	PBMC-k Sendai-vírus alapú visszaprogramozása	iPSC-SZ-HU-FA
Szülő (Anya)	Nő	55	Nem áll pszichiátriai kezelés alatt és nincs más ismert betegsége sem.		iPSC-SZ-HU-MO

<b>Beteg (Fiúgyermek)</b>	Férfi	24	17 éves korában szkizofréniával diagnosztizáltak, elsősorban negatív tünetek jellemzik. Az elmúlt 10 évben 4 hospitalizáció történt, klorzapinnal kezelték.		iPSC-SZ-HU-PROB
<b>Testvér (fiatalabb testvér)</b>	Nő	21	18 évesen öngyilkossági kísérletet követően bipoláris affektív zavarral diagnosztizáltak. Lítium és olanzapin kezelést kapott.	nem történt	-
<b>Testvér (idősebb testvér)</b>	Férfi	28	Nem áll pszichiátriai kezelés alatt és nincs más ismert betegsége sem.		
<b>Független egészséges kontroll</b>	Nő	újszülött	Nincs ismert betegsége.	PBMC-k Sendai-vírus alapú visszaprogramozása	iPSC UCB2

A szkizofrén beteg két testvérét, egészséges bátyját és bipoláris személyiségzavarral diagnosztizált húgát nem vettük bele sem a genetikai elemzésbe, sem a későbbi visszaprogramozásba. A kiválasztott szkizofrén beteg 3 misszensz DNM heterozigóta hordozója volt: LRRC7 (Leucine rich repeat containing 7), KHSRP (KH-Type Splicing Regulatory Protein) és KIR2DL1 (Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor, Two Domains, Long Cytoplasmic Tail, 1) gének kódoló részeiben az egyik kromoszómáján aminosav cserével járó egyponots nukleotid változást detektáltunk. Ezek közül a SIFT mutációs algoritmus a KHSRP mutációját jósolta meg a betegség szempontjából károsító hatásúnak (6. táblázat). Ezen mutációk egyike sem volt megtalálható korábban a ClinVar adatbázisban (ClinVar <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

**6. táblázat: A szkizofréria betegben azonosított mutációk leírása (Hathy és mtsai 2020).**

<b>Genomi pozíció (hg-19)</b>	1:70505093G>A	19:6416869C>A	19:55286658A>T
<b>Gén</b>	LRRC7	KHSRP	KIR2DL1
<b>Variáció típusa</b>	misszensz	misszensz	misszensz
<b>Aminosav változás</b>	Val1158Ile	Gly403Cys	Thr138Ser
<b>Nukleotid konzerváltsága</b>	gyenge	erős	nem konzervált
<b>Aminosav konzerváltsága</b>	erős	közepes	gyenge

Genomi pozíció (hg-19)	1:70505093G>A	19:6416869C>A	19:55286658A>T
SIFT	tolerált (érték: 0,37, medián: 4,32)	káros (érték: 0,03, medián: 3,54)	tolerált (érték: 0,73, medián: 3,01)
Genetikai hatás	polimorfizmus (p-érték: 0,999)	betegséget okozó (p-érték: 0,996)	polimorfizmus (p-érték: 1)

Az azonosított gének közül kettő, az LRRC7 és a KHSRP lehet biológiailag releváns a SZ patomechanizmusának szempontjából, ezért vizsgálataink erre a két génre fókuszáltak. Az LRRC7, más néven densin-180, a serkentő szinapszisok posztszinaptikus denzitás komplexének fő alkotója. Szükséges a dendrittüskék szerkezetének kialakulásához és funkciójuknak betöltéséhez. Hozzájárul a DISC1 fehérje lokalizációjához, fizikai interakcióban van az AMPA és az NMDA receptorokkal is (Fiorentino és mtsai 2016). A KHSRP egy multifunkcionális RNS-kötő fehérjét kódol, amely alternatív splicing-ban és mRNS-trafficking-ben vesz részt, valamint axonövekedésben és a dendritikustüskék kialakulásában is szerepet játszik (Briata és mtsai 2016).

### 3.2. Az iPSC és NPC vonalak létrehozása és jellemzése

#### 3.2.1 A tesztrendszer kontroll iPSC vonalának létrehozása és tenyésztése

Vizsgálati rendszerünk beállításához egy, a Salk Institute for Biological Studies genetikai laborjában, egészséges férfi fibroblasztjából, Sendai-vírus alapú rendszerrel visszaprogramozott kontroll iPSC-t használtunk, amit Dr. Fred Gage bocsátott a rendelkezésünkre (Vöfely és mtsai 2018). Ezt a sejtvonalat 8µg/ml végkoncentrációban 3-4 óráig mitomicinnel osztódásgátolt, egér embrionális fibroblasztokkal (mouse embryonic fibroblast, MEF (Merck Life Science Kft., Darmstadt, Germany) bevont felületen tenyésztettük, HUES médiumban (KO-DMEM, kiegészítve 15% KO Serum Replacement-tel (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), 100 mM glutamin, 1% nem esszenciális aminosavak, 0,1 mM β-merkaptotanol és 4 ng/ml rekombináns humán fibroblaszt növekedési faktor 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) jelenlétében.

### 3.2.2. A betegségmodell iPSC vonalainak létrehozása

Írásbeli tájékoztatás és beleegyezést követően a trió tagjaitól vérmintákat vettünk. Az átprogramozást és a kísérleti tervet az Egészségügyi Tudományos Tanács Humán Reprodukciós Bizottsága hagyta jóvá. A bemutatott kutatás etikai engedélye: Egészségügyi Tudományos Tanács, Humán Reprodukciós Bizottság (ETT HRB) Engedély száma: 33873-3/2014-EHR. Minden minta esetében a vért a PBMC izolálására alkalmas nátrium-heparinos (BD Vacutainer CPT) csövekbe gyűjtöttük. A PBMC-eket  $5 \times 10^5$  sejt/ml sűrűségben 4 napig tenyésztettük, amelyen a StemPro®-34 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) hematopoetikus tápfolyadékot kiegészítve 2 mM L-glutaminnal és citokinekkal (100 ng/ml SCF, 100 ng/ml FLT-3, 20 ng/ml IL-3, 20 ng/ml IL-6, Peprotech, New Jersey, USA) naponta cseréltük. A 4. napon a PBMC-eket Sendai vírus kittel (Fusaki és mtsai 2009) transzdukáltuk (Thermo Fisher Cytotune 2.0), amely KOS-t (hKLF4, hOCT3/4, hSOX2) és c-Myc-et hordoz. A transzdukciót követően a mintákat 12 lyukú tenyésztőlemezen 90 percig 2250 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk, majd egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk. Médiumcsere után a sejteket további 2 napig tartottuk fent ebben a közegben, majd MEF sejtekkel bevont tenyésztőlemezen, citokinek nélküli StemPro®-34 tápközegbe helyeztük őket. Hat nappal a transzdukció után a sejteken lévő tápfolyadékot fokozatosan HUES médiumra cseréltük (KO-DMEM, kiegészítve 15% KO Serum Replacement-tel (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), 100 mM glutamin, 1% nem esszenciális aminosavak, 0,1 mM  $\beta$ -merkaptotanol és 4 ng/ml rekombináns FGF2 jelenlétében). A transzdukciót követően 14-18 nappal az egyedi iPSC kolóniákat mechanikus szelekcióval MEF sejtekre raktuk át. A vírus kiürülésének és a klónok stabilizálása érdekében a klónokat 0.05%-os tripszinnel passzálva 10-es passzázsszámig vittük el. A 4. és 8. passzázsszám között a vírusrészecskék hőérzékenységét kihasználva a gyorsabb ürülést 24 órás 38,5 °C-os hőkezeléssel segítettük a passzálást követő 24 óra elteltével (Hathy és mtsai 2020). Az iPSC UCB2 vonalat, eltérően a trió iPSC vonalaktól, köldökzsinórvérből izolált mononukleáris sejtfrakcióból nyertük, ugyanazzal a visszaprogramozási protokollal.

### 3.2.3. A betegségmodell iPSC vonalainak áramlási citometriás mérései

Az áramlási citometriás méréseket a korábban közöltek szerint hajtottuk végre (Erdei és mtsai 2014). A pluripotencia vizsgálatához SSEA4-PE-t (R&D Systems, 1:25 hígítás), TRA-1-60 (eBioscience, 1:200 hígítás) és TRA-1-81 (eBioscience, 1:200 hígítás) ellenanyagokat használtunk. A MEF jelölésére anti-egér Sca-1 (Ly-6A/E) - APC, (eBioscience, 1:25 hígítás) antitestet alkalmaztunk. Az SSEA4-hez (IgG3 PE, R&D Systems, 1:25 hígítás), valamint a TRA-1-60 és TRA-1-81 (egér IgM IsotypeControl 11E10, eBioscience, 1:200 hígítás) izotípus kontrollokat használtunk. AlexaFluor-488 szekunder antitestként kecske anti-egér IgG-t, IgM-et (H + L) (Invitrogen, 1:250 hígítás) alkalmaztunk a TRA-1-60 és a TRA-1-81 esetében. A sejteket 30 percig inkubáltuk 4°C-on, permeabilizálás nélkül. A mérések előtt a halott sejtek kizárására Topro3-jodidot (Invitrogen, 1:300 hígítás) használtunk. Az adatokat a FACSaria III Cell Sorter (BD Biosciences) segítségével gyűjtöttük és az FCS Express 6 szoftverrel elemeztük.

### 3.2.4. A betegségmodell iPSC vonalainak genetikai elemzése

A kariotipizálást és a mikroszatellita (Short Tandem Repeat, STR) elemzéseket a Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika Citogenetikai Laboratóriuma (Budapest), illetve az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Ltd (Debrecen) végezte. A kromoszóma-rendellenességeket az iPSC klónok G-sávós elemzésével vizsgálták. A kariotípusokat az International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2016) szerint írták le. Az iPSC-kből genomi DNS-t (gDNS) izoláltunk Quick-DNA Miniprep Kit (Zymo Research) alkalmazásával. Az iPSC klónokat STR elemzéssel a GenePrint® 10 rendszer (Promega) segítségével ellenőrizték. A Sanger szekvenálási reakciókat a 3130 Genetic Analyzer-rel (Applied Biosystems by Life Technologies) végeztük el.

### 3.2.5. A betegségmodell iPSC vonalainak spontán differenciációs protokollja

Az iPSC-k pluripotens állapotát és a spontán differenciálódási képességük meglétét valós idejű kvantitatív PCR-val (OCT4, NANOG, T-BRACHYURY, PAX6, AFP) és immunocitokémiai festéssel (OCT3/4, NANOG, AFP,  $\beta$  III TUBULIN, SMA) teszteltük (Erdei és mtsai 2014). A MEF-en tartott iPSC kolóniákat 3

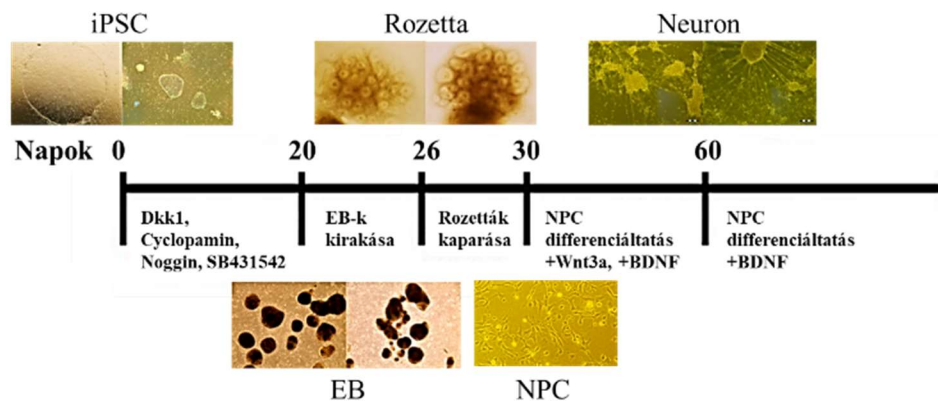
lyuk/tenyésztőlemez mennyiségben felszedtünk IV típusú kollagenázzal és az embriótestecskeket 20% FBS-sel, 1 mM glutaminnal, 1% nem esszenciális aminosavakkal és 0,1 mM  $\beta$ -merkaptoetanollal kiegészített KO-DMEM tápfolyadékban (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) úszó kultúrába helyeztük. A 6 napos szuszpenziós tenyésztés után az EB-eket további 6 napig differenciáltattuk zselatinnal bevont, 8 lyukú konfokális kamrán immunfluoreszcens festés céljából, illetve 24 lyukú tenyésztőlemezen a PCR vizsgálatokhoz.

### 3.2.6. A kontroll és a betegségmodell iPSC vonalainak NPC és idegsejt irányú differenciáltatása

Az iPSC-eket neurális progenitor sejtekké Yu és mtsai által publikált protokollban leírt módon differenciáltattuk (Yu és mtsai 2014). A differenciáltatás megkezdése előtt az iPSC-eket áttettük Matrigellel (Corning, New York, USA) bevont tenyésztőfelületre, mTeSR tápfolyadékba (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada). Ezután az 1. napon a sejteket kollagenázzal enzimatikusan passzálva (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) úszó kultúrába, letapadásmentes közegbe helyeztük át (Nalgene Nunc International, New York, USA). Ebben a közegben létrejövő embriótestecske kialakulása után a 3. napon a tápfolyadékot N2/B27-vel kiegészített DMEM/F-12, GlutaMAX™ tápfolyadékra (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) váltottuk, amelyet minden másnapi médiumcserével alkalmaztunk és a neurális-antikaudalizáció irányú elköteleződést segítő 500 ng/ml Noggin (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), 500 ng/ml DKK1 (PeproTech, New Jersey, USA), 1g/ml Cyclopamine (Merck, Darmstadt, Németország) és 4  $\mu$ g/ml SB431542 (Sigma, Missouri, USA) faktorokkal egészítettük ki. A 20. napon az EB-eket egy poliornitin (Sigma, Missouri, USA) és laminin (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) bevonattal ellátott, a letapadásukat és további differenciálódást elősegítő tenyésztőlemezeire helyeztük át.

A 27. napon vagy az azt követő néhány napon belül a manuálisan szelektált és válogatott rosettákat Accutase-os (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) emésztés után egy új 10  $\mu$ g/ml poliornitin-5  $\mu$ g/ml lamininnal bevont tenyésztőlemezeire ültettük át DMEM/F-12, GlutaMAX™ N2/B27 alapú, 20 ng/ml FGF2 és 1  $\mu$ g/ml laminint tartalmazó tápfolyadékban. Az így létrehozott NPC-k az 5. passzázs után

egységes morfológiát mutattak. A kísérletekhez p5 és a p15 passzázs közötti NPC-eket használtunk. A neuronális stádium eléréséhez az NPC-eket tovább differenciáltattuk neuron állapotig a standard protokollt követve (Yu és mtsai 2014). Az NPC-eket  $1,5 \times 10^3$  sűrűségben  $50 \mu\text{g/ml}$  poliornitin- $5 \mu\text{g/ml}$  lamininnal bevont, nyolc lyukú Nunc Lab-Tek II kamrára tettük ki (Nalgene Nunc International, New York, USA) DMEM/F-12, GlutaMAX™ N2/B27 alapú,  $200 \text{ nM}$  aszkorbinsavat (Sigma, Missouri, USA),  $20 \text{ ng/ml}$  BDNF-et (PeproTech, New Jersey, USA),  $500 \mu\text{g/ml}$  ciklikus adenzin-monofoszfátot (cAMP, Sigma, Missouri, USA),  $1 \mu\text{g/ml}$  laminint és  $20 \text{ ng/ml}$  Wnt3A-t (Research and Diagnostic Systems Inc., Minnesota, USA) tartalmazó differenciáltató médiumban. Majd 3 hét után elhagytuk a Wnt3A hozzáadását a tápfolyadékhoz. A tápközeget minden másnap cseréltük (4. ábra).



**4. ábra: Neurális progenitor és hippocampális gyrus dentatus neuronok differenciáltatási protokolljának összefoglaló idővonalí ábrája.** A hippocampális differenciáltatás során az indukált pluripotens sejtekből (iPSC) kettős SMAD inhibícióval, Wnt- és Sonic Hedgehog útvonal gátlással embriótestecskéket (EB) állítunk elő, amelyekből előagyi neurális progenitor sejteket (NPC) hoztunk létre. Ez a köztjes sejtípus tovább differenciálthatató PROX1-expresszálo érett neuronokká aszkorbinsav, cAMP, Wnt3a és BDNF adásával.

### 3.3. Immuncitokémiai festés

Az immunfluoreszcens festéseket poliornitin-lamininnal bevont 8 lyukú kamrákra kirakott NPC-ken és belőlük az előzőekben leírt módon 5 hétig differenciáltatott GD neuronokon végeztük. A sejteket Dulbecco módosított PBS-sel (DPBS) (Sigma, Missouri, USA) történő mosást megelőzően és követően 4% paraformaldehiddel (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) 15 percig



szobahőmérsékleten fixáltuk, majd 1 órán át blokkoltuk a rendszert szintén szobahőmérsékleten DPBS-ben oldott 2 mg/ml szarvasmarha szérum albumint (Sigma, Missouri, USA), 1% halzselatint (Sigma, Missouri, USA), 5% kecskeszérumot (Sigma, Missouri, USA) és 0,1% Triton-X 100-at (Sigma, Missouri, USA) tartalmazó blokkoló oldatban. A mintákat ezután szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk. A **7. táblázat** összefoglalva mutatja be a kísérletekhez használt elsődleges ellenanyagokat, amelyeket 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltunk. Kivételt képezett az anti-PROX1 és anti-MAP2, melyeket egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk.

**7. táblázat: Az immuncitokémiai festésekhez használt elsődleges ellenanyagok összefoglaló táblázata**

Elsődleges ellenanyag	Típus	Host	Hígítás	Gyártó	Kat.szám.	Marker
anti-OCT3/4	monoklonális	nyúl	1:50	Santa Cruz Biotecology	Sc-5279	iPSC
anti-NANOG	poliklonális	kecske	1:100	R&D System	AF1997	iPSC
anti-AFP	monoklonális	egér	1:500	Sigma/Merck	WH0000174M1	iPSC
anti-β III TUBULIN	monoklonális	egér	1:2000	R&D Systems	MAB1195	iPSC, neuron
anti-SMA	monoklonális	egér	1:100	Abcam	ab7817	iPSC
anti-human SOX17	monoklonális	egér	1:500	Abcam	ab84990	iPSC
anti-NESTIN	poliklonális	nyúl	1:250	Abcam	ab92391	iPSC, NPC
anti-BMP4	monoklonális	nyúl	1:500	Abcam	ab124715	NPC
anti-SOX2	monoklonális	egér	1:20	R&D Systems	MAB2018	NPC
anti-PROX1	poliklonális	nyúl	1:500	Abcam	ab101851	neuron
anti-MAP2	monoklonális	egér	1:500	Sigma/Merck	M1406	neuron
anti-MAP2	poliklonális	nyúl	1:1000	Millipore	ab5622	neuron
anti-CALB1	monoklonális	egér	1:1000	Swant Inc.	Swant#300	neuron
anti-KHSRP	monoklonális	nyúl	1:1000	Abcam	ab140648	neuron
anti-LRRC7	poliklonális	nyúl	1:500	Sigma/Merck	HPA005625	neuron

A DPBS-sel való mosás után a sejteket 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten a megfelelő másodlagos antitestekkel (8. táblázat).

**8. táblázat: Az immuncitokémiai festésekhez használt másodlagos ellenanyagok összefoglaló táblázata**

Másodlagos ellenanyag	Típus	Specifitás	Host	Hígítás	Izotípus	Gyártó	Kat. Szám
Alexa Fluor 647	poliklonális konjugált	anti-egér	kecske	1:250	IgG	Thermo Fisher Scientific	A21235
Alexa Fluor 568		anti-nyúl	kecske				A11011
Alexa Fluor 488		anti-egér	kecske				A11029
Alexa Fluor 488		anti-kecske	szamár				A11055

A magokat DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) magfestéssel (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) jelöltük. A festett mintákat Zeiss LSM 710 konfokális lézeres pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk. A fluoreszcencia képeket a ZEN 3.1 blue szoftverrel elemeztük. A konfokális képeken a jobb megjelenítés érdekében pszeudocolor színezést alkalmaztunk.

### 3.4. Génexpresszió analízis

Mind a beállító kísérleteinkben, mind a beteg-szülő trió kísérleteiben megegyező módon végeztük a génexpressziós vizsgálatokat. A trió jellemzésénél további génekkel bővítettük a panelünket. Az iPSC-kből, az NPC-kből és az idegsejtekből a teljes RNS-t TRIzol™ reagenssel izoláltuk a gyártó utasításait követve (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). 1 µg RNS-ből a cDNS mintákat gyártói ajánlással a Promega Reverse Transcription System Kit (Promega, Wisconsin, USA) segítségével állítottuk elő. Valós idejű kvantitatív PCR-hoz a következő TaqMan® esszéket (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) használtuk (9. táblázat).

**9. táblázat: A génexpressziós kísérletekhez használt TaqMan esszék listája**

TaqMan primer	Marker	Kat. Szám
OCT4	iPSC	Hs00999632_g1
NANOG	iPSC	Hs02387400_g1
T-BRACHYURY	mezoderma	Hs00610080_m1
PAX6	ektoderma	Hs00240871_m1

AFP	endoderma	Hs00173490_m1
PAX6	NPC	Hs00240871_m1
NESTIN	NPC	Hs04187831_g1
SOX2	NPC	Hs01053049_s1
NEUROD1	neuron	Hs01922955_s1
FOXP1	neuron	Hs01850784_s1
PROX1	neuron	Hs00896294_m1
GRIA1	neuron	Hs00181348_m1
GRIN1	neuron	Hs00609557_m1
RPLP0	endogén kontroll	Hs99999902_m1
KHSRP	neuron	Hs01100863_g1
LRRC7	neuron	Hs00363532_m1

Az RT-PCR elemzéseket a gyártó utasításai szerint a StepOnePlus™ valósídejű PCR szoftverrel (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) végeztük. A beteg és kontroll sejtek közötti mRNS szintekben bekövetkező változásokat a RPLP0 endogén kontroll gén felhasználásával a  $2^{-\Delta Ct}$  módszerrel határoztuk meg. A relatív mRNS szinteket 3 független kísérletből származó adatok átlagértékeiként adtuk meg, amelyet oszlopdiagramon és heatmap-en ábrázoltunk.

### 3.5. RNS-szekvenálási kísérletek

Az RNS-szekvenálási kísérleteket csak a beteg-szülő trió betegségmodell rendszerünkben végeztük el. Az RNS-szekvenálási kísérleteket három-négyszeres ismétlésszámmal minden sejt vonal NPC állapotában végeztük el. Az RNS mintákat minden NPC vonalból p7-12 passzázsszámmal izoláltuk. A könyvtár előkészítése után a mintákat az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Ltd (Debrecen) Illumina NextSeq 500 single-end szekvenálási módszerrel 75 bp hosszúságú read-ekkel (mintánként 25 M read) vizsgálta.

A szekvenálási adatok bioinformatikai elemzéseit a MTA-SE NAP-B Molekuláris Pszichiátriai kutatócsoport genetikai csoportja végezte. A Homo sapiens (hg19) referencia genomhoz való leképezéshez a Hisat2 szoftvert használtuk. A nyers adatok minőségének vizsgálatát a FastQC programmal végeztük, továbbá a read-eket a Trim Galore szoftverrel trimmeltük. A kapott read-eket az R szoftverkörnyezet

Rsubread programcsomagjának featureCounts programjával annotáltuk a génekhez. Az X és Y kromoszóma géneket kizártuk a downstream elemzésekből. A transzkriptomikai különbségek összehasonlításához az eltérő szinten expresszáldott gének (differentially expressed, DE) elemzését és főkomponens analízist (a különböző szekvenálási időpontokból adódó kötegelő hatás kiiktatása után) végeztünk, valamint az elemzésekhez és ábrázoláshoz még a DESeq2-t, a limma-t és a PCAExplorer R csomagot, valamint a Cluster 3.0-t és a TreeView-t is felhasználtuk. Két NPC vonal között azokat a géneket tekintettük eltérő expressziós szintűnek, amelyeknél a génkifejeződés logaritmus értékeinek változása nagyobb volt, mint 1 és a p-értéke kisebb, mint 0,05. A DE gének Gene Ontology (GO) és Pathway analíziséhez a WebGestalt alkalmazást használtuk (Liao és mtsai 2019). A DE géneket GO és PATHWAY szempontból szignifikánsan dúsultnak tekintettük, ha Bonferroni-korrektúrák pontszámuk kevesebb, mint 0,05 volt. A DE gének potenciális dúsulását a feltételezett KHSRP célgénekben hipergeometriai teszttel ellenőriztük. A KHSRP célgéneket az oRNAMENT adatbázis segítségével azonosítottuk (<http://rnabio.ircm.qc.ca/oRNAMENT/>).

### **3.6. A neurális progenitor sejtek és neuronok funkcionális vizsgálata intracelluláris $Ca^{2+}$ koncentrációjának változása alapján**

Mindkét kísérletsorozatban azonosan hajtottuk végre a kalcium szignál, mint egyes alapvető sejtfunkciók felmérésére alkalmas jel vizsgálatát. A tesztrendszerünk esetében annyi különbséggel, hogy idegsejteken is beállítottuk a  $Ca^{2+}$  jelátviteli méréseket, amelyekhez a neurális progenitor sejteket 4–5 hétig differenciáltattuk. Az idegi kultúrák immunocitokémia és qPCR méréseit a kalcium-képződési kísérletek után a kiválasztott, differenciáltatott lyukakon végeztük.

Kísérleteink úgy épültek fel, hogy 2 nappal a kalcium mérést megelőzően az NPC-eket poliornitin-lamininnal bevont 8 lyukú kamrára tettük ki. A Fluo-4  $Ca^{2+}$  indikátor festékkel való töltéses vizsgálatokhoz az NPC-eket szérumentes tápfolyadékban oldott 1,0  $\mu$ M Fluo-4 AM-mel (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) 30 percig, 37 °C-on inkubáltuk. Az extracelluláris Fluo-4 AM-t HBSS oldattal mostuk le (Hank's Balanced Salt Solution: Hanks' oldat, 20 mM HEPES (pH = 7,4) és 0,9 mM  $MgCl_2$ ), amelyben később az összes mérést is végeztük. A ligand

koncentrációkat az irodalmi adatok alapján választottuk meg: 100  $\mu\text{M}$  ATP, 2,5  $\mu\text{g/ml}$  tripszin (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), 10  $\mu\text{M}$  lizofoszfátsav, 50 mM KCl, 50  $\mu\text{M}$  glutamát (Sigma, Missouri, USA). A kalibrációhoz 5  $\mu\text{M}$  ionomycint (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), az alacsony extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint eléréséhez pedig ötszörös feleslegben EGTA (Sigma, Missouri, USA) oldatot használtunk. A kísérleteket Ibidi fűtőrendszeren hajtottuk végre.

A kalcium szignál mérését a celluláris fluoreszcens képek time-lapse fotózási technikával történő rögzítésével, FluoViewTiempo szoftver segítségével (v4.3, Olympus, <http://www.olympusmicro.com>) a korábban közöltek szerint végeztük (Péntek és mtsai 2016). A fluoreszcens képeket 488 nm gerjesztés mellett 505 és 525 nm közötti tartományban detektáltuk. A felvételeket ImageJ szoftverrel értékeltük ki. A fluoreszcens adatokat a glutamát adása előtti kiindulási értékéhez (F/FbaseGlu) normalizáltuk, ahol az F a kalciumjel intenzitása egy adott időpillanatban, FbaseGlu pedig a glutamát beadását megelőző 20 frame átlaga. Fmax50-et is kiszámítottuk, amely a glutamát hozzáadását követő 50 időpillanat kalcium-jelintenzitásának átlaga. Így az egyedi sejtek által adott értékekből (általában 600-750 sejt klónonként, 3 független mérésből) megkaptuk az adott mintákhoz tartozó átlag (és variancia) értékeket. Az alanyok statisztikai összehasonlításához az ANCOVA-t használtuk Fmax50/FbaseGlu függő változóval és kovariánsként az adott vonalhoz tartozó két klónnal. A statisztikai elemzést SAS 9.4-es szoftverrel végeztük.

A kalcium-képkalkotó elemzéseket a MTA-SE NAP-B Molekuláris Pszichiátriai kutatócsoport és a Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinika kutatócsoportja együttműködésben végezte.

### **3.7. Az NPC vonalak funkcionális fenotípusainak vizsgálata**

A beteg-szülő trió RNS-szekvenálási eredményei alapján a három kísérleti alanyból származtatott NPC-ken sejtproliferációs, migrációs és a neuritnövekedési tesztek is végeztünk. A proliferációs vizsgálatokhoz ~ 35.000 NPC-t helyeztünk ki 24 lyukú tenyésztőlemezre, lyukanként 3-3 párhuzamossal minden időpont esetében (2., 3. és 4. napnál). Az NPC-eket 1., 2., 3. és 4. napon felszedve és 1 mg/ml propidium-joddal (viabilitás marker) (1:600 hígítás) jelölve Attune áramlási citométeren 120  $\mu\text{l}$ -es végtérfogatban mértük. Az NPC-k stresszválasz-migrációjának értékeléséhez a

korábban leírtak szerint karcolásos vagy „sebgyógyulás” tesztet használtunk (Liang és mtsai 2007). Poliornitin-lamininnal bevont 6 lyukú tenyésztőlemezre ~ 450.000 NPC-t tettünk ki. Amikor a tenyészet elérte a teljes konfluencia állapotot, 5 ml-es szerológiai pipettaheggyel 3-3 párhuzamost húzva (tenyésztőlemez felső, középső és alsó harmadában) hoztuk létre a sebzéseket. Az NPC „vándorlását”, stresszválaszát (migráció és proliferáció kombinációja) 24 és 48 óra múlva áteső fénymikroszkóppal rögzítettük. A neuritnövekedési kísérletekhez 10 mM kalcein AM-mel megtöltött NPC-vel dolgoztunk. A 96-os tenyésztőlemezek lyukanként ~ 3.500 NPC-t raktunk ki, majd 2 óra elteltével a sejteket a nyúlványnövekedés ismert induktorával (Képiró és mtsai 2014), 10  $\mu$ M para-nitroblebbisztatin (para-nitroblebbistatin, PNBS) oldattal, illetve kontrollként a PNBS oldószerével, DMSO-val kezeltük. A neuritok növekedését egy, a fluoreszcens mikroszkópiát és egy automatizált képfelvévő és analízáló rendszert ötvöző berendezéssel, az ImageXpress Micro XLS Widefield High-Content Analysis System-mel követtük nyomon és értékeltük. Az adatokat ábrázolását és a szignifikancia értékeket a GraphPad Prism 8.3.0 szoftver segítségével határoztuk meg.

### **3.8. Oxidatív stressz és mitokondriális tesztek**

Az oxidatív stressz és mitokondriális teszteket csak a beteg-szülő trió betegségmodell esetén végeztük el. Az NPC vonalak oxidatív stressz toleranciáját  $\text{CoCl}_2$ -dal, egy jól ismert hypoxia indukáló anyaggal kezelve és ezt követő reoxigenizációval vizsgáltuk (Muñoz-Sánchez és Chánez-Cárdenas 2019). Sejtvonalanként hármásával ~ 35.000 sejt/lyuk helyeztünk ki poliornitin-laminin bevont 48 lyukú tenyésztőlemezre. Miután konfluenssé váltak a sejtek, a tápfolyadékot két különböző koncentrációban  $\text{CoCl}_2$ -tartalmú médiumra cseréltük (kontroll = 0  $\mu$ M, 125  $\mu$ M, 250  $\mu$ M). 24 óra elteltével a tápközeget normál tápfolyadékra váltottuk, amely reoxigenizációt idézett elő. Két nappal az reoxigenizálás után PrestoBlue hozzáadásával Enspire Multimode lemezolvasóval (Perkin Elmer) megmértük a sejtek életképességét. Összesen 5 független kísérletet hajtottunk végre, kísérletenként 3 technikai párhuzamossal.

Az NPC-k reaktív oxigéngyökök (reactive oxygen species, ROS) szintjét CellROX kit (Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával jellemeztük. Accutase enzimatis emésztés után a körülbelül 200.000 NPC-t tartalmazó mintákat 37 °C-on

500-szoros hígítású CellROX oldattal 30 percig inkubáltuk, amelyet háromszoros PBS-es mosás követett. Ezután áramlási citometriával (Attune NxT Flow Cytometer, ThermoFisher) határoztuk meg és hasonlítottuk össze a jelölt sejtek átlagos fluoreszcencia jeleit. A halott sejteket propidium-jodidos jelöléssel kapuztuk ki a mérésekből, és 3 független kísérlet adatait összegeztük.

A neurális progenitor sejtek mitokondriumainak morfológiáját és funkcióit Mitotracker festéssel és transzmissziós elektronmikroszkópos felvételekkel vizsgáltuk. Miután a kirakott sejtek konfluensen benőtték a rendelkezésükre álló felületet, 250 nM koncentrációban Mitotracker Red (MitoTracker™ Red CMXRos) festékkel jelöltük őket. A CellRox kitéhez hasonlóan itt is 30 perc 37 °C-on történő inkubálás után DPBS-sel mostuk, majd 4% PFA-val 15 percig fixáltuk a sejteket szobahőmérsékleten. A kapott fluoreszcens jeleket konfokális mikroszkóppal (Zeiss LSM 710) rögzítettük. Összesen 3 független kísérlet eredményeit értékeltük, amelyhez az ImageJ szoftvert használtuk. Az összehasonlítás alapjául a sejtmagokra leosztott fluoreszcencia intenzitás szolgált.

### 3.9. Statisztikai analízis

A kísérleteket legtöbbször 3-3 technikai és három biológiai ismétléssel hajtottuk végre (az ellenkező eseteket külön jelöljük). Az ábrázolt értékeket a kísérleti adatok átlagaként  $\pm$  SE-vel mutatjuk be. A csoportok összehasonlítását egyutas (one-way) vagy kétutas (two-way) ANOVA alkalmazásával végeztük, amelyet Dunn post hoc teszt követett. A kiugró értékeket Grubbs-teszttel vontuk ki a rendszerből. A  $p < 0,05$  értékben határoztuk meg a szignifikáns eltéréseket. Ha másképp nem jelezzük, a statisztikai elemzéseket és a görbék illesztését a GraphPad Prism 8.3.0 szoftverrel végeztük.

## 4. Eredmények

### 4.1. Tesztrendszer beállítása kontroll iPSC vonalon

Vizsgálati panelünket egy egészséges férfi fibroblasztjából visszaprogramozott iPSC, majd az ebből differenciáltatott NPC és idegsejt rendszeren állítottuk be. Megállapítottuk, hogy a hippocampális NPC kultúrák a mechanikus rozetták mechanikai felszedését és enzimátikus emésztését követő 5. passzázstól homogénekké váltak. Differenciálási kísérletekre felhasználhatóságukat a 15-20. passzázsban határoztuk meg. Az NPC-ket irányított differenciálattal, BDNF, cAMP, Wnt3A és aszkorbinsav hozzáadásával hippocampális GD sejtekké differenciáltattuk. A stabil, még osztódó hPSC-eredetű hippocampális NPC kultúrákat és a differenciált hippocampális GD neuronokat immunfluoreszcencia festéssel és specifikus markerek mRNS expressziós szintjével profiloztuk.

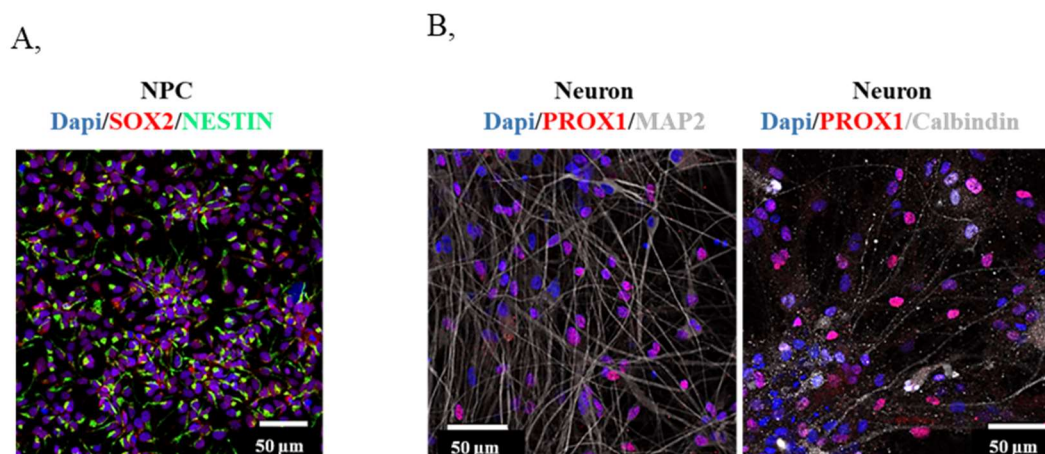
Amint az az **5. ábrán** látható, az OCT 3/4 és NANOG pluripotencia marker mRNS expressziós szintje az iPSC és az NPC közötti differenciáltság és az NPC-k további GD idegsejtté történő differenciálása során is nagyságrendekkel lecsökkent. Míg a SOX2 nem változott jelentősen (ami érthető is, hiszen mind a pluripotens, mind a progenitor állapotú sejtekre jellemző az expressziója), addig a NESTIN idegi progenitor marker enyhén emelkedett az NPC-kben és csökkent az idegsejtekben. A gyrus dentatus differenciációját jelző specifikus markerek, mint PAX6, a NEUROD1 és a PROX1, valamint az előagyra specifikus FOXG1 mRNS szintje fokozott kifejeződést mutattak differenciált neuronokban.



**5 ábra: Az iPSC-k, az NPC-k és a 4 hetes hippocampális neuronok génexpressziós vizsgálata.**

*A legfontosabb marker gének relatív (RPLP0 háztartási génhez viszonyított) expressziós szintjének változása a differenciáció adott stádiumának megfelelően alakultak (Vöfely és mtsai 2018).*

Az NPC-ből származó GD neuronok intenzív festődést mutattak MAP2-re, kirajzolva ezzel az idegsejtek morfológiáját (6. A ábra). Bizonyítottuk, hogy az *in vivo* gyurus dentatus szemcsesejtekre jellemző PROX1 és CALB1 fehérjeexpresszióval is rendelkeztek ezek a sejtek (6. B ábra).

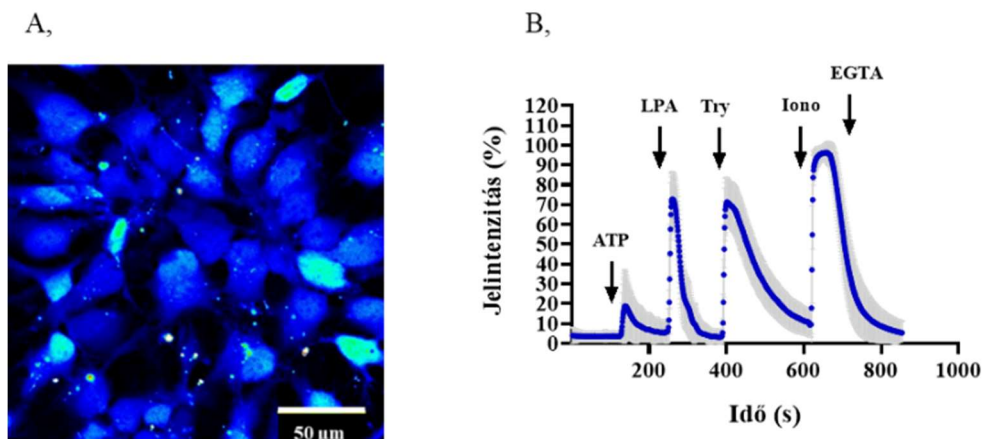


**6. ábra: Az NPC-k és a differenciált hippocampális neuronok vizsgálata immunocitokémiai módszerekkel.** *Az NPC-eket konfokális mikroszkópos vizsgálat során olyan antitestekkel festettük, amelyek felismerték az egyes sejt típusok specifikus fehérjéit: (A) NESTIN (zöld) és a SOX2 (piros) az NPC-k, (B) MAP2 (szürke), CALB1=Calbindin (szürke) és PROX1 (piros) az idegsejtek esetében. A magokat DAPI-val (kék) jelöltük. Skála = 50 μm (Vöfely és mtsai 2018).*

Az NPC kultúrákban megvizsgáltuk a spontán és a ligandum által kiváltott kalcium jelátvitelt. Annak kizárására, hogy a sejtenyésztés hatással lehet a

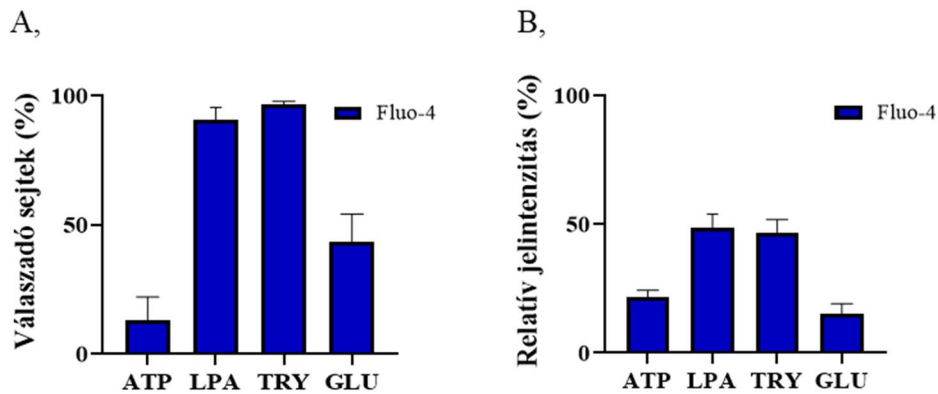
kalciumjelekre, az NPC kultúrákat különböző passzázsszámmal is megmértük. A lehető legtöbb befolyásoló tényezőt, függő kísérleti körülményt szeretnénk volna kizárni a rendszerből, amelyek közül a passzázsszám változása elkerülhetetlen. NPC-k esetén közel konfluens sejtekkel dolgoztunk (80-90%). Célzottan azt vizsgáltuk, hogy morfológiailag homogén, konfluens NPC kultúrák passzázsszámbeli különbsége megmutatkozik-e a kalcium-képződési eljárással detektált eredményekben, hogy meghatározzunk egy tartományt, amelyben a detektált kalciumjelek függetlenek a passzázsszámtól. A kalcium-képződési vizsgálatokat mindig a konfluencia elérése után végeztünk. A további tenyésztési körülmények standardizált módon történtek. A konfluencia kérdése és standardizálása azért is fontos ebben a rendszerben, mert az NPC-k alacsony denzitásra differenciálódással válaszolhatnak.

Az NPC-k ugyan szignifikáns spontán aktivitást nem mutattak, azonban az ATP, LPA vagy tripszin ligandumok kalciumválaszt indukáltak (7. ábra).



**7. ábra: A Fluo-4-gyel töltött NPC-k ligand-indukált mérése.** (A) Fluo4-gyel töltött NPC-k reprezentatív konfokális mikroszkópos képe. (B), A kalciumjeleket a következő ligandok hatására mértük: ATP (100 μM), LPA (10 μM), tripszin (2,5 μg/ml, Try rövidítés). A kalcium-függő sejtes fluoreszcencia maximális és minimális szintjét ionomycin (Iono) és EGTA hozzáadásával határoztuk meg. A fluoreszcencia adatokat a sejt kalciumszintjének kalibrált tartományára ( $F_{max} - F_{min}$ ) normalizáltuk. A kék vastagított vonal az átlag-értékeket, a szürke tartomány a szórást ábrázolja (Vöfley és mtsai 2018).

A kalciumválasz kalibrálása a következőképpen történt: a maximális fluoreszcens jelet 5 μM ionomycin, míg a háttér, kalcium-független fluoreszcenciáját a tápközeghez feleslegben adott EGTA hozzáadásával határoztuk meg.

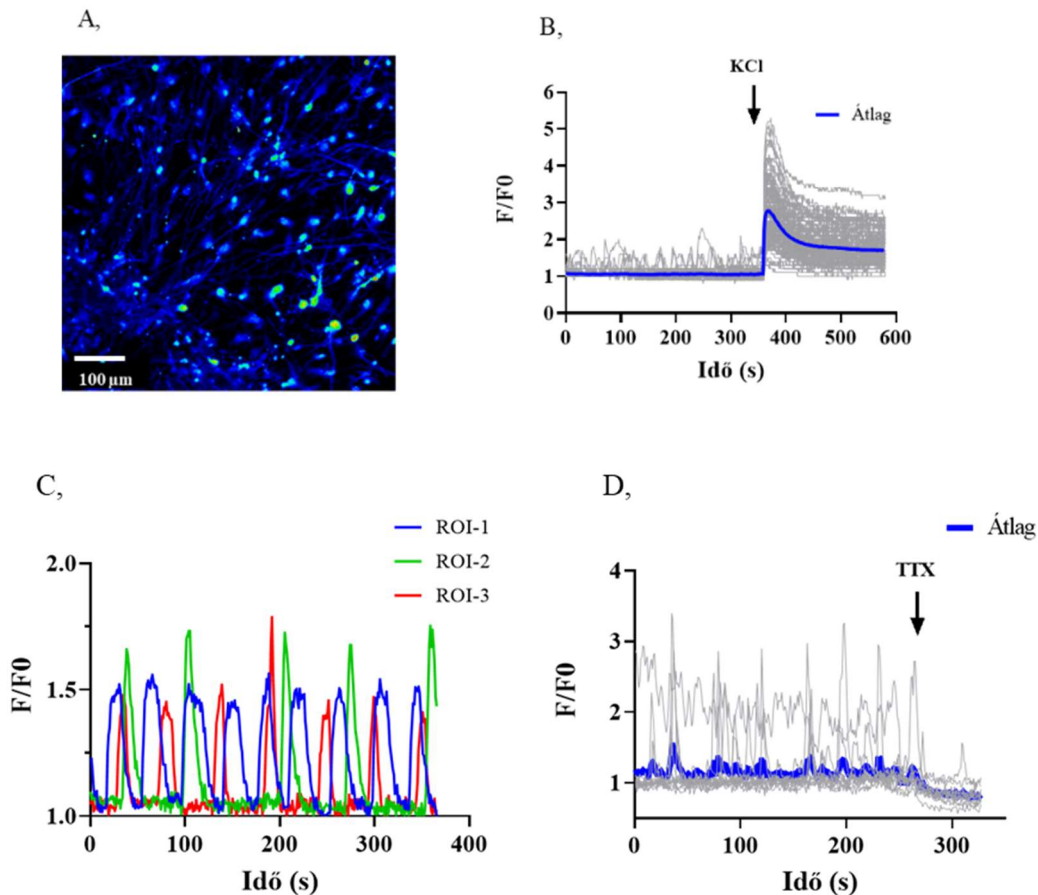


**8. ábra: Fluo-4-gyel töltött NPC-k ligandum indukált mérése.** Különböző szignál-indukáló szerek hatása a Fluo-4-gyel töltött NPC-k válaszadó sejteinek számában (A) és a kalcium jelintenzitásában (B). A válaszadó sejtek számát az alap kalciumszinthez viszonyítva több mint 10%-os emelkedést mutató sejtekben határoztuk meg. A relatív fluoreszcencia intenzitásokat a jelzett kezelések utáni maximális értékek meghatározásával számítottuk ki, normalizálva a sejt kalciumszintjének kalibrált tartományára ( $F_{max}-F_{min}$ ). Az értékek három független kísérlet (ATP, LPA, TRY: Fluo-4:  $n_1 = 265$ ,  $n_2 = 200$ ,  $n_3 = 181$ ; GLU: Fluo-4:  $n_1 = 217$ ,  $n_2 = 139$ ,  $n_3 = 207$  (Vőfély és mtsai 2018)).

A megfigyelt kalciumjelek a purinerg receptorok ATP által történő aktiválódását, a GPC receptor LPA általi aktiválását és a proteáz-érzékeny receptorok tripszin általi aktiválását tükrözik (7. B ábra).

A glutamátra, mint specifikus neurotranszmitter molekulára reagáló NPC-k száma nagyon változó volt, 20-80% válaszadó sejt és alacsony jelintenzitású válaszok voltak megfigyelhetők (8. ábra). Nem tapasztaltunk különbséget a kalciumjelek tekintetében a kultúrák passzázsszámától függően. Annak ellenőrzésére, hogy a glutamát által kiváltott kalciumválaszok variabilitása függ-e a receptorok expressziójától a különböző passzázsszámoknál, mértük az ionotrop receptor AMPA típusú 1 alegység (GRIA1) mRNS szintjét. A GRIA1 mRNS szintje az NPC-kben nem mutatott szignifikáns különbséget a passzázsszámok függvényében. Azt tapasztaltuk, hogy az intracelluláris kalciumszint lassan emelkedett a glutamát hozzáadása után, és percekig új egyensúlyi szinten maradt (Vőfély és mtsai 2018). A Fluo-4-gyel töltött NPC-k közül csak néhány sejt mutatott kalciumjelet 50 mM KCl hozzáadása után. Ezek a megállapítások azt mutatják, hogy a differenciálatlan gyrus dentatus NPC-k nem reagálnak a membránpotenciál változásaira (KCl), azonban a passzázsszámok növekedése az NPC-k részleges differenciálódását idézheti elő, ami miatt az NPC kultúra néhány differenciálódott sejtje reagálhat a KCl-ra (Vőfély és mtsai 2018).

Az NPC-kből differenciáltott humán GD szemcsesejtek az NPC-kel szemben mutattak spontán aktivitást. A PROX1-expresszázó GD neuronok kalciumszignál aktivitását 4-5. hetes kultúrákban vizsgáltuk, amit a 9. ábra mutat be. Ezeknek a Fluo 4-gyel töltött neuronoknak kulcsfontosságú jellemzője a spontán aktivitás.



**9. ábra: Fluo-4-gyel töltött 4 hetes neuronok spontán és inhibitorral kezelt kalciumjele.**

(A) A Fluo-4-gyel töltött idegsejtek reprezentatív konfokális mikroszkópos képe. (B) Az 50 mM KCl hozzáadása utáni kalciumjeleket az egyedi sejteken a szürke görbék jelzik, a kék vastagított görbe az átlagértékeket ( $n = 110$ ) mutatja.  $F$ =fluoreszcencia intenzitás (Vöfely és mtsai 2018).

(C) A képen a 3 különböző szín 3 külön sejt egyedi normalizált kalciumjeleit mutatja.  $F$ =fluoreszcencia intenzitás (Vöfely és mtsai 2018).

(D) A tetrodotoxin (TTX, 100 μM) feszültségfüggő nátriumcsatorna blokkoló gátolja a spontán aktivitást. Az ábrán 13 egyedi sejt spontán kalciumjelei láthatók, a kék vastagított görbe az átlagértékeket mutatják,  $F$ =fluoreszcencia intenzitás (Vöfely és mtsai 2018).

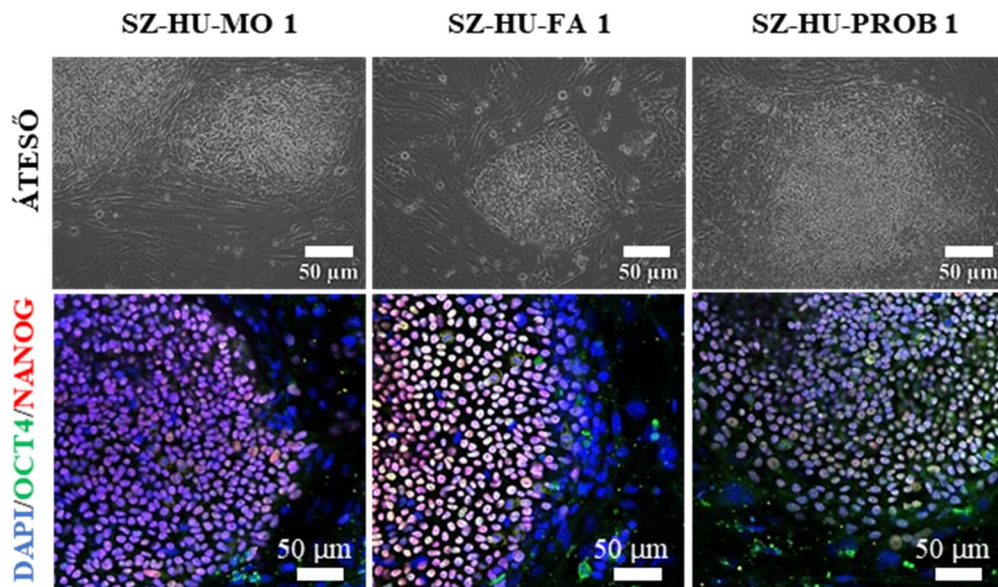
Ezt jól tükrözik az egyes idegsejtekben megfigyelt gyors, részben kapcsolt, spontán kalciumjel változások. Méréseink alapján megállapítottuk, hogy a differenciáltott GD neuronok gyakorlatilag 100%-ban nagy kalciumjellel reagálnak a

membránpotenciál változásaira, amelyet a KCl tápközeghez való hozzáadása vált ki (9. B ábra).

A 100  $\mu\text{M}$  tetrodotoxin (TTX), egy feszültség-függő nátriumcsatorna blokkoló hozzáadása megszüntette a spontán kalciumaktivitást az érett idegsejtekben (9. D ábra). A TTX iránti érzékenység azt mutatja, hogy ezekben az idegsejtekben a spontán aktivitás függ az akciós potenciáltól. A spontán kalciumjelek és a neuromodulátorokra adott válaszok a különböző iPSC-kből létrehozott specifikus neuron modellrendszerek fontos jellemzői.

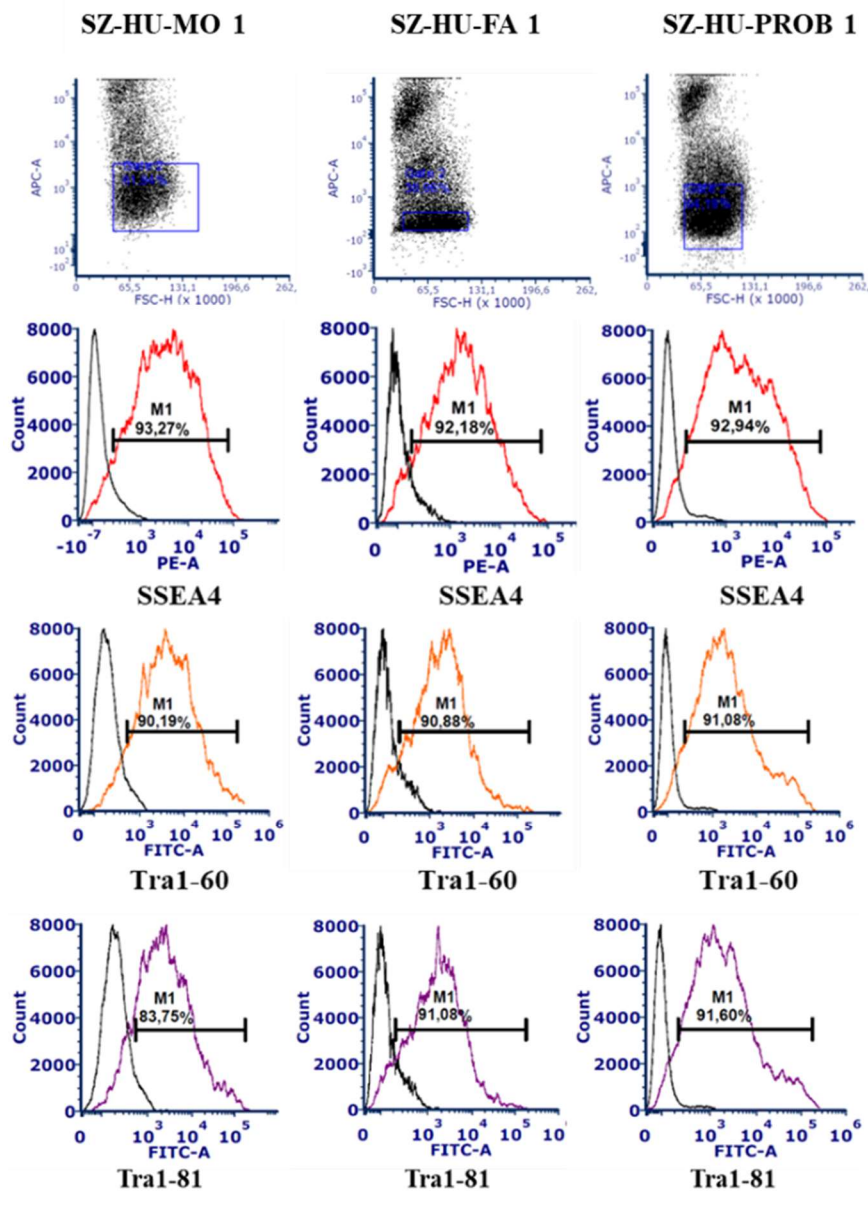
#### 4.2. A beteg-szülő trió őssejtjeinek molekuláris jellemzése

Munkánk első szakaszában a PBMC-eket visszaprogramoztuk iPSC vonalakká. Mindegyik iPSC vonal tipikus morfológiai tulajdonságokat mutatott, amely az expresszált pluripotencia markerekben is megmutatkozott. Immunfluoreszcens festésnél két, magi kifejeződésű transzkripciós faktort, OCT4 és NANOG bizonyítottuk iPSC vonalaink pluripotens jellegét (10. ábra).



**10. ábra:** A család tagjaiból létrehozott iPSC immuncitokémiai pluripotencia markerekkel történő jellemzése. A felső 3 képen a trió tagjaiból létrehozott iPSC-k áteső fénymikroszkópos képe látható MEF-en történő fenntartási körülmények között. Az alsó 3 képen Lab-Tek kamrára fixált és festett iPSC kultúrákban jelöltük az OCT4 (zöld) és NANOG (piros) magban lokalizálódó pluripotens állapotot jellemző transzkripciós faktorokat, míg a magokat DAPI-val jelöltük. (Hathy és mtsai 2021).

Áramlási citometriás vizsgálattal másik 3 sejtfelszíni pluripotencia markerrel, az SSEA4 (stage-specific embryonic antigen-4) és TRA-1-60, TRA-1-81 podocalyxin glikoproteinek jelölésével is megerősítettük a visszaprogramozással létrejött vonalak differenciálatlan állapotát (11. ábra). Az SSEA-4, TRA-1-60 és TRA-1-81 olyan sejtfelszíni antigének, amelyet expresszálnak az embrionális őssejtek és indukált pluripotens őssejtek is. Ezeket a felületi markereket a sejtek elveszítik differenciálódási folyamatuk során.



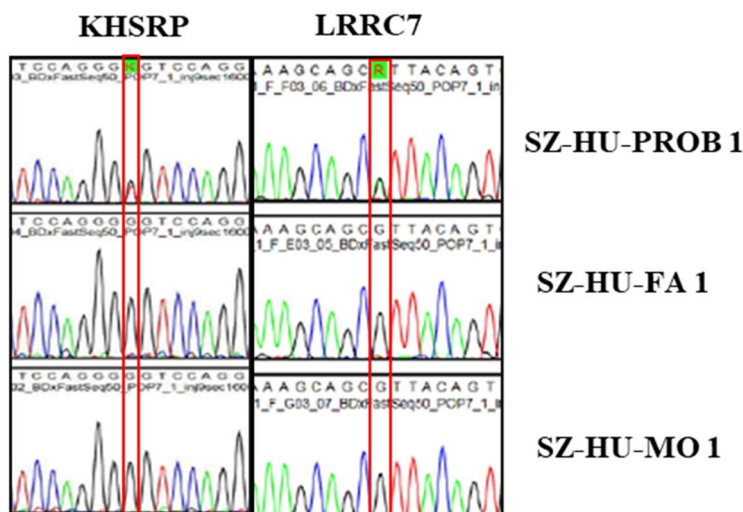
11. ábra: Az áramlási citometriával mért pluripotencia markerek. A SSEA4-PE (1:25 hígítás), TRA-1-60 (1: 200 hígítás) és TRA-1-81 (1: 200 hígítás) vizsgálatokat használtunk a pluripotencia

vizsgálatára. A halott sejteket kikapuztuk, amelyet az iPSC vonalakhoz tartozó legfelső három pontábra mutat. Az ábrán a fekete hisztogramok jelölik minden esetben az izotípus kontrollokat. A piros hisztogram az SSEA4-et, a narancs a TRA-1-60-at és a lila a TRA-1-81-et jelöli. Mindhárom pluripotencia markerre 90% fölött értéket kaptunk (Hathy és mtsai 2021).

Sem a kromoszómák számában, méretében vagy szerkezetében nem volt kimutatható eltérés (12. ábra). A páciensben talált DNМ-ket Sanger szekvenálás segítségével az iPSC-kben is igazoltuk heterozigóta formában (13. ábra).



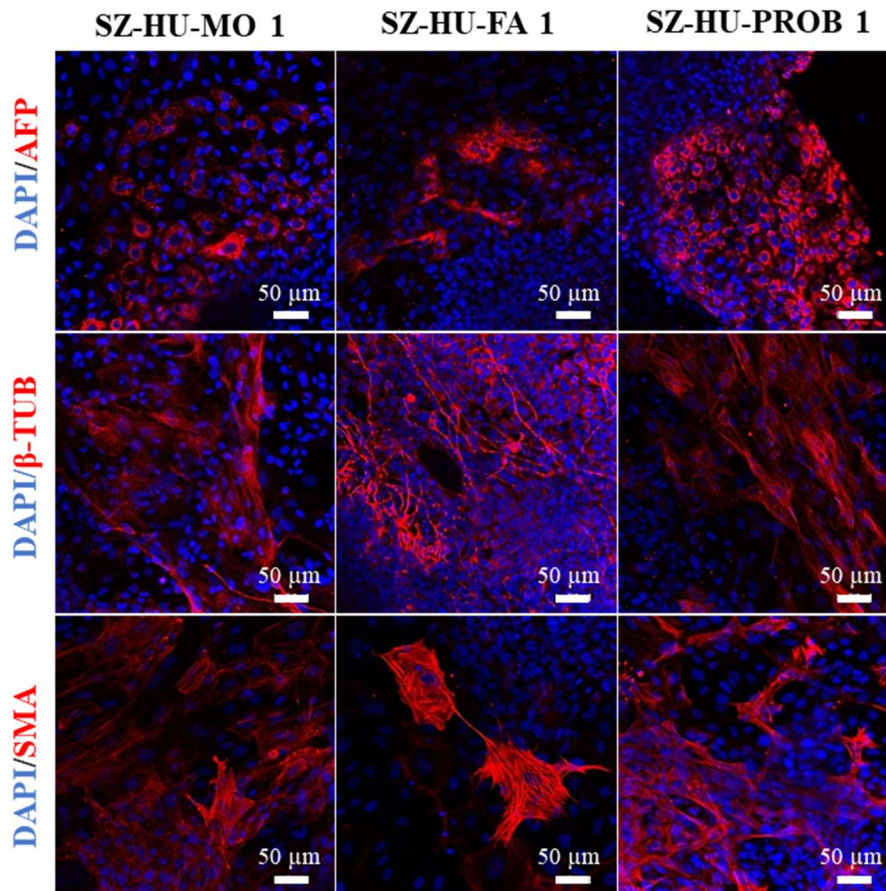
**12. ábra:** A trió tagjainak kariogramjai. Az iPSC klónok kromoszóma-rendellenességeit G-sávós elemzéssel szűrtük ki. Az iPSC-k nem szenvedtek kromoszómakárosodást a visszaprogramozásuk és tenyésztésük alatt (Hathy és mtsai 2021).



**13. ábra:** A család tagjaiból létrehozott iPSC-k szekvenálási eredményei. A trió tagjainak iPSC vonalainál Sanger szekvenálási technikával visszaellenőrizhető volt, hogy megtartották-e a klónok a betegben azonosított mutációknál az eredeti nukleotid sorrendjüket, azaz csak a beteg volt heterozigóta hordozó a misszensz variánsokra (Hathy és mtsai 2021).

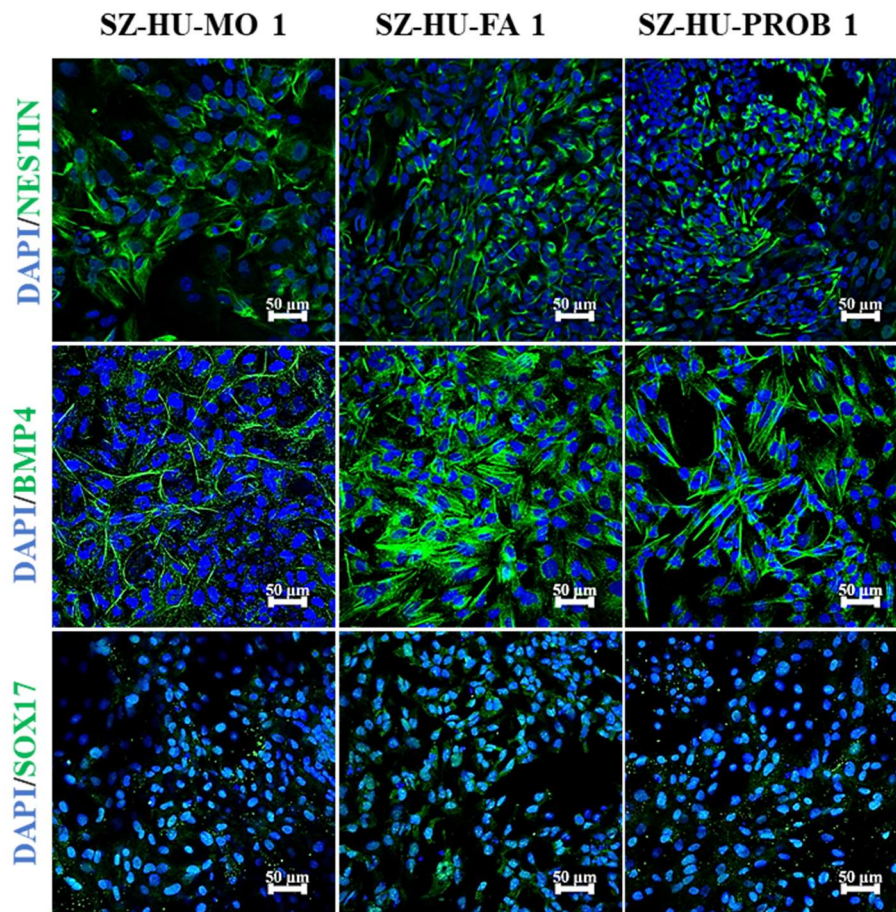
Az iPSC-k mind a 3 csírvonal irányába képesek voltak differenciálódni (endoderma: AFP és SOX17, mezoderma: SMA és BMP4, ektoderma:  $\beta$ -TUBULIN és NESTIN),

amint azt spontán differenciálódási kísérletek is bemutatják. Mivel nem jellemeztük génexpressziós szinten a rendszert, ezért szükségesnek tartottuk, hogy több ortogonális immunfluoreszcens markerrel is megerősítsük eredményeinket (14. A és B ábra).



**14. A ábra: A beteg-szülő trió iPSC vonalainak spontán differenciációja.** A létrehozott iPSC vonalak pluripotens potenciálját spontán differenciációs kísérlettel igazoltuk. A 6+6 napos embriótestcskéket konfokális kamrára kiültetve festettük. Endoderma irányú markerként AFP (piros), ectoderma markerként  $\beta$ -III-TUBULIN (piros) és mezoderma markerként SMA (piros) festést alkalmaztunk. A magokat DAPI (kék) jelöltük (Hathy és mtsai 2021).





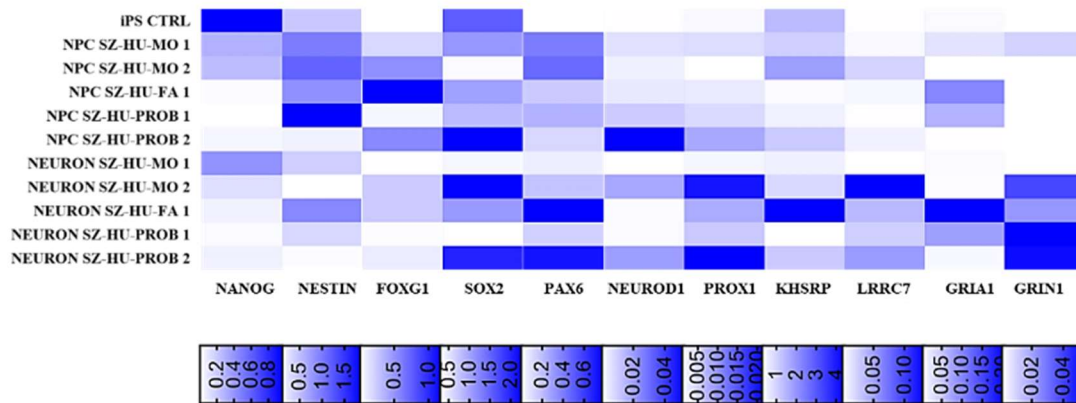
**14. B. ábra:** *A beteg-szülő trió iPSC vonalainak spontán differenciációja. A család tagjaiból alapított iPSC vonalakkól kitapasztolt embriótestecskék differenciációs potenciálját bizonyítandóan festettük mezoderma markerként BMP4 (zöld), ektoderma markerként NESTIN (zöld) és endoderma markerként SOX17 (zöld) ellenanyagokkal. A magokat DAPI (kék) tettük láthatóvá (Hathy és mtsai 2021).*

Az elvégzett genetikai újraprogramozás kísérletsorozat és az azt követő minőség-ellenőrzési lépések alapján a beteg és anyja esetében 2 független klónt (iPSC SZ-HU-PROB 1 és 2, iPSC SZ-HU-MO 1 és 2) míg az apából 1 klónt (iPSC SZ-HU-FA) vittünk tovább a neurális differenciáltatási kísérletek fázisába.

#### 4.3. Az iPSC vonalak neurális irányú differenciáltatása és vizsgálata

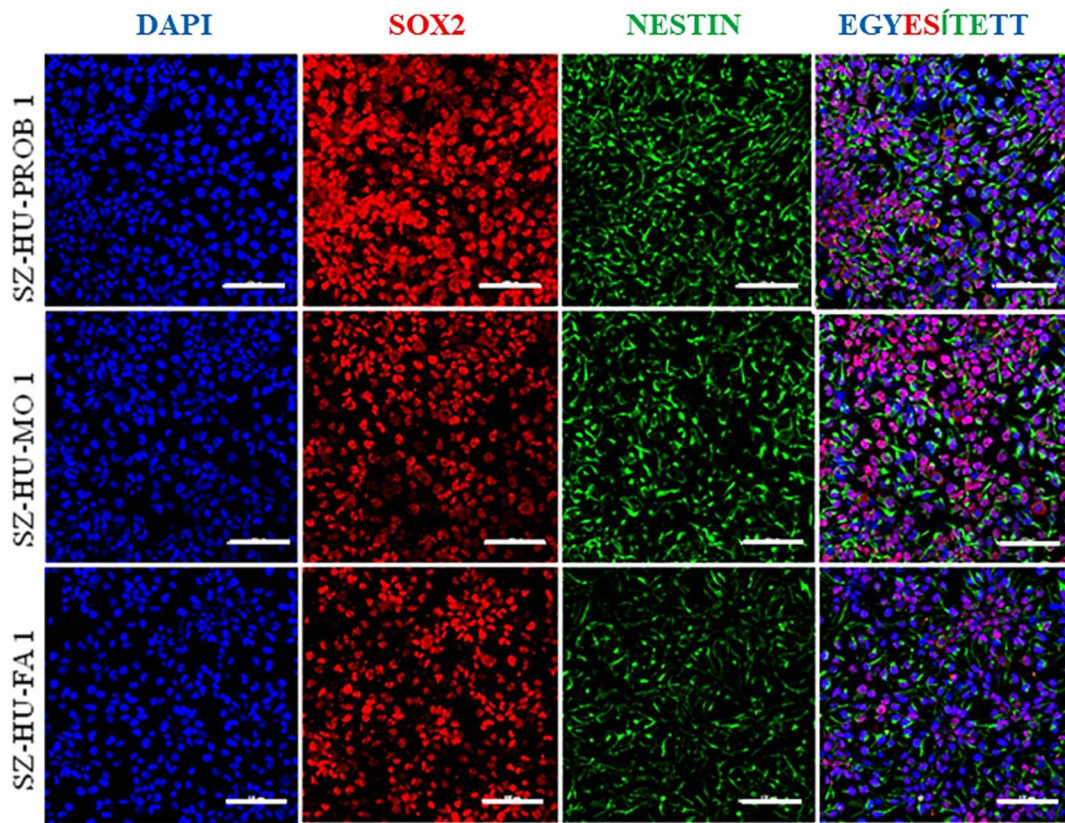
A visszaprogramozott iPSC vonalakat a korábban bemutatott irányított differenciáltatási protokollal hippokampális progenitorokká, majd PROX1 pozitív gyrus dentatus idegsejteké differenciáltattuk tovább. A beteg-szülő trióból létrehozott NPC vonalak egységes NPC-kre jellemző molekuláris és morfológiai tulajdonságokkal rendelkeztek, amelyet az immunfluoreszcens mikroszkópia (15. B ábra) és

génexpressziós elemzés (15. A ábra) is bizonyít. Nem volt megfigyelhető különbség az NPC vonalak idegsejtté történő differenciálódási potenciáljában sem (15. A, B, C ábra).

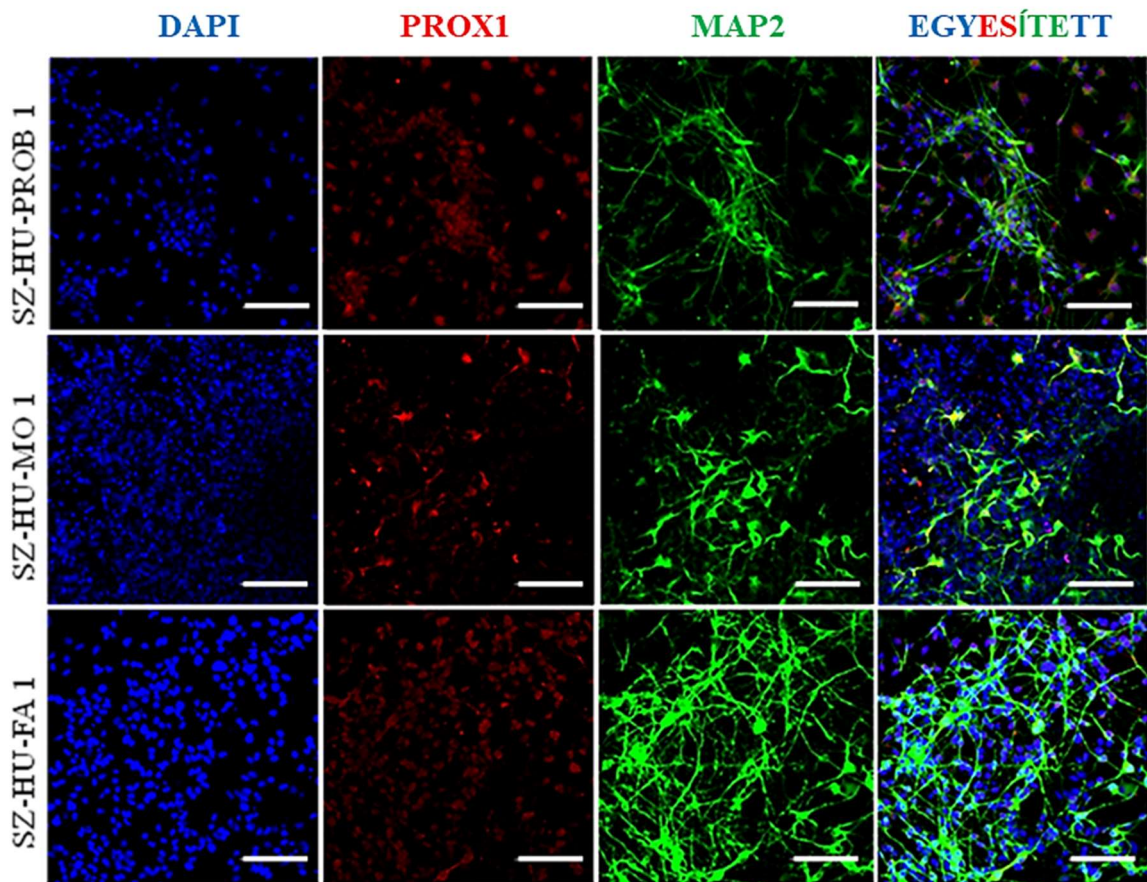


**15. A. ábra: Génexpressziós mintázat a beteg-szülő trióból származó NPC-kben és neuronokban.** A heatmap a pluripotens NANOG kifejezésétől az NPC-kre (NESTIN, SOX2, FOXG1, PAX6), majd a neuronokra (NEUROD1, PROX1, GRIA1, GRIN1) jellemző gének expresszióján keresztül mutatja be a génkifejeződést a különböző állapotokban. A panelbe a mutációkat hordozó célgéneket is (KHSRP és LRRC7) felvettük. A heatmap alatti skála az endogén kontroll RPLP0 (riboszómális protein) szintjéhez viszonyított mRNS expressziót ábrázolja, a számértékeket a kék árnyalataival megfelelően (Hathy és mtsai 2020).

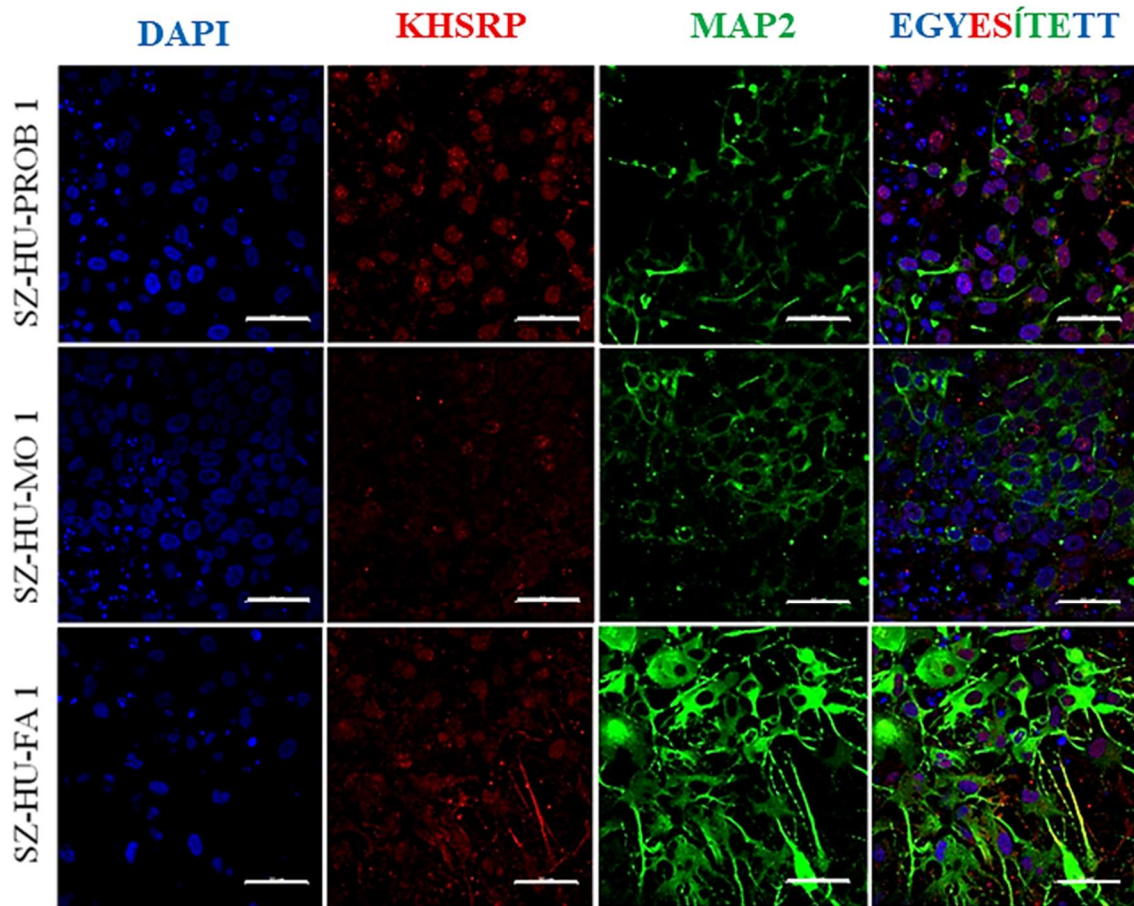
A létrehozott idegsejtek morfológiai tulajdonságait immunfluoreszcens festéssel (15. C ábra) vizsgáltuk, illetve molekuláris vizsgálatainkba felvettük a DNM-ket hordozó célgéneket is (KHSRP és LRRC7), hogy teszteljük az RNS vagy a fehérje expresszió szintjének lehetséges eltéréseit, de nem találtunk szignifikáns különbségeket (15. A, D, E ábra).



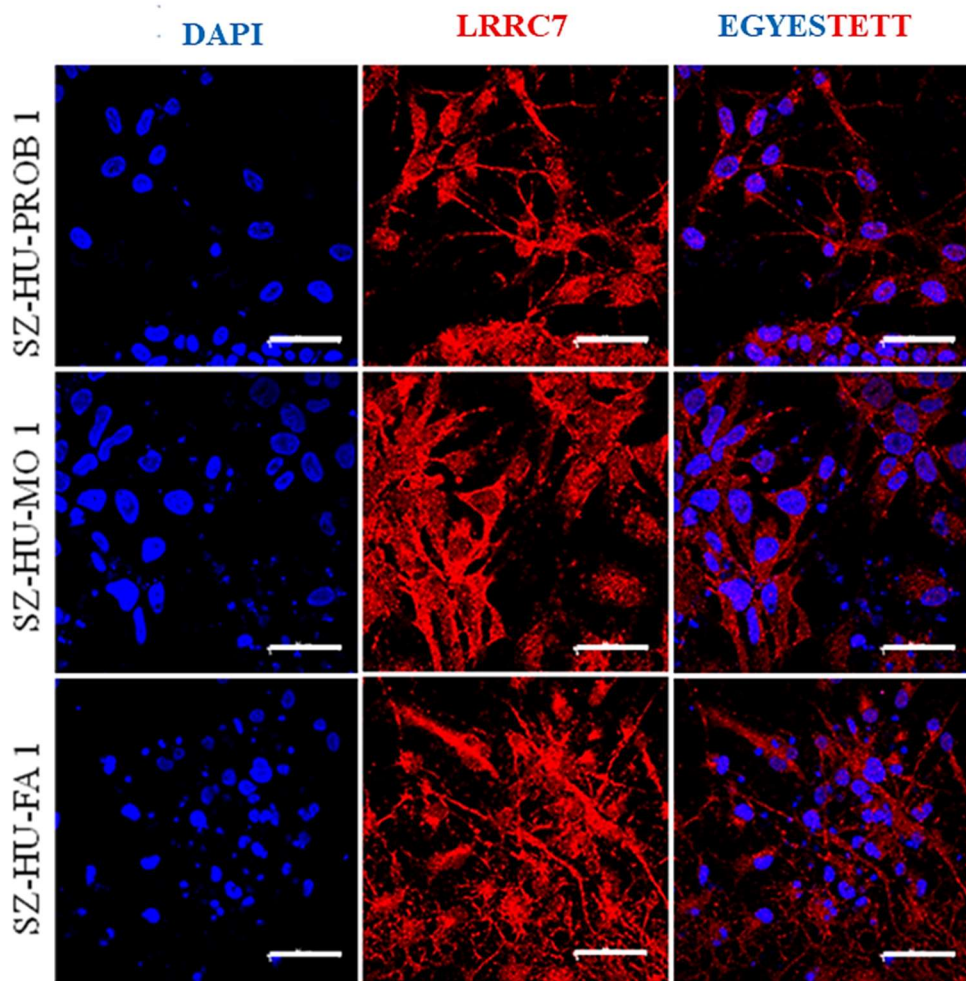
**15. B. ábra:** A beteg-szülő trióból származó NPC vonalak immuncitokémiai vizsgálata. Az NPC-k NESTIN (zöld) és SOX2 (piros) pozitivitást mutatnak. A képek skálája = 100  $\mu$ m (Hathy és mtsai 2020).



15. C. ábra: A beteg-szülő trióból származó hippocampális neuronok immuncitokémiai vizsgálata. Az érett idegsejtek MAP2 (zöld) és PROX1 (piros) immunfluoreszcens festésre pozitívak. A képek skálája = 100  $\mu$ m (Hathy és mtsai 2020).



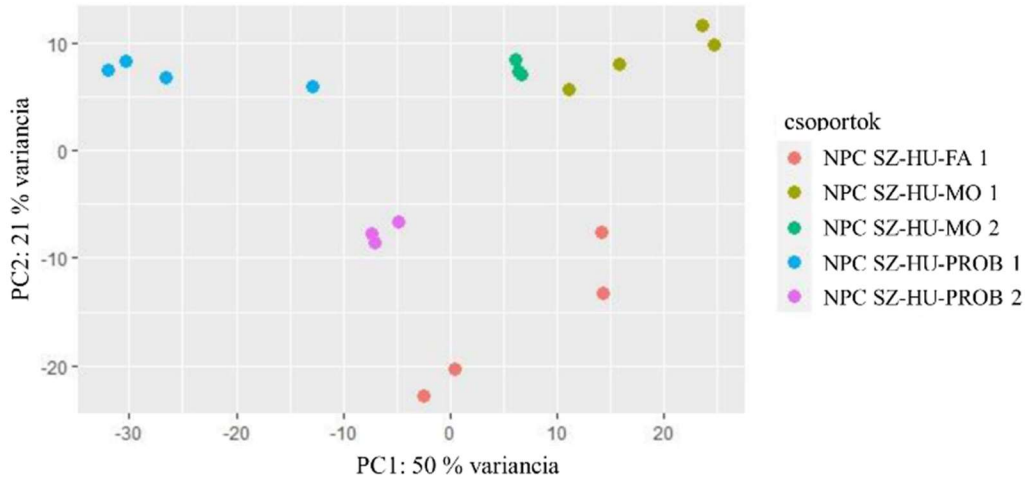
**15. D. ábra:** Az érett idegsejt kultúrák molekuláris jellemzése: a KHSRP célgén vizsgálata. Az immunfluoreszcens képek a KH-Type Splicing Regulatory Protein (KHSRP, piros szín) kifejeződését ábrázolják a neuronokban. A KHSRP nukleáris és citoplazmatikus lokalizációjú. Microtubule-associated protein 2 (MAP2, zöld) egy neuronokra jellemző, neurogenesisben esszenciális strukturfehérje. Skála = 50  $\mu$ m (Hathy és mtsai 2020).



*15. E. ábra: Az érett idegsejt kultúrák molekuláris jellemzése: az LRRC7 célgén vizsgálata. A Leucine rich repeat containing 7 (LRRC7, alias Densin-180) fehérje (piros szín) poszt-szinaptikus lokalizálóját mutatják az idegsejtekben az immunfluoreszcens képek. Skála = 50 μm (Hathy és mtsai 2020).*

#### 4.4. RNS-szekvenálási mérések

Neurális progenitor állapotban RNS-szekvenálási elemzéseket végeztünk potenciális transzkripciós különbségeket keresve, amelyek okozati összefüggésbe hozhatók a szkizofrén betegben megjelent mutációkkal. Az RNS-szekvenálási kísérletek bioinformatikai elemzései azt mutatták, hogy a sejtvonalak főkomponens és klaszter analízis alapján egyértelműen elválnak (16. ábra).

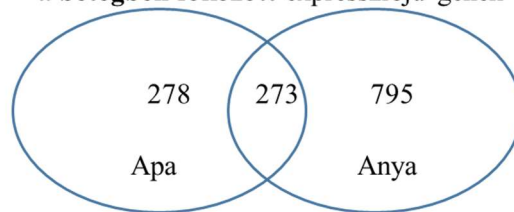


**16. ábra: A trió NPC vonalainak transzkriptomikai különbségei az RNS-szekvenálási mérések alapján.** A neurális progenitor állapotban végzett RNS-szekvenálási vizsgálatok főkomponens analízise a trió tagjaitól származó minták egyértelmű elkülönülését mutatja (1. klón esetén  $N = 4$ . és 2. klón esetén  $N = 3$ ).

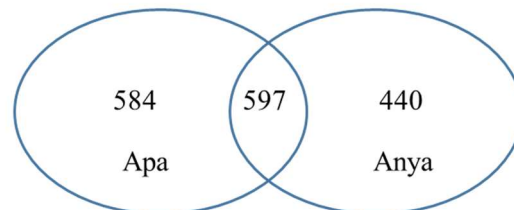
Az eltérően expresszáldott gének csoportjait (differentially expressed, DE) aszerint határoztuk meg, hogy mind az apai (SZ-HU-FA), mind az anyai (SZ-HU-MO) NPC vonalokhoz képest a SZ-HU-PROB NPC vonalban eltérően fejeződtek ki (17. ábra).

#### Eltérő szinten expresszáldott gének száma

Az anyai és apai vonalhoz képest  
**a betegben fokozott** expressziójú gének



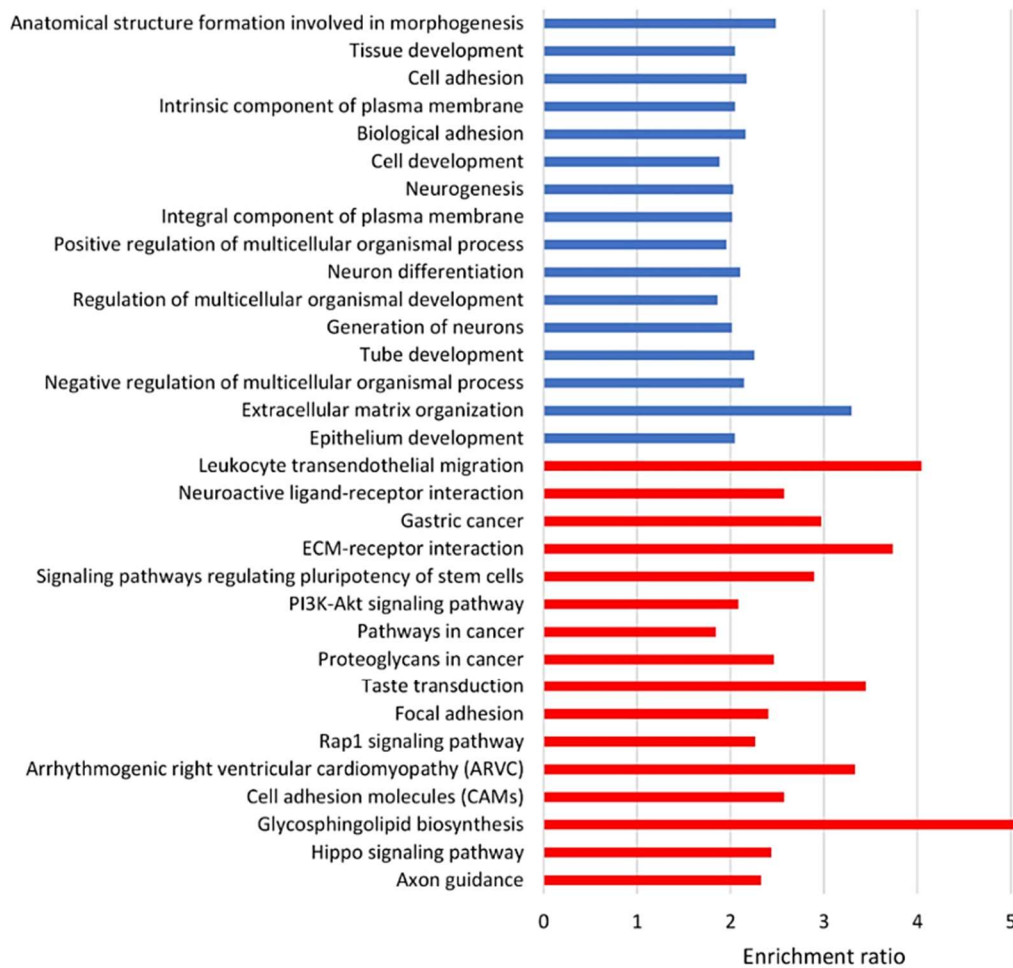
**a betegben csökkent** expressziójú gének



**17. ábra: Eltérően expresszáldott gének megoszlása a trió tagjaiban.** A de novo mutációkat hordozó betegben a szülői kontrollokhoz képest fokozott vagy csökkent expressziót mutató gének halmazai (Hathy és mtsai 2020).

Ezeket a géncsoportokat további GO és PATHWAY elemzéseknek vetettük alá (18. ábra), amelyek a DE-gének dúsulását, gyakoribb előfordulását mutatták a releváns biológiai utakban, ideértve a neuronok kialakulásáért felelős ligandum-receptor kölcsönhatások, az axon fejlődésért felelős útvonalak, a neurogenesis, az idegsejtek differenciálódásában fontos Wnt-jelátvitel, és  $Ca^{2+}$  jelátvitel csoportjait. A 100 vizsgált fokozott és csökkent expressziójú gén között számos transzkripció faktor és neuron-specifikus gén volt. Az oRNAMENT adatbázis segítségével elkészítettük a KHSRP által regulált gének listáját. Az RNS-szekvenálási kísérleteinkkel azonosított DE génkészletben hipergeometrikus teszt segítségével a feltételezhető KHSRP célgének gyakoribb előfordulását, dúsulását figyeltük meg (hipergeometrikus  $p = 0,03$ ). Az eltérő szinten expresszáldott KHSRP célgének közül több, pl. ERBB4, GRIN2A, és KHDRBS2 szerepet játszhat a SZ etiológiájában.

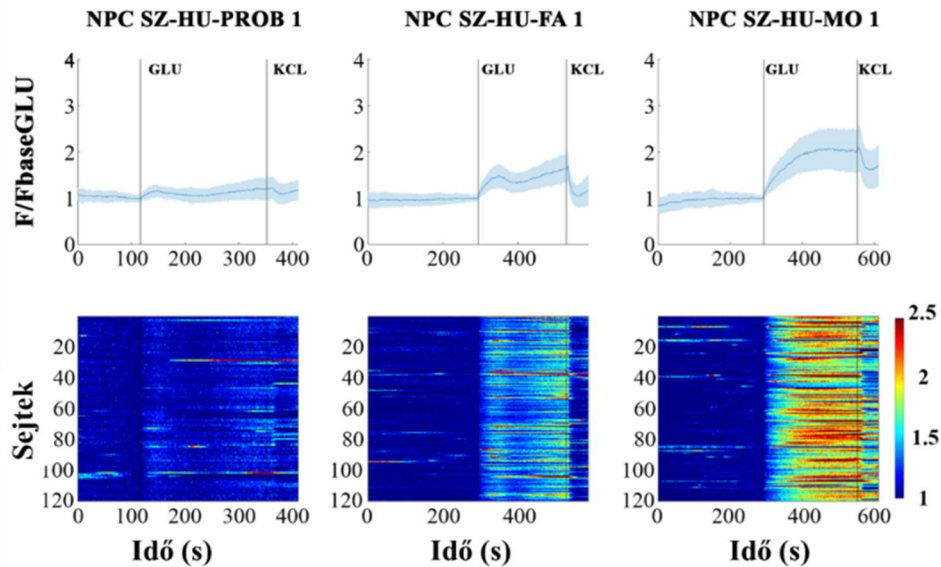




**18. ábra: DE gének PATHWAY (piros) és GO (kék) analízise.** A minták génexpressziós profilja közötti különbségek biológiai jelentőségének meghatározásának vizsgálatára elvégeztük az eltérően expresszáldott gének annotációs dúsulás analízisét. Az ábrán az látható, hogy mely tulajdonsággal rendelkező gének aránya szignifikánsan eltérő a génszettben a teljes humán referencia genomon megfigyelhető arányhoz képest (Hathy és mtsai 2020).

#### 4.5. Kalcium-képző kísérletek

Mivel a transzkripciós különbségek szinaptikus, főként glutamaterg különbségeket jeleztek, ezért  $\text{Ca}^{2+}$ -képző technikával vizsgáltuk tovább a családi trióból származó neurális progenitorok funkcionális aktivitását, mind spontán aktivitásukat, mind glutamát által kiváltott aktivitásukat rögzítve és elemelve.



**19. ábra:  $Ca^{2+}$  aktivitás vizsgálata NPC-kben.** A vizsgált alanyok NPC-kültúráján történt parallel mérések egy-egy reprezentatív példáját mutatja az ábra felső része (normalizált  $Ca^{2+}$  aktivitás:  $F/F_{baseGlu}$ ). A felső részen az Y tengely az átlagos aktivitást (sötétkék) (+/- szórás, világoskék) és az X tengely az időt jelöli. Az alsó részen az Y tengely az összes sejt aktivitását, az X tengely pedig az időt jelöli. A szín a  $Ca^{2+}$  citoplazmatikus szintjét jelzi (Hathy és mtsai 2020).

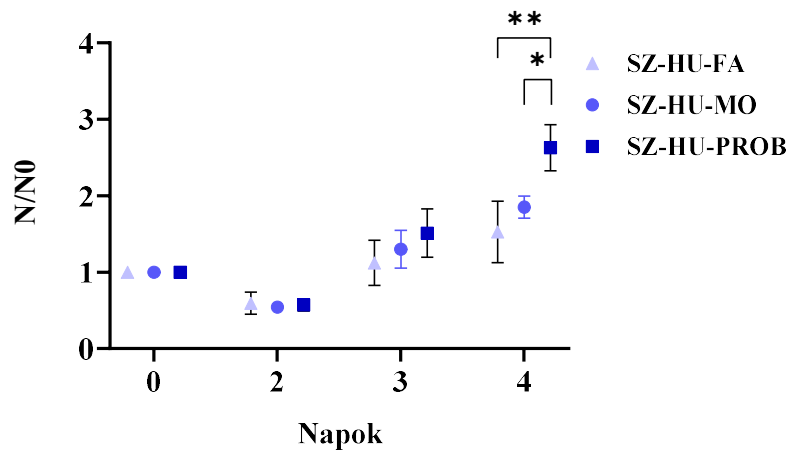
Korábbi eredményeinkhez hasonlóan az NPC-k alacsony szintű spontán aktivitást mutattak, de glutamáttal történő stimulációra jellegzetes lefutással reagáltak (Vöföly és mtsai 2018). Az ANCOVA modellt használva szignifikáns különbségeket láttunk a vizsgált alanyok között ( $F = 286,78$ ,  $p < 0,001$ ). Pontosabban, minden NPC kultúra szignifikánsan különbözött egymástól a kovariánshoz való igazítás után ( $F = 837,62$ ,  $p < 0,001$ ). A szkizofrén betegtől származtatott NPC-k a glutamátra szignifikánsan eltérő, gyengébb reakciót mutattak a többiekhez képest. Az anyai NPC-k adták a legnagyobb glutamát-választ ( $Ca$  NPC-SZ-HU PROB  $<$   $Ca$  NPC-SZ-HU-FA  $<$   $Ca$  NPC-SZ-HU-MO, 19. ábra).

#### 4.6. NPC-k proliferációs, sebzés és neuritnövekedési tesztsjelei

Az iPSC alapú SZ-modellezési kísérletek korábbi eredményei, valamint ezeket részben megerősítő transzkripciós eredményeink alapján az NPC vonalak proliferációs

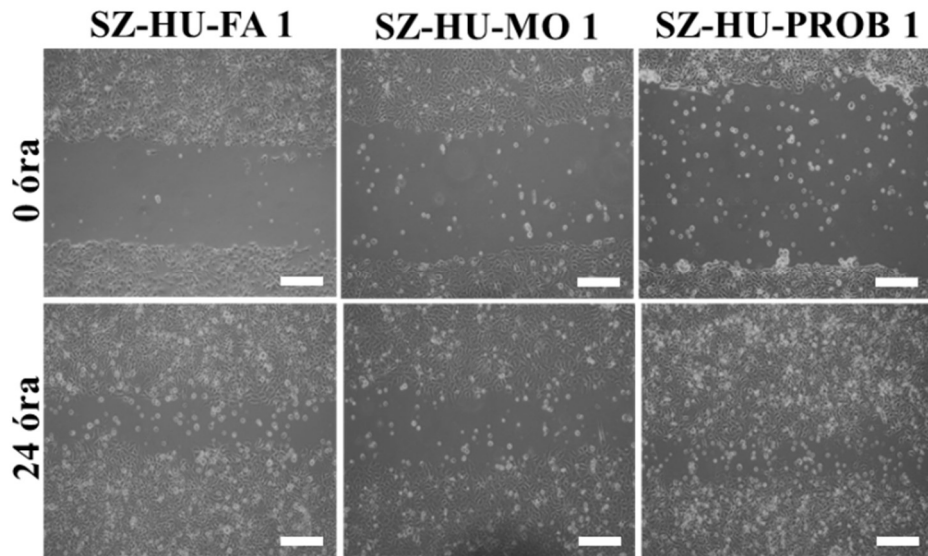
és migrációs potenciálját, és a differenciálódásnak induló NPC-k neuritnövekedési sebességét is teszteltük. Kimutatták ugyanis ezekben a progenitor populációkban, hogy a proliferáció, a migráció és a differenciálódás összesített kinetikája meghatározza a neuron irányú differenciálódás hatékonyságát. Megállapítottuk, hogy a szkizofrén betegből származó NPC-k a 4. napon, követve a Wnt-típusú gének fokozott kifejeződését (lásd 18. ábra), szignifikánsan megnövekedett sejtproliferációt mutatnak az anyai ( $p = 0,0139$ ) és az apai ( $p = 0,0039$ ) NPC-khez képest (20. A ábra). Fontos megjegyezni, hogy az ugyanazon személytől származó párhuzamos klónok összehasonlítása nem eredményezett szignifikáns különbségeket proliferációjuk mértékében.

### Sejtosztódási vizsgálat

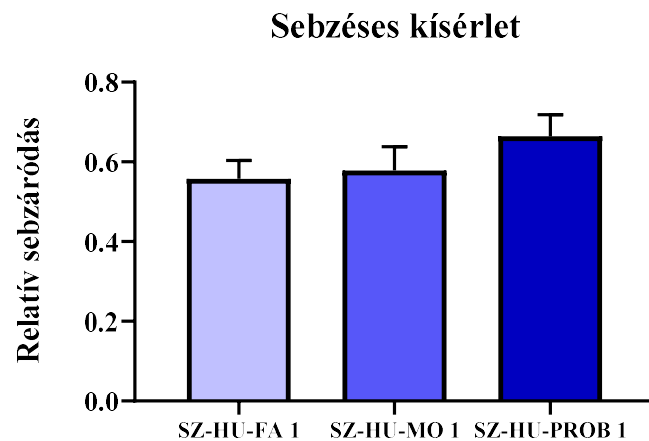


**20. A. ábra: A trió NPC vonalainak proliferációs tesztje.** A proliferációs vizsgálatához 35.000 NPC-t ültettünk poliornitin/lamininnel bevont felületre, amelyen 4 napig tenyésztettük a sejteket. ATTUNE NXT áramlási citométerrel naponta mértük a sejtszámot. A halott sejteket PI-festéssel jelöltük. A diagrammon az adott napon mért, kirakott sejtszámra normalizált sejtszám látható ( $N/N_0$ ). Az értékek az átlagolt  $\pm$  SE értékeket jelentik ( $N = 3$  független kísérlet,  $n = 3$  technikai ismétlés/kísérlet). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (Hathy és mtsai 2020).

Nem találtunk szignifikáns különbséget az NPC-migrációban, amelyet a sebzési teszttel mértünk ( $p = 0,5148$ ), amely egy funkcionális vizsgálatnak tekinthető, mivel mind a proliferációt, mind a migrációs kinetikát méri (20. B, C ábra).

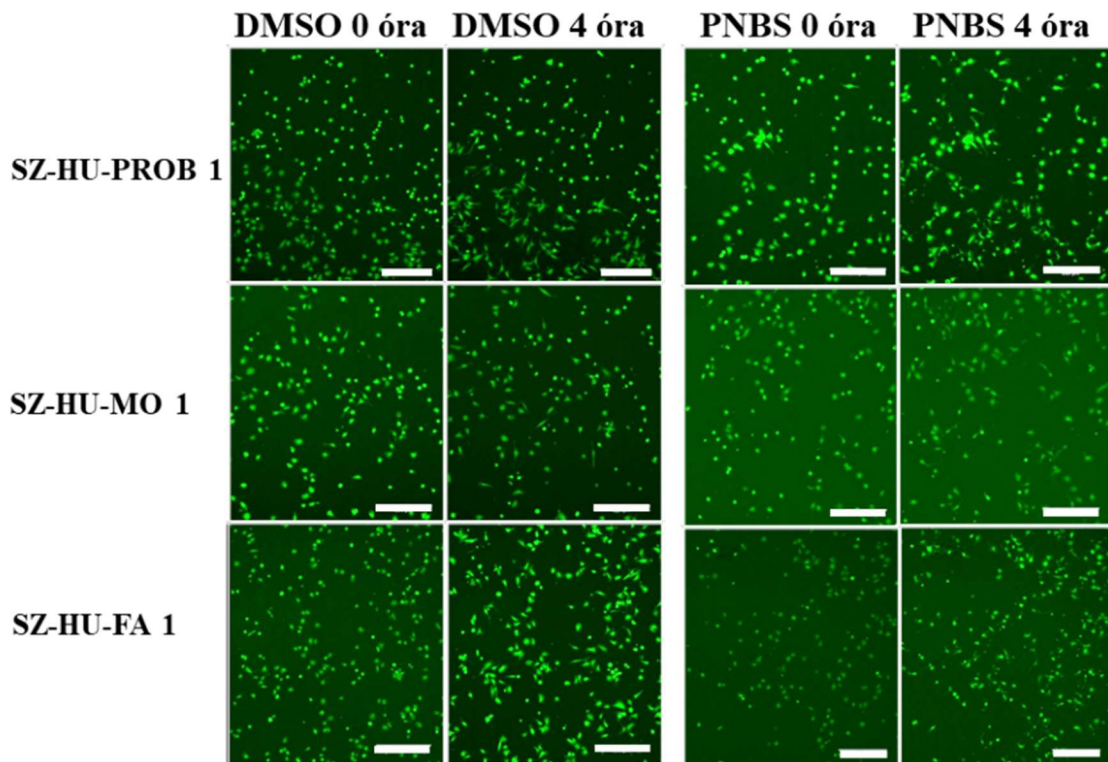


**20. B. ábra:** A trió NPC vonalainak sebzéses vizsgálatának reprezentatív képei. Tenyésztőlemezenként egy steril 5 ml-es pipettával három párhuzamos sebzést ejtettük. 24 óránál karcolásonként három fotót készítettünk. Az elemzést az ImageJ szoftver segítségével végeztük. A záródás sebességét a sebzések szélességének mérésével határoztuk meg. Skála = 100  $\mu$ m (Hathy és mtsai 2020).

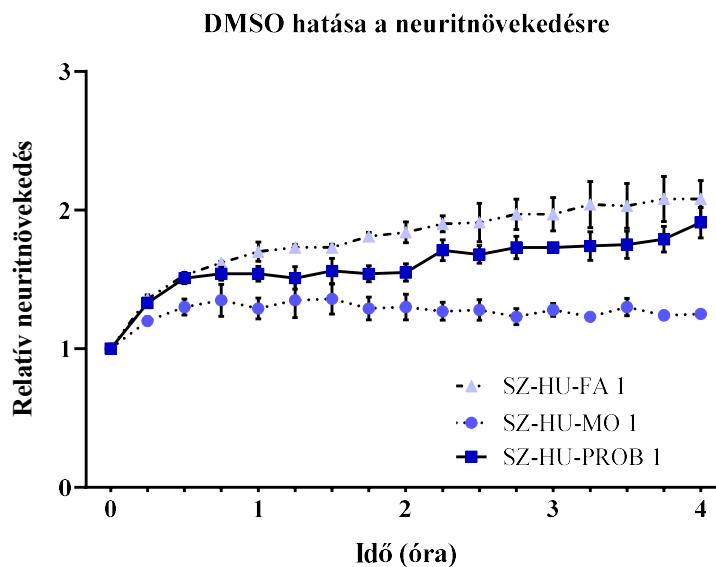


**20. C. ábra:** A trió NPC vonalainak sebzéses tesztje. A sebzés záródásának elemzése a 0. naphoz képest. A diagram az átlagértékeket mutatja  $\pm$  SE ( $N = 2$  független kísérlet,  $n = 9$  mérés/kísérlet) (Hathy és mtsai 2020).

Ezen kísérleteket folytatva, egy további lépésként megvizsgáltuk a neuritnövekedés mértékét differenciálódó NPC-kben, mind kiindulási körülmények között, DMSO hozzáadott, (20. D, E ábra), mind kémiai stimulus, a neuritnövekedést bizonyítottan elősegítő, a para-nitroblebbistatin (PNBS) kezelés hatására bekövetkező növekedés szempontjából (20. D, F ábra).

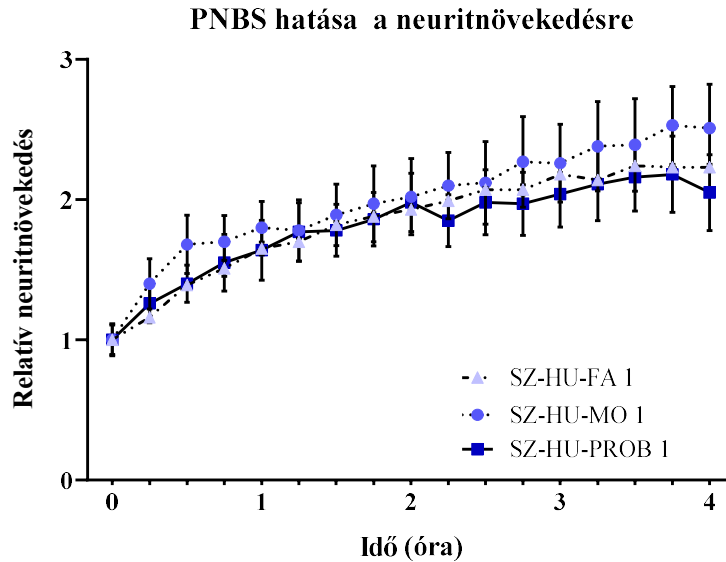


**20. D ábra:** A trió NPC vonalainak neuritnövekedési vizsgálata. A neuritnövekedési vizsgálatok reprezentatív képei. Az NPC-eket DMSO-val vagy para-nitroblebbistatinnal (PNBS, 10  $\mu$ M) kezeltük. A neuritok növekedésének változását az ImageXpress Micro XLS Widefield High-Content Analysis System segítségével követtük és elemeztük. Skála = 200  $\mu$ m (Hathy és mtsai 2020).



**20. E. ábra:** A trió NPC vonalainak neuritnövekedéses tesztje. A diagram az NPC-k 4 óra elteltével Calceinnel vizualizált, 0 órára normalizált DMSO által kiváltott átlagos neuritnövekedését  $\pm$  SE-t mutatják ( $N = 3$  független kísérlet) (Hathy és mtsai 2020).

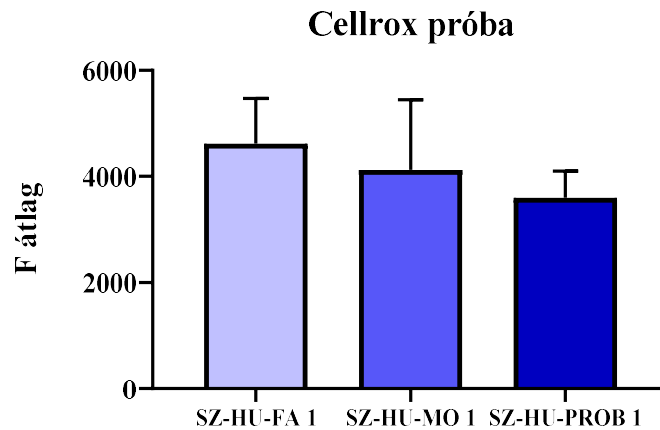
A DMSO hozzáadása során az össz neuritnövekedés mértéke nagyobb volt a betegből származtatott és az apai NPC vonalakban az anyai NPC vonallal összevetve, amely különbség az 1 óra mérési pontban szignifikánssá vált. A PNBS-kezelés megszüntette ezeket a különbségeket (20. D, F ábra).



**20. F. ábra:** A trió NPC vonalainak proliferációs, sebzéses és neuritnövekedéses tesztjei. Az ábrán 4 óra elteltével Calcein jelölt, 0 órára és DMSO-ra normalizált PNBS (10  $\mu$ M) kezelt NPC-k átlagos neuritnövekedése  $\pm$  SE-t látható ( $N = 3$  független kísérlet) (Hathy és mtsai 2020).

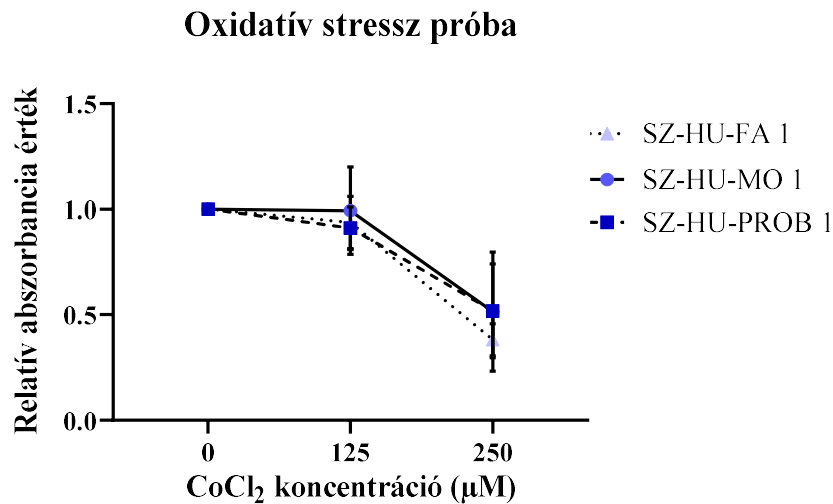
#### 4.7. A mitokondriális funkció és az oxidatív stressz toleranciájának eredményei

A ROS változásainak és az oxidatív stressz toleranciájának tesztelésére három független módszert alkalmaztunk. Meglepő módon a betegből származtatott NPC vonalon alacsonyabb ROS szintek voltak mérhetőek, amelyek azonban statisztikailag nem voltak szignifikánsak ( $p = 0,317$ , 21. A ábra).



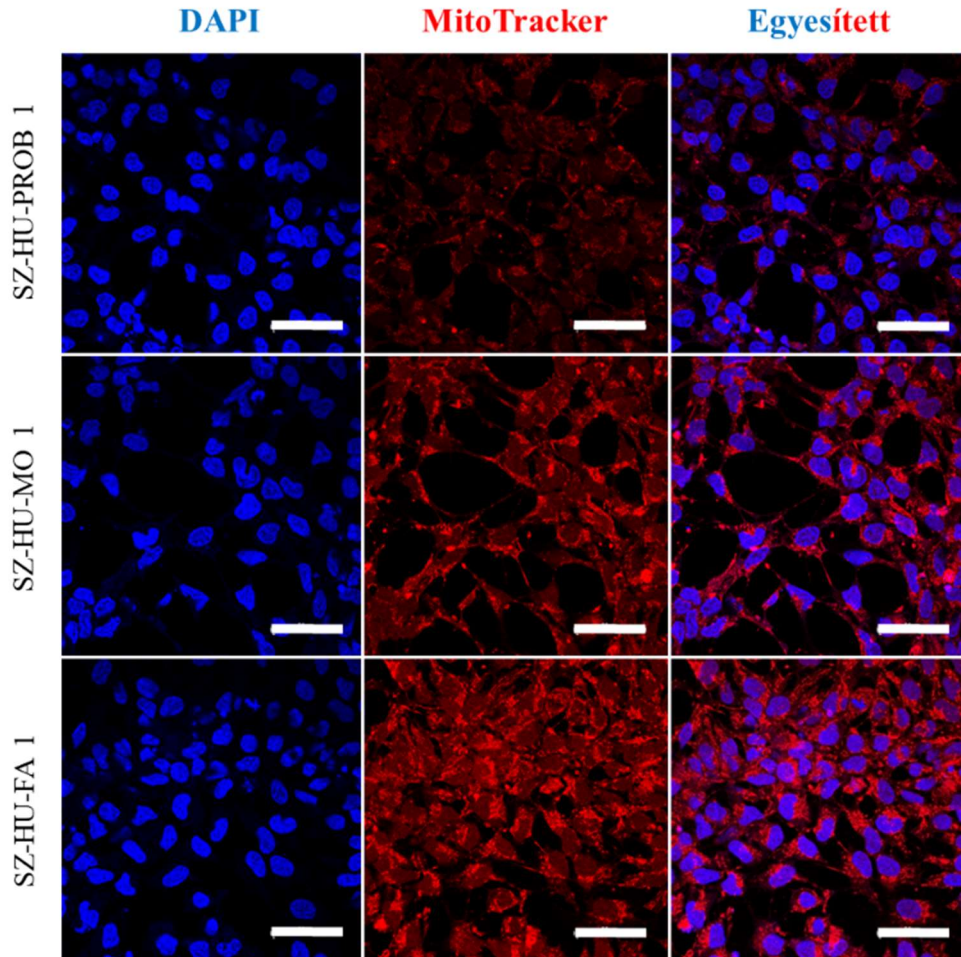
**21. A. ábra:** A mitokondriális funkció és az oxidatív stressz tolerancia vizsgálata a trió NPC vonalakban. Az NPC-k reaktív oxigéngyökeinek (ROS) mennyiségi meghatározása CellROX kit segítségével áramlási citometriával történt. A diagram az átlagos fluoreszcencia intenzitást  $\pm$  SE-t mutatja  $N = 3$  független kísérletnél (Hathy és mtsai 2020).

Nem találtunk szignifikáns különbséget a sejtvonalak oxidatív stressz-toleranciájában sem, amelyet 24 órán keresztül  $\text{CoCl}_2$ -dal történő kezelés és az azt követő reoxigenizáció váltott ki (21. B ábra).



**21. B. ábra:** A mitokondriális funkció és az oxidatív stressz tolerancia vizsgálata a trió NPC vonalakban. A  $\text{CoCl}_2$  kezelés hatása az NPC sejtek túlélésére. Az NPC-eket 24 órán keresztül 125 és 250  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ -dal kezeltük. 48 óra reoxigenizálás után a sejtek életképességét az oxidatív stressz hatásának meghatározása céljából Presto Blue festéssel mértük. A diagram a kezeletlen sejtekre normalizált  $\pm$  SE átlagértékeket mutatja ( $N = 5$  független kísérlet,  $n = 3$  technikai ismétlés/kísérlet) (Hathy és mtsai 2020).

Ezután az NPC-k mitokondriumainak mennyiségi meghatározásához mitokondrium-specifikus festéket használtunk, amely lehetővé teszi a funkcionális mitokondriumok mérését fluoreszcencia intenzitás alapján.

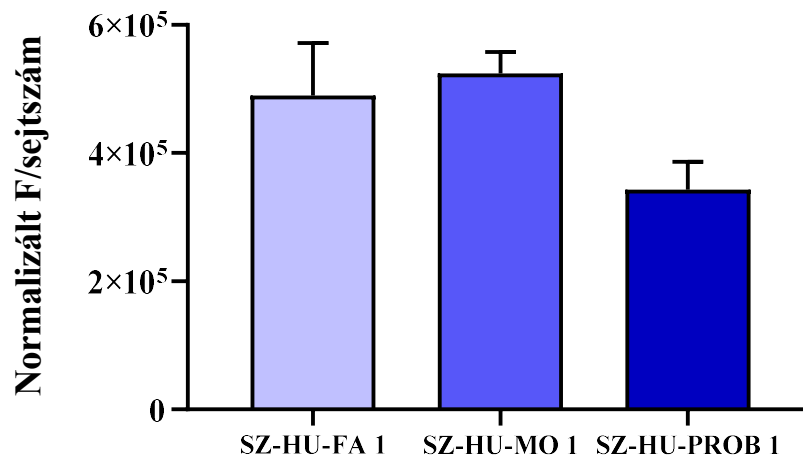


**21. C. ábra:** A mitokondriális funkció és az oxidatív stressz tolerancia vizsgálata a trió NPC vonalakban. NPC-k mitokondriális funkcióinak vizsgálata. A fixált NPC-eket fluoreszcens festékkel (MitoTracker™ Red CMXRos) festettük és konfokális mikroszkóppal rögzítettük a változásokat. Skála = 50  $\mu$ m (Hathy és mtsai 2020).

Ez a vizsgálat a betegből származó sejtekben (NPC-SZ-HU-PROB-ban) a funkcionális mitokondriumok csökkent mennyiségét mutatta ( $p = 0,064$ ), mind az anyai sejtvonalhoz, mind az egészséges kontroll sejtvonalhoz képest (21. C és D. ábra).



## Mitotracker próba



**21. D. ábra:** A mitokondriális funkció és az oxidatív stressz tolerancia vizsgálata a trió NPC vonalakban. A MitoTracker festés mennyiségi meghatározása. A diagram az NPC vonalak magjaira normalizált átlagos fluoreszcencia intenzitást mutatja  $\pm$  SE. Az adatokat konfokális mikroszkópos fluoreszcens festéssel készítettük és ImageJ-vel elemeztük ( $N = 3$  független kísérlet,  $n = 4-6$  kép/kísérlet) (Hathy és mtsai 2020).

## 5. Megbeszélés

A komplex pszichiátriai betegségek vizsgálatának egy új irányvonalát képviselik az iPSC alapú betegségmodellek. Számos módszert hoztak létre az emberi idegsejtek létrehozására (Elkabetz és mtsai 2008, Koch és mtsai 2009, Kozubenko és mtsai 2010), (Conti és Cattaneo 2010, Mertens és mtsai 2016), amelyek különböző forrású és típusú NPC kultúrákat és differenciált idegsejteket eredményeznek. Eredményeink ezen kutatások sorozatába illeszkednek és betekintést nyújtanak a szkizofrénia molekuláris patomechanizmusának egy eddig keveset vizsgált területére, a *de novo* mutációk hatásmechanizmusába.

### 5.1. Kísérleti tesztrendszer optimalizálása, beállítása

Munkánk során kísérleti rendszerünk beállításához egy Sendai-vírussal visszaprogramozott, egészséges egyénből származó indukált pluripotens sejt vonalat használtunk. Először ezen a kontroll rendszeren próbáltuk ki, majd optimalizáltuk az alkalmazni kívánt differenciációs protokollt (Yu és mtsai 2014), illetve a molekuláris és funkcionális karakterizálási panelünket. A felnőttkori humán neurogenesis, amely érintett lehet a SZ kialakulásában, emberben nehezen tanulmányozható és alapvetően eltér a rágszáló agyban megfigyelhető felnőttkori neurogenesisétől (Ernst és Frisén 2015). Azonban az általunk használt, SZ szempontjából releváns iPSC eredetű PROX1-expresszáló humán *in vitro* neuronok segíthetnek vizsgálni a gyrus dentatus szerepét a pszichiátriai betegségekben és bizonyos szempontból a felnőttkori neurogenesiset is; ezért hasznos modellként szolgálhatnak a pszichiátriai rendellenességek vizsgálatában.

Az ezzel a módszerrel előállított NPC-k 5 és 15 passzázsszám között homogén morfológiát és megegyező differenciálódási képességet mutattak. Immuncitokémiai és qPCR vizsgálatokkal azt találtuk, hogy az ezzel a protokollal létrehozott NPC-k magas szintű SOX2, Nestin és PAX6 expressziót mutattak, míg érett neuronokká való differenciáltatásuk során a NEUROD1 és a PROX1 expressziója nőtt meg. A 4 hetes idegsejtek MAP2 idegsejt markerre pozitívak voltak (Yu és mtsai 2014). Megállapítottuk, hogy az NPC-kben és a 4 hetes idegsejtekben az OCT4 és a NANOG pluripotencia markerek expressziója szignifikánsan csökkent, azonban a NANOG expressziója magasabb volt az idegsejtekben, mint az NPC-kben. Ez az idegi differenciálódás kezdetén levő 3 hetes Wnt3A kezelés következménye lehet, mivel a

Wnt3A stimuláció indukálhatja a NANOG transzkripcióját, mivel endothel sejtekben ezt találták (Kohler és mtsai 2011).

A létrehozott NPC-k és idegsejtek funkcionális vizsgálatához kalcium-képkalkotó eljárást használtunk, mivel az intracelluláris  $Ca^{2+}$  aktivitás mérésére hatékony módszernek bizonyult az iPSC alapú betegségmodellezési vizsgálatokban. Korábban specifikus változásokat detektáltak ezzel a módszerrel, például csökkent spontán kalcium-aktivitást és neuronális konnektivitást Rett-szindróma és a szkizofrénia eredetű idegsejtekből létrehozott idegsejtkultúrákban (Marchetto és mtsai 2010, Yu és mtsai 2014). Leírták bipoláris zavarral diagnosztizált betegek iPSC eredetű neuronális kultúráinak fokozott aktivitását is (Mertens és mtsai 2015). Tehát ezen tanulmányok alapján az iPSC alapú neurális rendszerek funkcionálisan jól jellemezhetőek lehetnek kalcium-képkalkotási eljárással. Azonban korábban publikált kísérletekben Forostyak és mtsai (2013) kimutatták, hogy a kalciumjelek változnak a kevésbé specifikus differenciáltatási protokollal létrehozott NPC-k hosszú távú tenyésztése során. Ezért szükséges volt ennek a szempontjából is tesztelnünk hippokampális NPC kultúráinkat p8 és p15 passzázsszám között. A fent említett vizsgálat ellentétben, ahol a ligandum alapú kalcium-aktivitás p6 és p10 között fokozatosan változott, azt találtuk, hogy az ATP, LPA, tripszin és KCl hozzáadása után kapott kalciumjelek (a válaszadó sejtek számát és a kalcium intenzitását tekintve) nem függtek szignifikánsan a passzázsszámtól.

Eredményeink összhangban voltak a korábban publikált tanulmányokban (Forostyak és mtsai 2013, Viero és mtsai 2014) szereplő azon sejtek számával, amelyek a glutamát hozzáadása utáni kalciumjelekben nagy változékonyságot mutattak, azonban a jelek intenzitása nem változott szignifikánsan. Az NPC-k tartós tenyésztése során kevesebb mint 5%, részben differenciált sejtet figyeltünk meg. Ezek a sejtek neurit kinövéseket mutattak és csökkent kalciumjeleket adtak a KCl hozzáadása után. Eredményeink azt mutatják, hogy a tágabb differenciációs képességű NPC-k (Forostyak és mtsai 2013, Kozubenko és mtsai 2010, Viero és mtsai 2014) kalcium szignalizációs tulajdonságaikban változékonnyabbak lehetnek, mint a célzottabb differenciáltatással létrehozott NPC-k (Yu és mtsai 2014). Így az általunk használt neuronpopuláció létrehozását megcélzó protokoll alkalmazása mellett a kalcium-képkalkotó vizsgálatokkal az NPC-k és neuronok funkcionálisan jól jellemezhetőek. *In vitro* kalciumméréshez

széles körben alkalmaznak kalciumérzékeny festékeket, például Fluo-4/AM, Fura 2/AM vagy Oregon green 488 BAPTA-1 AM (OGB1-AM), míg *in vivo* kísérletekhez géntechnológiával módosított kalcium indukátor (GECI) fehérjéket (Apáti és mtsai 2016, Dana és mtsai 2016, Rose és mtsai 2014). Kísérleteinkben az NPC-k kalciumjeleit Fluo-4 kalciumszenzitív festékekkel vizsgáltuk, valamint további kísérletekben GCaMP6 expresszáló NPC-eket hoztunk létre, de ezek az eredmények nem képezik tárgyát a disszertációnak.

Molekuláris és funkcionális kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az iPSC-k az optimalizált neuronális differenciációs protokollal képesek voltak NPC-k és neuronok létrehozására, amelyek a kalcium-képző vizsgálatok eredményei alapján jól kvantitálható funkcionális aktivitással is rendelkeztek.

## **5.2. Az iPSC alapú neurális *in vitro* beteg-szülő trió modellrendszer**

Következő lépésként az előzőekben beállított kísérleti rendszerünkkel egy iPSC alapú neurális *in vitro* beteg-szülő trió modellrendszerrel kívántuk vizsgálni egy SZ páciensben azonosított DNM-k biológiai jelentőségét. Vizsgálatainkban a különböző metodikai megközelítések segítségével a betegség fejlődésbiológiai patológiájával és a vizsgált DNM-kal részben összekapcsolható molekuláris és funkcionális fenotípusokban megmutatkozó különbségeket tudtunk azonosítani a trió sejtvonalai között. A megfigyelt fenotípusok részben összhangban vannak az SZ korábbi iPSC alapú betegségmodellelési eredményeivel. Munkánk elsők között van azon tanulmányok között, amelyekben egy teljes trió visszaprogramozását végezték el SZ-ban megjelenő DNM-ek feltételezett molekuláris hatásainak tesztelésére.

### **5.2.1 A betegségmodell iPSC vonalainak megalapítása és jellemzése**

A kísérletek első szakaszában kiválasztottuk 16, exom-szekvenálási adatokkal rendelkező eset-szülő trióból azt a triót, melynek tagjaiból iPSC vonalakat kívántunk létrehozni. Választásunk egy olyan szkizofrén férfi betegre esett, aki három különböző DNM hordozójaként tudtunk azonosítani. A tájékozott beleegyezés után bevont eset-szülő minden tagjából sikeresen alapítottunk többszörös iPSC klónokat. Az iPSC

klónokat az őssejtbiológiai terület elvárásai alapján karakterizáltuk és vetettük alá szigorú minőség-kontrollnak. Pluripotenciáljukat és genomi integritásukat is többféle módszerrel vizsgáltuk: kariotipizálással, STR analízissel, Sanger-szekvenálással, immuncitokémiai jelöléssel, áramlási citometriával, qPCR-ral. Minden módszer esetén az iPSC vonalak megfeleltek az őssejtekkel szemben támasztott kritériumoknak. Spontán differenciáltatásuk során mindhárom csíralemez irányába képesek voltak differenciálódni. E sejtvonalak jelentősége abban rejlik, hogy általuk lehetőségünk nyílik a DNM-k funkcionális szerepének vizsgálatára szkizofrén betegekben.

### 5.2.2. A trió iPSC vonalaiból létrehozott NPC-k és neuronok jellemzése

A korábbi megállapításokkal és kísérletekkel összhangban az összes iPSC vonal képes volt neurális differenciálódásra, ez homogén SOX2 és NESTIN expresszáló neuronális progenitorokat eredményezett. Ezt követően további differenciáltatással MAP2 és PROX1 pozitív, funkcionális aktív, gyrus dentatus neuronokat hoztunk létre. A qPCR-mérések a betegből és a szülőkből származó sejtvonalakban hasonlóan hatékony neurális differenciálódást mutattak, amit a NEUROD1, FOXG1 és PROX1 neurális marker gének expressziója is bizonyít. A NEUROD1 mRNS expressziójának esetében a beteg eredetű NPC-kben magasabb kifejeződést figyeltük meg a szülői vonalakkal képest. Más, azonos protokollt használó kutatásban (Yu és mtsai 2014) a neurális markerek csökkent expressziójáról számoltak be SZ-eredetű neuronokban, azonban a mi vizsgálatunk más felépítésű volt. Szülő-beteg trió vizsgálatunk során a vizsgált sejtvonalak között ezeknek a markereknek közel azonos expresszióját találtuk. Az NPC vonalakkal létrehozott érett neuronkultúrák Ca-képző kísérletek alapján funkcionálisnak / működőképeseknek bizonyultak, spontán aktivitást mutattak. Munkánk fókuszában azonban az NPC-k álltak, így a neuronok kalciumjeleit nem vizsgáltuk.

A teljes genom transzkriptomikai elemzése lehetővé teszi a sejtvonalak közötti finom, hálózat szintű különbségek vizsgálatát. A trió alapú megközelítést alátámasztotta, hogy a transzkripciós szintű változásokat elemzve a trió különböző tagjaiból származó minták egyértelmű elkülöníthetőek voltak főkomponens analízissel és klaszteranalízissel. A felül és alul expresszálódott DE gének listája számos olyan gént tartalmaz, ami további vizsgálatot igényel. A felül expresszálódott DE gének közül

a GSX1 egy transzkripciós faktor, amely fontos szerepet játszik a ventrális telencephalon interneuronok fejlődésében. A NEUROD1 expressziós szintek szintén a felül expresszáldott csoportban kerültek, amely megállapítást a qPCR mérések is alátámasztották. Ez a transzkripciós faktor fontos szerepet játszik a hippocampusz neurogenesisében (Yu és mtsai 2014), felül expresszáldását a beteg eredetű NPC-k korai, akcelerált fejlődésével lehet magyarázni. A Wnt3A, a Wnt6, a Wnt7B és a Wnt10A egyaránt fontos szerepet játszanak az agy és az dúcléc fejlődésében. Egy nemrégiben publikált, genom-szintű asszociációs vizsgálatban azt találták, hogy a SCARA5, a beteg eredetű NPC-kben leginkább alacsonyán expresszáldott gén összefüggésbe hozható az öngyilkos magatartással (González-Castro és mtsai 2019). A Synapsin 3 (SYN3), egy másik, igen alacsonyán expresszáldott DE gén, szerepet játszik a hippocampusz neurogenesisének szabályozásában (Kao és mtsai 2008), és genetikai vizsgálatok alapján összekapcsolható az SZ-val.

A GO és PATHWAY analízisek alapján dúsulás volt megfigyelhető egyebek mellett a neurogenesisben, a neuroná differenciálódásban, a gyrus dentatus kialakulásában, a génexpresszió szabályozásban és a jelátvitelben szerepet játszó gének között is. Ezek közül a legfontosabb a Wnt-jelátvitel, amelyet számos SZ-val kapcsolatos genetikai és betegségmodell vizsgálatban már bizonyítottak (Brennan és mtsai 2011). A DE gének listájában olyan gének dúsulását figyeltük meg, amelyek a KHSRP ismert vagy feltételezhető célgénjei. Több miRNS eltérő szabályozását is megfigyeltük, azonban ezekkel a megállapításokkal körültekintően kell eljárni, mivel a használt szekvenálási eljárást nem optimalizálták kis RNS-ekhez. Ebben a tanulmányban a transzkriptomikai elemzések fontos korlátja az volt, hogy nem használtunk külső kontrollt, mint a többi kísérletben. Ezért az azonosított különbségek csak a három tag közötti összehasonlításon alapultak.

A sejtvonalak közötti funkcionális különbségeket NPC-tenyészetekben kalcium-képző kísérletekkel vizsgáltuk. Megvizsgáltuk az NPC-k glutamára adott választ, mivel a gyrus dentatus progenitorok *in vivo* glutamáterg innervációt kapnak sejtek. A betegből származó NPC-k az apai és az anyai NPC-khez képest glutamát hozzáadása után alacsonyabb kalcium-aktivitást mutattak. Ehhez hasonlóan Yu és mtsai szintén alacsonyabb szintű spontán kalcium-aktivitást talált az SZ eredetű sejtvonalakban, azonban kísérleteinkben a spontán aktivitást érett idegsejtekben mérték, nem pedig NPC-

kben. *In vivo* a neurális őssejtpopulációkban a  $Ca^{2+}$  szignalizáció fontos szerepet játszik az idegsejtek differenciálódásában és migrációjában (Toth és mtsai 2016). A proliferáció, a migráció, a neuritnövekedés, az oxidatív stressz és a mitokondriális funkció különböző módszerekkel értékelését is elvégeztük. A trió NPC vonalak közötti különbségeket a proliferációban és a mitokondriális funkcióban tudtuk kimutatni. Ezeket a fenotípusokat vagy az RNS szekvenálási kísérletben azonosított transzkripciós különbségek, vagy más csoportok korábbi megállapításai alapján tartottuk fontosnak. Kísérleteink során a beteg-eredetű vonalakban megfigyelt fokozott NPC sejtproliferáció és a más csoportok által tapasztalt migrációs különbségek összhangban vannak a Wnt-szignalizáció és a sejtadhézió transzkriptomikai változásaival, de korábban a fokozott proliferációt elsősorban ASD-vel hozták összefüggésbe. Marchetto és mtsai (2017) kimutatták az idiopátiás ASD eredetű NPC-kben a progenitorok fokozott proliferációját, amelyet a  $\beta$ -catenin jelátvitel fokozott expressziója eredményezett. Hasonlóan idiopátiás ASD-betegek kohorszában, Schäfer és mtsai (2019) kimutatták a specifikus génhálózatok diszregulációját, amely fokozott proliferációhoz vezet a beteg neurális progenitoraiban. Mind a fokozott proliferáció és mind a csökkent neuritnövekedés az ASD és az SZ fontos neurodevelopmentális fenotípusa. Például a Kleefstra-szindróma iPSC alapú modelljében is, amely az ASD genetikai szempontból jól definiált altípusa, az NPC-k fokozott proliferációját, míg az érett idegsejtek csökkent neuritek arborizációját / sarjadzását írták le (Nagy és mtsai 2017).

A DNM-ek potenciális hatásával kapcsolatban fontos kiemelni, hogy korábban kimutatták azt, hogy a KHSRP szabályozza az axonális és dendritikus növekedés fontos szereplőjének számító GAP43 mRNS-ének stabilitását (Bird és mtsai 2013). A KHSRP genetikai módosítása megváltozott axonális növekedésben nyilvánult meg az egér primer idegsejt tenyészetekben. Kísérleteinkben tendencia jellegű különbséget tudunk azonosítani a neuritok növekedésében. A beteg-eredetű és az apai progenitorokban felgyorsult neuritnövekedés figyelhető meg. Mind a fokozott NPC-szaporodás, mind a felgyorsult neuritnövekedés olyan fenotípus, amelyet korábban ASD-vel hoztak összefüggésben, azonban a vizsgált SZ trióban szintén azonosíthatók voltak. Grunwald és mtsai (Grunwald és mtsai 2019) SZ és az ASD eredetű idegsejtek összehasonlítására iPSC alapú modellrendszert alkalmaztak, melynek eredményeképpen átfedő fenotípusokat is találtak, azonban az SZ és az ASD eredetű neuronokat

transzkriptomikai elemzés és  $\text{Ca}^{2+}$  képalkotó eljárás kombinációjával egyértelműen meg lehetett különböztetni.

Végül nem találtunk a vonalak között különbséget az oxidatív stressz toleranciájában és a ROS szintjében. A beteg NPC-iben azonban megfigyelhető volt a funkcionális mitokondriumok alacsonyabb száma, és az elektronmikroszkópos képek ezekben a sejtvonalakban megváltozott mitokondriális morfológiát mutattak. A megnövekedett oxidatív stresszt és a mitokondriális patológiát korábban számos neurodevelopmentális és neurodegeneratív rendellenességben leírták, úgymint a SZ, ASD, amiotrófiás laterális szklerózis, Parkinson-kór és Alzheimer-kór. Ennek a hipotézisnek a fő koncepciója a fejlődő agyban található redox rendszerek szabályozásának hibája, amely fokozott oxidatív stresszt és mitokondriális patológiát eredményez (Bitanirwe és Woo 2011, Sullivan és Chandel 2014). A megnövekedett oxidatív stressz szintje megváltozott migrációhoz és éréshez vezet a fejlődő idegsejtekben, valamint neurális toxicitáshoz a felnőtt agyban. Több bizonyíték is utal arra, hogy a mitokondriális diszfunkció fontos szerepet játszhat az SZ betegségmodelljeiben is. Egy vizsgálatban négy SZ beteg NPC-iben mind a mitokondriális diszfunkciót, mind az oxidatív stresszt vizsgálták, amellyel meg tudták vizsgálni a ROS-indukált oxidált fehérjék szintjét. A SZ-eredetű sejtvonalakban emelkedtek szintet írtak le az egészséges kontrollokhoz képest (Brennan és mtsai 2015). Ugyanebben a kohorszban az immunhisztokémiai festés és a TEM megváltozott mitokondriális patológiát mutatott. Saját NPC sejtvonalainkban nem találtunk különbséget a ROS szintekben, azonban a mitokondriális patológia kimutatható volt.

Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy sikeresen létrehoztunk egy iPSC alapú *in vitro* eset-szülő trió betegségmodellt, amellyel a *de novo* mutációk szkizofréniához köthető celluláris fenotípusait tudtuk vizsgálni.

**10. táblázat: A disszertáció főbb eredményeinek táblázatos összefoglalása**

Főbb mérföldkövek (célkitűzések)	Állapot	Módszer	Főbb eredmények, megfigyelések
Differenciációs protokoll beállítása, optimalizálása	iPSC NPC Neuron	Sejttenyésztés qPCR Kalcium-képalkotó vizsgálat	- sikeres NPC és neuron létrehozás; - OCT 3/4 és NANOG NPC és neuron ↓ expresszió - NESTIN NPC ↑ expresszió - PAX6, NEUROD1, PROX1, FOXG1 neuron ↑ expresszió - NPC-ben nincs spontán kalciumjel; ATP, LPA, Try, GLU indukció beállítása



Főbb mérföldkövek (célkitűzések)	Állapot	Módszer	Főbb eredmények, megfigyelések
			- neuronok spontán aktivitása; KCl-ra depolarizáció, TTX spontán aktivitás gátlás
<b>Beteg-szülő trió kiválasztása</b>	Vér	Exom-szekvenálás Bioinformatikai filterezés Sanger-szekvenálás	- 16 szkizofrén eset-kontroll trió exom-szekvenálása - > 1500 mutáció - bioinformatikai elemzés -> 66 valószínű DNM - Sanger-szekvenálással validált 12 DNM - 9 DNM misszensz vagy nonszensz - 1 betegben 3 DNM: KHSRP, LRRC7, KIR2DL1 aminosav cseréje
<b>Beteg-szülő trió PBMC sejtjeiből iPSC vonalak alapítása</b>	iPSC	Kariotipizálás Mikroszkópia Szekvenálás Immuncitokémia qPCR	- egészséges kariotípus - Sanger szekvenálással a beteg 3 DNM-jának visszaigazolása - megfelelő iPSC morfológia és pluripotencia markerek, a 3 csíralemez irányú differenciációs képesség
<b>iPSC vonalából NPC és neuron differenciáltatása</b>	iPSC NPC Neuron	Sejttenyésztés qPCR RNS-szekvenálási kísérletek Kalcium-képkalkotó vizsgálat Sejtploriferációs kísérlet Sebzéses kísérlet Neuritnövekedési kísérlet CellRox próba Oxidatív stressz próba Mitotracker próba	- NPC differenciálódási képességét neuronok létrehozása igazolja - NESTIN/SOX2 pozitív NPC, PROX1/MAP2 pozitív neuron - NANOG NPC, neuron ↓ expresszió - NESTIN/FOXP1 NPC ↑ expresszió - PAX6, NEUROD1, GRIA1, GRIN1 neuron ↑ expresszió - a DE gének a neuronok kialakulásáért felelős ligandum-receptor kölcsönhatásokat érintő útvonalak, az axon fejlődésért felelős útvonalak, a neurogenesis, Wnt-jelátvitel, Ca <sup>2+</sup> jelátvitel - a beteg NPC vonal szignifikánsan ↓ GLU-válasz - a beteg NPC vonalban 4. napon szignifikánsan ↑ sejtosztódás - a beteg vonalban 24 óránál tendenciálisan ↑ sebzáródás - a beteg NPC vonal javára sem kezeletlen, sem indukált neuritnövekedés esetén sincs szignifikáns különbség - beteg NPC tendenciálisan ↓ ROS szintet mutatott - nem tapasztaltunk különbséget oxidatív stressz toleranciában - beteg NPC vonalban ↓ funkcionális mitokondriumok szám

## 6. Következtetések

A betegségmodellezés területén a beteg-szülő trió visszaprogramozása lehetőséget kínált a betegséget okozó mutációk molekuláris hatásainak vizsgálatára és ezek összehasonlítására közeleső genetikai háttérű sejtvonalakban. Különböző módszertani megközelítések segítségével számos fenotípust tudunk leírni a SZ betegből származó NPC vonalon. Az RNS-szekvenálás a DE-gének fokozott expresszióját mutatta a neuronok kialakulásáért felelős ligandum-receptor kölcsönhatásokban, az axon fejlődésért felelős útvonalakban, a neurogenesisben, az idegsejtek differenciálódásában fontos Wnt-jelátviteli, és  $Ca^{2+}$  jelátviteli útvonalakban. A beteg NPC vonalában a kalcium-képkalkotó vizsgálattal csökkent glutamát választ mértünk. A SZ betegből származó NPC-k az anyai és apai vonalokhoz képest a sejtosztódásos vizsgálatok 4. napján fokozott proliferációt mutattak. A reaktív oxigén gyökök szintjeinek összehasonlításakor a beteg NPC-iben tendencia jelleggel alacsonyabb szint volt mérhető. A MitoTracker kísérletekkel pedig a funkcionáló mitokondriumok csökkent mennyiségét láttuk. Ezen fenotípusok közül például az NPC-k proliferációját korábban már összefüggésbe hozták az SZ-án kívül az ASD-vel is. Eredményeink szerint elképzelhető, hogy a SZ és az ASD között ezen fenotípusok tekintetében átfedés van. Ez a két rendellenesség, bár klinikailag elkülönül, a tünetek és a genetika szintjén jelentős mértékű átfedést mutat. Ezért feltételezhető, hogy az átfedő fenotípusok ebben a betegségmodellben is kimutathatók.

Fontos, hogy összefoglaljuk kutatási koncepcióink és modellrendszerünk limitációit és potenciális kibővítési pontjait is. Vizsgálatunkban egy család szerepelt, ezért megállapításink nem általánosíthatóak, és alacsony esetszámokat képviselnek, azonban ez a megközelítés többek között a személyre szabott medicina alapját képezheti a jövőben. A vizsgált beteg-szülő triót 16 család exom-szekvenálási vizsgálata segítségével választottuk ki, így a kísérletek bővíthetőek további családokkal is. A beteg két testvéréből nem hoztunk létre iPSC vonalakat, így nem tudtuk a családban előforduló, nem a DNMT-k által okozott genetikai hatásokat vizsgálni. Továbbiakban kiterjeszhető a vizsgálat a többi családtagra is. A transzkripció és funkcionális vizsgálatok az NPC szakaszra korlátozódtak, amely a neuronális differenciációknak csak az első szakaszát reprezentálja. Ezeket a változókat az érett idegsejt szakaszában is célunk megvizsgálni. A célzott genomszerkesztési módszerek, például a CRISPR,

amelyet nem használtunk ezekben a kísérleteinkben, lenne a legmegfelelőbb módszer a DNM-ek specifikus hatásainak vizsgálatára és a feltételezett sejtes fenotípusok szelektív összekapcsolására ezekkel. CRISPR módszerrel lehetőség van a DNM-ek korrekciójára, és izogenikus iPSC vonalak létrehozására, melyek az adott mutációt leszámítva, azonos genetikai háttérrel rendelkeznek. A visszaprogramozási folyamat során potenciálisan fejlődő CNV-eket nem vizsgáltuk az iPSC vonalakon.

Számos megoldásra váró kérdés marad ezekkel a rendszerekkel kapcsolatban, mint a kvantifikálás, standardizálás, skálázhatóság és a megismételhetőség, de reményeink szerint ez a megközelítés is egy növekvő jelentőségű eleme lesz a neuropszichiátriai betegségek kutatásának (Kálmán és mtsai 2016).

## 7. Összefoglalás

Az elmúlt évtizedben az *in vitro* betegségmodellezés fontos módszertani eszközzé vált az őssejtbiológia és a kísérleti idegtudomány találkozásánál, amely alkalmazható a neurológiai és pszichiátriai betegségek molekuláris hátterének feltárására. A modellezés során a humán őssejtek pluripotens tulajdonságait használjuk fel arra, hogy egy betegség szempontjából fontos sejtípust hozzunk létre - a neuropszichiátriai betegségek esetében neuronokat - laboratóriumi körülmények között irányított differenciálási protokollok alkalmazásával. Különösen érdekes ez a megközelítés, ha ismert genetikai rizikóvariánsokat hordozó páciensek testi sejtjeiből visszaprogramozással iPSC-ket hozzunk létre, majd ezeket használjuk fel *in vitro* idegsejtkultúrák létrehozásához

Kísérleteink célja az volt, hogy a szkizofréniában konkrét genetikai variánsok sejt szintű, idegsejt-fejlődésre és működésére kifejtett hatását vizsgáljuk indukált pluripotens őssejt alapú modellel. A DNМ-k hatásainak sejtes rendszerben történő vizsgálatához egy olyan megközelítést dolgoztunk ki, amelyben egy szkizofrén eset-szülő trió minden tagjának perifériás vérének mononukleáris sejtjeiből Sendai-vírus alapú visszaprogramozásával indukált pluripotens őssejtvonalat hoztunk létre. Modellünkben a szkizofrén beteg 3 nem szinonim mutáció hordozója az LRRC7, KHSRP és KIR2DL1 génekben, melyek közül kettő, az LRRC7 és a KHSRP biológiailag releváns lehet a szkizofrénia patomechanizmusának szempontjából. A létrehozott iPSC vonalakat kariotipizálással és STR analízissel vetettük alá szigorú minőségi kontrollnak (kromoszómális és genetikai változások kizárása), valamint áramlási citometriával, qPCR-ral és immunocitokémiával jellemeztük (pluripotens állapot ellenőrzése). Az így kapott, további kutatásokhoz is felhasználható sejt vonalakat publikáltuk és elérhetővé tesszük a szélesebb kutató közösség számára.

Az iPSC vonalából gyrus dentatus differenciációs protokoll felhasználásával NPC-ket és érett neuronokat hoztunk létre. Ezek immunocitokémiai és qPCR vizsgálata azt mutatta, hogy mindegyik iPSC vonal képes NPC-k és neuronok létrehozására. A vizsgált NPC vonalak transzkriptomikai vizsgálata a Wnt-szignalizációval, a neuronális differenciációval, axon növekedéssel és szinaptikus funkcióval kapcsolatos különbségeket mutatott. Kalcium-képződési, sejtproliferációs, migrációs, oxidatív stressz és mitokondriális vizsgálatainkban a glutamát-ra adott válaszban, valamint

proliferációs és mitokondriális folyamatokban észleltünk eltéréseket a betegből származó NPC-kben. Az *in vitro* modellrendszerünkkel az NPC állapotban észlelt celluláris fenotipikus különbségek tovább bővíthetik a szkizofrénia molekuláris patomechanizmusával kapcsolatos tudásunkat.

## 8. Summary

In the last decade, *in vitro* disease modeling has become an important methodological tool at the intersection of stem cell biology and experimental neuroscience that can be used to explore the molecular background of neurological and psychiatric disorders. In this approach the pluripotent properties of human stem cells are exploited to generate disease-relevant cell types - in this case neurons - using specific differentiation protocols. The iPSC-based *in vitro* disease modeling has been exploited successfully to elucidate molecular disease pathways giving rise to schizophrenia. Therefore, it is plausible to use this model system for the investigation of disease causing genetic factors in schizophrenia.

The aim of our experiments was to investigate the effects of specific genetic variants on neuronal development and function in schizophrenia in an iPSC-based model. To investigate the effects of DNMs in this model system, we generated a pluripotent stem cell lines by Sendai virus-based reprogramming from the peripheral blood mononuclear cells of all members of a SZ case-parent trio. We selected a SZ patient carrying 3 non-synonymous DNM mutations in the LRRC7, KHSRP, and KIR2DL1 genes. The LRRC7 and KHSRP genes are biologically relevant to the pathomechanism of schizophrenia. The generated iPSC lines were characterized by karyotyping, STR analysis (chromosomal and genetic change), flow cytometry, qPCR, and immunocytochemistry (pluripotent state), and underwent strict quality control. The resulting cell lines, which can be used for further research, have been published and made available to the wider research community.

The NPCs and mature neurons were generated from iPSC lines using the gyrus dentatus differentiation protocol. Immunocytochemical and qPCR studies of these iPSCs showed that each line was capable of generating NPCs and neurons. Transcriptomic analysis of the NPC lines showed differences in Wnt signaling, neuronal differentiation, axon guidance, and synaptic function. Differences in glutamate response, proliferation, and mitochondrial function were observed in patient-derived NPCs by calcium imaging, cell proliferation, migration, oxidative stress, and mitochondrial assays. These phenotypic differences observed in the NPC state further expand our knowledge of the molecular pathomechanism of SZ.



## 9. Irodalomjegyzék

- Altman J, Das GD. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 124: 319-335.
- Altman J, Das GD, Sudarshan K. (1970) The influence of nutrition on neural and behavioral development. I. Critical review of some data on the growth of the body and the brain following dietary deprivation during gestation and lactation. *Dev Psychobiol*, 3: 281-301.
- Apáti Á, Berez T, Sarkadi B. (2016) Calcium signaling in human pluripotent stem cells. *Cell Calcium*, 59: 117-123.
- Becker AJ, Mc CE, Till JE. (1963) Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 197: 452-454.
- Benam KH, Dauth S, Hassell B, Herland A, Jain A, Jang KJ, Karalis K, Kim HJ, MacQueen L, Mahmoodian R, Musah S, Torisawa YS, van der Meer AD, Villenave R, Yadid M, Parker KK, Ingber DE. (2015) Engineered in vitro disease models. *Annu Rev Pathol*, 10: 195-262.
- Benkovits J, Magyarosi S, Pulay AJ, Makkos Z, Egerhazi A, Balogh N, Almos P, Liko I, Schizobank Consortium H, Nemeth G, Molnar JM, Nagy L, Rethelyi JM. (2016) [Investigation of CNTF, COMT, DDR1, DISC1, DRD2, DRD3, and DTNBP1 candidate genes in schizophrenia: Results from the Hungarian SCHIZOBANK Consortium]. *Neuropsychopharmacol Hung*, 18: 181-187.
- Bird C, Gardiner A, Bolognani F, Tanner D, Chen C-Y, Lin W-J, Yoo S, Twiss J, Perrone-Bizzozero N. (2013) KSRP Modulation of GAP-43 mRNA Stability Restricts Axonal Outgrowth in Embryonic Hippocampal Neurons. *PloS one*, 8: e79255.
- Bitanhirwe BKY, Woo T-UW. (2011) Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 35: 878-893.
- Brennand K, Savas JN, Kim Y, Tran N, Simone A, Hashimoto-Torii K, Beaumont KG, Kim HJ, Topol A, Ladrán I, Abdelrahim M, Matikainen-Ankney B, Chao Sh, Mrksich M, Rakic P, Fang G, Zhang B, Yates JR, Gage FH. (2015) Phenotypic



- differences in hiPSC NPCs derived from patients with schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 20: 361-368.
- Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhardt C, Tran N, Sangar S, Li Y, Mu Y, Chen G, Yu D, McCarthy S, Sebat J, Gage FH. (2011) Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 473: 221-225.
- Briata P, Bordo D, Puppo M, Gorlero F, Rossi M, Perrone-Bizzozero N, Gherzi R. (2016) Diverse roles of the nucleic acid-binding protein KHSRP in cell differentiation and disease. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 7: 227-240.
- Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K. (2014) Increased 11 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. *Neuron*, 81: 306-313.
- Cheong EV, Sinnott C, Dahly D, Kearney PM. (2017) Adverse childhood experiences (ACEs) and later-life depression: perceived social support as a potential protective factor. *BMJ Open*, 7: e013228.
- Conti L, Cattaneo E. (2010) Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nat Rev Neurosci*, 11: 176-187.
- Coskun V, Lombardo DM. (2016) Studying the pathophysiologic connection between cardiovascular and nervous systems using stem cells. *J Neurosci Res*, 94: 1499-1510.
- Crowley JJ, Hilliard CE, Kim Y, Morgan MB, Lewis LR, Muzny DM, Hawes AC, Sabo A, Wheeler DA, Lieberman JA, Sullivan PF, Gibbs RA. (2013) Deep resequencing and association analysis of schizophrenia candidate genes. *Molecular psychiatry*, 18: 138-140.
- D'Aiuto L, Prasad KM, Upton CH, Viggiano L, Milosevic J, Raimondi G, McClain L, Chowdari K, Tischfield J, Sheldon M, Moore JC, Yolken RH, Kinchington PR, Nimgaonkar VL. (2015) Persistent infection by HSV-1 is associated with changes in functional architecture of iPSC-derived neurons and brain activation patterns underlying working memory performance. *Schizophr Bull*, 41: 123-132.
- Dana H, Mohar B, Sun Y, Narayan S, Gordus A, Hasseman JP, Tsegaye G, Holt GT, Hu A, Walpita D, Patel R, Macklin JJ, Bargmann CI, Ahrens MB, Schreiter ER,

- Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS. (2016) Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity. *Elife*, 5.
- Das DK, Tapias V, D'Aiuto L, Chowdari KV, Francis L, Zhi Y, Ghosh BA, Surti U, Tischfield J, Sheldon M, Moore JC, Fish K, Nimgaonkar V. (2015) Genetic and morphological features of human iPSC-derived neurons with chromosome 15q11.2 (BP1-BP2) deletions. *Mol Neuropsychiatry*, 1: 116-123.
- Davidson LL, Heinrichs RW. (2003) Quantification of frontal and temporal lobe brain-imaging findings in schizophrenia: A meta-analysis. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 122: 69-87.
- Drew A, Baird G, Baron-Cohen S, Cox A, Slonims V, Wheelwright S, Swettenham J, Berry B, Charman T. (2002) A pilot randomised control trial of a parent training intervention for pre-school children with autism. Preliminary findings and methodological challenges. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 11: 266-272.
- Elkabetz Y, Panagiotakos G, Al Shamy G, Socci ND, Tabar V, Studer L. (2008) Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev*, 22: 152-165.
- Erdei Z, Lőrincz R, Szebényi K, Péntek A, Varga N, Likó I, Várady G, Szakács G, Orbán TI, Sarkadi B, Apáti A. (2014) Expression pattern of the human ABC transporters in pluripotent embryonic stem cells and in their derivatives. *Cytometry B Clin Cytom*, 86: 299-310.
- Erickson M, Hahn B, Leonard C, Robinson B, Luck S, Gold J. (2014) Enhanced vulnerability to distraction does not account for working memory capacity reduction in people with schizophrenia. *Schizophrenia Research: Cognition*, 1: 149-154.
- Ernst A, Frisén J. (2015) Adult neurogenesis in humans- common and unique traits in mammals. *PLoS biology*, 13: e1002045-e1002045.
- Essayan-Perez S, Zhou B, Nabet AM, Wernig M, Huang Y-WA. (2019) Modeling Alzheimer's disease with human iPSC cells: advancements, lessons, and applications. *Neurobiology of disease*, 130: 104503-104503.
- Fabel K, Kempermann G. (2008) Physical activity and the regulation of neurogenesis in the adult and aging brain. *Neuromolecular Med*, 10: 59-66.

- Farrell MS, Werge T, Sklar P, Owen MJ, Ophoff RA, O'Donovan MC, Corvin A, Cichon S, Sullivan PF. (2015) Evaluating historical candidate genes for schizophrenia. *Molecular psychiatry*, 20: 555-562.
- Faundez V, De Toma I, Bardoni B, Bartesaghi R, Nizetic D, de la Torre R, Cohen Kadosh R, Herault Y, Dierssen M, Potier M-C, Antonarakis S, Bartesaghi R, Contestabile A, Coppus T, De Deyn P, Dekker A, Delabar J-M, Dierssen M, Fisher E, Héroult Y, Martínez-Cué C, Potier M-C, Strydom A. (2018) Translating molecular advances in Down syndrome and Fragile X syndrome into therapies. *European Neuropsychopharmacology*, 28: 675-690.
- Flaherty E, Zhu S, Barretto N, Cheng E, Deans PJM, Fernando MB, Schrode N, Francoeur N, Antoine A, Alganem K, Halpern M, Deikus G, Shah H, Fitzgerald M, Ladran I, Gochman P, Rapoport J, Tsankova NM, McCullumsmith R, Hoffman GE, Sebra R, Fang G, Brennand KJ. (2019) Neuronal impact of patient-specific aberrant NRXN1 $\alpha$  splicing. *Nat Genet*, 51: 1679-1690.
- Forostyak O, Romanyuk N, Verkhatsky A, Sykova E, Dayanithi G. (2013) Plasticity of Calcium Signaling Cascades in Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Precursors. *Stem Cells and Development*, 22: 1506-1521.
- Forrest MP, Zhang H, Moy W, McGowan H, Leites C, Dionisio LE, Xu Z, Shi J, Sanders AR, Greenleaf WJ, Cowan CA, Pang ZP, Gejman PV, Penzes P, Duan J. (2017) Open Chromatin Profiling in hiPSC-Derived Neurons Prioritizes Functional Noncoding Psychiatric Risk Variants and Highlights Neurodevelopmental Loci. *Cell Stem Cell*, 21: 305-318.e308.
- Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. (2009) Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 85: 348-362.
- Füredi J, Németh A, Somlai Z, Bai-Nagy K. *A pszichiátria magyar kézikönyve. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest, 2015.*
- Goldman MB, Mitchell CP. (2004) What Is the Functional Significance of Hippocampal Pathology in Schizophrenia? *Schizophrenia Bulletin*, 30: 367-392.
- González-Castro TB, Martínez-Magaña JJ, Tovilla-Zárate CA, Juárez-Rojop IE, Sarmiento E, Genis-Mendoza AD, Nicolini H. (2019) Gene-level genome-wide

- association analysis of suicide attempt, a preliminary study in a psychiatric Mexican population. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 7: e983.
- Gross CG. (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature Reviews Neuroscience*, 1: 67-73.
- Grunwald L-M, Stock R, Haag K, Buckenmaier S, Eberle M-C, Wildgruber D, Storchak H, Kriebel M, Weißgraeber S, Mathew L, Singh Y, Loos M, Li KW, Kraushaar U, Fallgatter AJ, Volkmer H. (2019) Comparative characterization of human induced pluripotent stem cells (hiPSC) derived from patients with schizophrenia and autism. *Translational Psychiatry*, 9: 179.
- Haeckel E. *Natürliche Schöpfungsgeschichte: Gemeinverständliche wissenschaftliche Vorträge über die Entwicklungslehre im Allgemeinen und diejenige von Darwin, Goethe, und Lamarck im Besonderen.* Walter De Gruyter Incorporated 1868.
- Hashimoto-Torii K, Torii M, Fujimoto M, Nakai A, El Fatimy R, Mezger V, Ju MJ, Ishii S, Chao SH, Brennand KJ, Gage FH, Rakic P. (2014) Roles of heat shock factor 1 in neuronal response to fetal environmental risks and its relevance to brain disorders. *Neuron*, 82: 560-572.
- Hathy E, Kalman S, Apati A, Nemoda Z, Rethelyi JM. (2016) [Modeling neurological and psychiatric disorders in vitro using induced pluripotent stem cells: highlighting findings in Alzheimer's disease and schizophrenia]. *Neuropsychopharmacol Hung*, 18: 188-198.
- Hathy E, Szabó E, Varga N, Erdei Z, Tordai C, Czehlár B, Baradits M, Jezsó B, Koller J, Nagy L, Molnár MJ, Homolya L, Nemoda Z, Apáti Á, Réthelyi JM. (2020) Investigation of de novo mutations in a schizophrenia case-parent trio by induced pluripotent stem cell-based in vitro disease modeling: convergence of schizophrenia- and autism-related cellular phenotypes. *Stem Cell Res Ther*, 11: 504.
- Hathy E, Szabó E, Vincze K, Haltrich I, Kiss E, Varga N, Erdei Z, Várady G, Homolya L, Apáti Á, Réthelyi JM. (2021) Generation of multiple iPSC clones from a male schizophrenia patient carrying de novo mutations in genes KHSRP, LRRC7, and KIR2DL1, and his parents. *Stem Cell Research*, 51: 102140.

- He E, Lozano MAG, Stringer S, Watanabe K, Sakamoto K, den Oudsten F, Koopmans F, Giamberardino SN, Hammerschlag A, Cornelisse LN, Li KW, van Weering J, Posthuma D, Smit AB, Sullivan PF, Verhage M. (2018) MIR137 schizophrenia-associated locus controls synaptic function by regulating synaptogenesis, synapse maturation and synaptic transmission. *Human Molecular Genetics*, 27: 1879-1891.
- Henriksen MG, Nordgaard J, Jansson LB. (2017) Genetics of Schizophrenia: Overview of Methods, Findings and Limitations. *Front Hum Neurosci*, 11: 322.
- Ho BX, Pek NMQ, Soh B-S. (2018) Disease Modeling Using 3D Organoids Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *International journal of molecular sciences*, 19: 936.
- Hoffmann A, Ziller M, Spengler D. (2020) Focus on Causality in ESC/iPSC-Based Modeling of Psychiatric Disorders. *Cells*, 9: 366.
- Ishii T, Ishikawa M, Fujimori K, Maeda T, Kushima I, Arioka Y, Mori D, Nakatake Y, Yamagata B, Nio S, Kato TA, Yang N, Wernig M, Kanba S, Mimura M, Ozaki N, Okano H. (2019) In Vitro Modeling of the Bipolar Disorder and Schizophrenia Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells with Copy Number Variations of PCDH15 and RELN. *eNeuro*, 6.
- Kahn RS, Keefe RS. (2013) Schizophrenia is a cognitive illness: time for a change in focus. *JAMA Psychiatry*, 70: 1107-1112.
- Kálmán S, Hathy E, Réthelyi JM. (2016) A Dishful of a Troubled Mind: Induced Pluripotent Stem Cells in Psychiatric Research. *Stem Cells International*, 2016: 7909176.
- Kang E, Wen Z, Song H, Christian KM, Ming G-L. (2016) Adult Neurogenesis and Psychiatric Disorders. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8: a019026.
- Kao HT, Li P, Chao HM, Janoschka S, Pham K, Feng J, McEwen BS, Greengard P, Pieribone VA, Porton B. (2008) Early involvement of synapsin III in neural progenitor cell development in the adult hippocampus. *J Comp Neurol*, 507: 1860-1870.
- Kempermann G, Fabel K, Ehninger D, Babu H, Leal-Galicia P, Garthe A, Wolf S. (2010) Why and How Physical Activity Promotes Experience-Induced Brain Plasticity. *Frontiers in Neuroscience*, 4: 189.

- Képiró M, Várkuti BH, Végner L, Vörös G, Hegyi G, Varga M, Málnási-Csizmadia A. (2014) para-Nitroblebbistatin, the non-cytotoxic and photostable myosin II inhibitor. *Angew Chem Int Ed Engl*, 53: 8211-8215.
- Koch P, Opitz T, Steinbeck JA, Ladewig J, Brüstle O. (2009) A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 3225-3230.
- Kohler E, Cowan C, Chatterjee I, Malik A, Wary K. (2011) NANOG induction of fetal liver kinase-1 (FLK1) transcription regulates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Blood*, 117: 1761-1769.
- Konick LC, Friedman L. (2001) Meta-analysis of thalamic size in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 49: 28-38.
- Kozubenko N, Turnovcova K, Kapcalova M, Butenko O, Anderova M, Rusnakova V, Kubista M, Hampl A, Jendelova P, Sykova E. (2010) Analysis of in vitro and in vivo characteristics of human embryonic stem cell-derived neural precursors. *Cell Transplant*, 19: 471-486.
- Kumarasinghe N, Tooney PA, Schall U. (2012) Finding the needle in the haystack: a review of microarray gene expression research into schizophrenia. *Aust N Z J Psychiatry*, 46: 598-610.
- Lawrie SM, Abukmeil SS. (1998) Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry*, 172: 110-120.
- Lee IS, Carvalho CM, Douvaras P, Ho SM, Hartley BJ, Zuccherato LW, Ladran IG, Siegel AJ, McCarthy S, Malhotra D, Sebat J, Rapoport J, Fossati V, Lupski JR, Levy DL, Brennand KJ. (2015) Characterization of molecular and cellular phenotypes associated with a heterozygous CNTNAP2 deletion using patient-derived hiPSC neural cells. *NPJ Schizophr*, 1: 15019-.
- Lewis DA, Curley AA, Glausier JR, Volk DW. (2012) Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends in Neurosciences*, 35: 57-67.
- Liang C-C, Park AY, Guan J-L. (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2: 329-333.

- Liao Y, Wang J, Jaehnig EJ, Shi Z, Zhang B. (2019) WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res*, 47: W199-w205.
- Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH. (2004) Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44: 399-421.
- Lin M, Pedrosa E, Hrabovsky A, Chen J, Puliafito BR, Gilbert SR, Zheng D, Lachman HM. (2016) Integrative transcriptome network analysis of iPSC-derived neurons from schizophrenia and schizoaffective disorder patients with 22q11.2 deletion. *BMC Systems Biology*, 10: 105.
- Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR. (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*, 143: 527-539.
- Maxwell J, Socrates A, Glanville KP, Forti MD, Murray RM, Vassos E, O'Reilly PF. (2019) Investigating the role of behaviour in the genetic risk for schizophrenia. *bioRxiv*, doi:10.1101/611079: 611079.
- McNeill RV, Ziegler GC, Radtke F, Nieberler M, Lesch K-P, Kittel-Schneider S. (2020) Mental health dished up-the use of iPSC models in neuropsychiatric research. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 127: 1547-1568.
- Mertens J, Marchetto MC, Bardy C, Gage FH. (2016) Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, 17: 424-437.
- Mertens J, Wang Q-W, Kim Y, Yu DX, Pham S, Yang B, Zheng Y, Diffenderfer KE, Zhang J, Soltani S, Eames T, Schafer ST, Boyer L, Marchetto MC, Nurnberger JI, Calabrese JR, Ødegaard KJ, McCarthy MJ, Zandi PP, Alda M, Nievergelt CM, Pharmacogenomics of Bipolar Disorder S, Mi S, Brennand KJ, Kelsoe JR, Gage FH, Yao J. (2015) Differential responses to lithium in hyperexcitable neurons from patients with bipolar disorder. *Nature*, 527: 95-99.
- Mirescu C, Peters JD, Noiman L, Gould E. (2006) Sleep deprivation inhibits adult neurogenesis in the hippocampus by elevating glucocorticoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 19170.

- Misiak B, Ricceri L, Sasiadek MM. (2019) Transposable Elements and Their Epigenetic Regulation in Mental Disorders: Current Evidence in the Field. *Frontiers in genetics*, 10: 580-580.
- Muñoz-Sánchez J, Chánez-Cárdenas ME. (2019) The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol*, 39: 556-570.
- Murai K, Sun G, Ye P, Tian E, Yang S, Cui Q, Sun G, Trinh D, Sun O, Hong T, Wen Z, Kalkum M, Riggs AD, Song H, Ming G-l, Shi Y. (2016) The TLX-miR-219 cascade regulates neural stem cell proliferation in neurodevelopment and schizophrenia iPSC model. *Nature Communications*, 7: 10965.
- Nagy J, Kobolák J, Berzsenyi S, Ábrahám Z, Avci HX, Bock I, Bekes Z, Hodoscsek B, Chandrasekaran A, Téglási A, Dezső P, Koványi B, Vörös ET, Fodor L, Szél T, Németh K, Balázs A, Dinnyés A, Lendvai B, Lévy G, Román V. (2017) Altered neurite morphology and cholinergic function of induced pluripotent stem cell-derived neurons from a patient with Kleefstra syndrome and autism. *Transl Psychiatry*, 7: e1179.
- Nelson MD, Saykin AJ, Flashman LA, Riordan HJ. (1998) Hippocampal Volume Reduction in Schizophrenia as Assessed by Magnetic Resonance Imaging: A Meta-analytic Study. *Archives of General Psychiatry*, 55: 433-440.
- Nussbaum AM. *The pocket guide to the DSM-5 diagnostic exam*, 2013.
- Owen MJ, O'Donovan MC. (2017) Schizophrenia and the neurodevelopmental continuum:evidence from genomics. *World Psychiatry*, 16: 227-235.
- Pak C, Danko T, Zhang Y, Aoto J, Anderson G, Maxeiner S, Yi F, Wernig M, Südhof TC. (2015) Human Neuropsychiatric Disease Modeling using Conditional Deletion Reveals Synaptic Transmission Defects Caused by Heterozygous Mutations in NRXN1. *Cell Stem Cell*, 17: 316-328.
- Parmar M, Grealish S, Henchcliffe C. (2020) The future of stem cell therapies for Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 21: 1-13.
- Paulsen Bda S, de Moraes Maciel R, Galina A, Souza da Silveira M, dos Santos Souza C, Drummond H, Nascimento Pozzatto E, Silva H, Jr., Chicaybam L, Massuda R, Setti-Perdigão P, Bonamino M, Belmonte-de-Abreu PS, Castro NG, Brentani H, Rehen SK. (2012) Altered oxygen metabolism associated to neurogenesis of



- induced pluripotent stem cells derived from a schizophrenic patient. *Cell Transplant*, 21: 1547-1559.
- Pedrosa E, Sandler V, Shah A, Carroll R, Chang C, Rockowitz S, Guo X, Zheng D, Lachman HM. (2011) Development of patient-specific neurons in schizophrenia using induced pluripotent stem cells. *J Neurogenet*, 25: 88-103.
- Péntek A, Pászty K, Apáti Á. (2016) Analysis of Intracellular Calcium Signaling in Human Embryonic Stem Cells. *Methods Mol Biol*, 1307: 141-147.
- Rajarajan P, Borrman T, Liao W, Schrode N, Flaherty E, Casiño C, Powell S, Yashaswini C, LaMarca EA, Kassim B, Javidfar B, Espeso-Gil S, Li A, Won H, Geschwind DH, Ho SM, MacDonald M, Hoffman GE, Roussos P, Zhang B, Hahn CG, Weng Z, Brennand KJ, Akbarian S. (2018) Neuron-specific signatures in the chromosomal connectome associated with schizophrenia risk. *Science*, 362.
- Rapoport JL, Giedd JN, Gogtay N. (2012) Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012. *Molecular psychiatry*, 17: 1228-1238.
- Reif A, Rösler M, Freitag CM, Schneider M, Eujen A, Kissling C, Wenzler D, Jacob CP, Retz-Junginger P, Thome J, Lesch KP, Retz W. (2007) Nature and nurture predispose to violent behavior: serotonergic genes and adverse childhood environment. *Neuropsychopharmacology*, 32: 2375-2383.
- Réthelyi J, Sawalhe AD. (2011) [Comorbidity of metabolic syndrome, diabetes and schizophrenia: theoretical and practical considerations]. *Orv Hetil*, 152: 505-511.
- Réthelyi JM, Benkovits J, Bitter I. (2013) Genes and environments in schizophrenia: The different pieces of a manifold puzzle. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37: 2424-2437.
- Revest JM, Dupret D, Koehl M, Funk-Reiter C, Grosjean N, Piazza PV, Abrous DN. (2009) Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol Psychiatry*, 14: 959-967.
- Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, Moran JL, Kähler AK, Akterin S, Bergen SE, Collins AL, Crowley JJ, Fromer M, Kim Y, Lee SH, Magnusson PK, Sanchez N, Stahl EA, Williams S, Wray NR, Xia K, Bettella F, Borglum AD, Bulik-Sullivan BK, Cormican P, Craddock N, de Leeuw C, Durmishi N, Gill M,

Golimbet V, Hamshere ML, Holmans P, Hougaard DM, Kendler KS, Lin K, Morris DW, Mors O, Mortensen PB, Neale BM, O'Neill FA, Owen MJ, Milovancevic MP, Posthuma D, Powell J, Richards AL, Riley BP, Ruderfer D, Rujescu D, Sigurdsson E, Silagadze T, Smit AB, Stefansson H, Steinberg S, Suvisaari J, Tosato S, Verhage M, Walters JT, Levinson DF, Gejman PV, Kendler KS, Laurent C, Mowry BJ, O'Donovan MC, Owen MJ, Pulver AE, Riley BP, Schwab SG, Wildenauer DB, Dudbridge F, Holmans P, Shi J, Albus M, Alexander M, Campion D, Cohen D, Dikeos D, Duan J, Eichhammer P, Godard S, Hansen M, Lerer FB, Liang KY, Maier W, Mallet J, Nertney DA, Nestadt G, Norton N, O'Neill FA, Papadimitriou GN, Ribble R, Sanders AR, Silverman JM, Walsh D, Williams NM, Wormley B, Arranz MJ, Bakker S, Bender S, Bramon E, Collier D, Crespo-Facorro B, Hall J, Iyegbe C, Jablensky A, Kahn RS, Kalaydjieva L, Lawrie S, Lewis CM, Lin K, Linszen DH, Mata I, McIntosh A, Murray RM, Ophoff RA, Powell J, Rujescu D, Van Os J, Walshe M, Weisbrod M, Wiersma D, Donnelly P, Barroso I, Blackwell JM, Bramon E, Brown MA, Casas JP, Corvin AP, Deloukas P, Duncanson A, Jankowski J, Markus HS, Mathew CG, Palmer CN, Plomin R, Rautanen A, Sawcer SJ, Trembath RC, Viswanathan AC, Wood NW, Spencer CC, Band G, Bellenguez C, Freeman C, Hellenthal G, Giannoulatou E, Pirinen M, Pearson RD, Strange A, Su Z, Vukcevic D, Donnelly P, Langford C, Hunt SE, Edkins S, Gwilliam R, Blackburn H, Bumpstead SJ, Dronov S, Gillman M, Gray E, Hammond N, Jayakumar A, McCann OT, Liddle J, Potter SC, Ravindrarajah R, Ricketts M, Tashakkori-Ghanbaria A, Waller MJ, Weston P, Widaa S, Whittaker P, Barroso I, Deloukas P, Mathew CG, Blackwell JM, Brown MA, Corvin AP, McCarthy MI, Spencer CC, Bramon E, Corvin AP, O'Donovan MC, Stefansson K, Scolnick E, Purcell S, McCarroll SA, Sklar P, Hultman CM, Sullivan PF. (2013) Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nat Genet*, 45: 1150-1159.

Ripke S, Sanders AR, Kendler KS, Levinson DF, Sklar P, Holmans P, Lin DY, Duan J, Ophoff RA, Andreassen O, Scolnick E, Cichon S, Clair DS, Corvin A, Gurling H, Werge T, Rujescu D, Blackwood D, Pato C, Psychiat G. (2011) Genome-

- wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nature genetics*, 43.
- Robicsek O, Ene HM, Karry R, Ytzhaki O, Asor E, McPhie D, Cohen BM, Ben-Yehuda R, Weiner I, Ben-Shachar D. (2018) Isolated Mitochondria Transfer Improves Neuronal Differentiation of Schizophrenia-Derived Induced Pluripotent Stem Cells and Rescues Deficits in a Rat Model of the Disorder. *Schizophr Bull*, 44: 432-442.
- Robicsek O, Karry R, Petit I, Salman-Kesner N, Müller FJ, Klein E, Aberdam D, Ben-Shachar D. (2013) Abnormal neuronal differentiation and mitochondrial dysfunction in hair follicle-derived induced pluripotent stem cells of schizophrenia patients. *Mol Psychiatry*, 18: 1067-1076.
- Rose T, Goltstein PM, Portugues R, Griesbeck O. (2014) Putting a finishing touch on GECIs. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7: 88.
- Russo N, Nicol T, Trommer B, Zecker S, Kraus N. (2009) Brainstem transcription of speech is disrupted in children with autism spectrum disorders. *Dev Sci*, 12: 557-567.
- Sadock BJ, Sadock BJ, Sadock VA, Ruiz P. Kaplan & Sadock's synopsis of psychiatry : behavioral sciences/clinical psychiatry. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2015.
- Schrode N, Ho SM, Yamamuro K, Dobbyn A, Huckins L, Matos MR, Cheng E, Deans PJM, Flaherty E, Barretto N, Topol A, Alganem K, Abadali S, Gregory J, Hoelzli E, Phatnani H, Singh V, Girish D, Aronow B, McCullumsmith R, Hoffman GE, Stahl EA, Morishita H, Sklar P, Brennand KJ. (2019) Synergistic effects of common schizophrenia risk variants. *Nat Genet*, 51: 1475-1485.
- Schwamborn JC. (2018) Is Parkinson's Disease a Neurodevelopmental Disorder and Will Brain Organoids Help Us to Understand It? *Stem Cells and Development*, 27: 968-975.
- Shcheglovitov A, Shcheglovitova O, Yazawa M, Portmann T, Shu R, Sebastiano V, Krawisz A, Froehlich W, Bernstein JA, Hallmayer JF, Dolmetsch RE. (2013) SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature*, 503: 267-271.

- Shi J, Levinson DF, Duan J, Sanders AR, Zheng Y, Pe'er I, Dudbridge F, Holmans PA, Whittemore AS, Mowry BJ, Olincy A, Amin F, Cloninger CR, Silverman JM, Buccola NG, Byerley WF, Black DW, Crowe RR, Oksenberg JR, Mirel DB, Kendler KS, Freedman R, Gejman PV. (2009) Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature*, 460: 753-757.
- Singh SP, Grange T. (2006) Measuring pathways to care in first-episode psychosis: A systematic review. *Schizophrenia Research*, 81: 75-82.
- Song M, Yang X, Ren X, Maliskova L, Li B, Jones IR, Wang C, Jacob F, Wu K, Traglia M, Tam TW, Jamieson K, Lu S-Y, Ming G-L, Li Y, Yao J, Weiss LA, Dixon JR, Judge LM, Conklin BR, Song H, Gan L, Shen Y. (2019) Mapping cis-regulatory chromatin contacts in neural cells links neuropsychiatric disorder risk variants to target genes. *Nature genetics*, 51: 1252-1262.
- Srikanth P, Han K, Callahan DG, Makovkina E, Muratore CR, Lalli MA, Zhou H, Boyd JD, Kosik KS, Selkoe DJ, Young-Pearse TL. (2015) Genomic DISC1 Disruption in hiPSCs Alters Wnt Signaling and Neural Cell Fate. *Cell Rep*, 12: 1414-1429.
- Srikanth P, Lagomarsino VN, Pearse RV, 2nd, Liao M, Ghosh S, Nehme R, Seyfried N, Eggan K, Young-Pearse TL. (2018) Convergence of independent DISC1 mutations on impaired neurite growth via decreased UNC5D expression. *Transl Psychiatry*, 8: 245.
- Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D, Werge T, Pietiläinen OP, Mors O, Mortensen PB, Sigurdsson E, Gustafsson O, Nyegaard M, Tuulio-Henriksson A, Ingason A, Hansen T, Suvisaari J, Lonnqvist J, Paunio T, Børglum AD, Hartmann A, Fink-Jensen A, Nordentoft M, Hougaard D, Norgaard-Pedersen B, Böttcher Y, Olesen J, Breuer R, Möller HJ, Giegling I, Rasmussen HB, Timm S, Mattheisen M, Bitter I, Réthelyi JM, Magnusdottir BB, Sigmundsson T, Olason P, Masson G, Gulcher JR, Haraldsson M, Fossdal R, Thorgeirsson TE, Thorsteinsdottir U, Ruggeri M, Tosato S, Franke B, Strengman E, Kiemeny LA, Melle I, Djurovic S, Abramova L, Kaleda V, Sanjuan J, de Frutos R, Bramon E, Vassos E, Fraser G, Ettinger U, Picchioni M, Walker N, Touloupoulou T, Need AC, Ge D, Yoon JL, Shianna KV, Freimer NB, Cantor RM, Murray R, Kong A, Golimbet V, Carracedo A, Arango C, Costas J, Jönsson EG, Terenius L, Agartz I, Petursson

- H, Nöthen MM, Rietschel M, Matthews PM, Muglia P, Peltonen L, St Clair D, Goldstein DB, Stefansson K, Collier DA. (2009) Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature*, 460: 744-747.
- Stefansson H, Rujescu D, Cichon S, Pietiläinen OP, Ingason A, Steinberg S, Fossdal R, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Buizer-Voskamp JE, Hansen T, Jakobsen KD, Muglia P, Francks C, Matthews PM, Gylfason A, Halldorsson BV, Gudbjartsson D, Thorgeirsson TE, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Bjornsson A, Mattiasdottir S, Blondal T, Haraldsson M, Magnusdottir BB, Giegling I, Möller HJ, Hartmann A, Shianna KV, Ge D, Need AC, Crombie C, Fraser G, Walker N, Lonnqvist J, Suvisaari J, Tuulio-Henriksson A, Paunio T, Toulopoulou T, Bramon E, Di Forti M, Murray R, Ruggeri M, Vassos E, Tosato S, Walshe M, Li T, Vasilescu C, Mühleisen TW, Wang AG, Ullum H, Djurovic S, Melle I, Olesen J, Kiemeny LA, Franke B, Sabatti C, Freimer NB, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Andreassen OA, Ophoff RA, Georgi A, Rietschel M, Werge T, Petursson H, Goldstein DB, Nöthen MM, Peltonen L, Collier DA, St Clair D, Stefansson K. (2008) Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature*, 455: 232-236.
- Sullivan LB, Chandel NS. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab*, 2: 17.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. (2007) Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131: 861-872.
- Takahashi K, Yamanaka S. (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126: 663-676.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147.
- Topol A, Zhu S, Hartley BJ, English J, Hauberg ME, Tran N, Rittenhouse CA, Simone A, Ruderfer DM, Johnson J, Readhead B, Hadas Y, Gochman PA, Wang Y-C, Shah H, Cagney G, Rapoport J, Gage FH, Dudley JT, Sklar P, Mattheisen M, Cotter D, Fang G, Brennand KJ. (2016) Dysregulation of miRNA-9 in a Subset

- of Schizophrenia Patient-Derived Neural Progenitor Cells. *Cell reports*, 15: 1024-1036.
- Topol A, Zhu S, Tran N, Simone A, Fang G, Brennand KJ. (2015) Altered WNT Signaling in Human Induced Pluripotent Stem Cell Neural Progenitor Cells Derived from Four Schizophrenia Patients. *Biol Psychiatry*, 78: e29-34.
- Toth AB, Shum AK, Prakriya M. (2016) Regulation of neurogenesis by calcium signaling. *Cell Calcium*, 59: 124-134.
- Toyoshima M, Akamatsu W, Okada Y, Ohnishi T, Balan S, Hisano Y, Iwayama Y, Toyota T, Matsumoto T, Itasaka N, Sugiyama S, Tanaka M, Yano M, Dean B, Okano H, Yoshikawa T. (2016) Analysis of induced pluripotent stem cells carrying 22q11.2 deletion. *Translational Psychiatry*, 6: e934-e934.
- Tringer L. *A pszichiátria tankönyve : egyetemi tankönyv*. Semmelweis, Budapest, 2010.
- Uher F. *Őssejt-biológia*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2017.
- van Os J, Kapur S. (2009) Schizophrenia. *Lancet*, 374: 635-645.
- Viero C, Forostyak O, Sykova E, Dayanithi G. (2014) Getting it right before transplantation: example of a stem cell model with regenerative potential for the CNS. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2: 36.
- Vőfély G, Berecz T, Szabó E, Szebényi K, Hathy E, Orbán TI, Sarkadi B, Homolya L, Marchetto MC, Réthelyi JM, Apáti Á. (2018) Characterization of calcium signals in human induced pluripotent stem cell-derived dentate gyrus neuronal progenitors and mature neurons, stably expressing an advanced calcium indicator protein. *Mol Cell Neurosci*, 88: 222-230.
- Wang X, Ye F, Wen Z, Guo Z, Yu C, Huang WK, Rojas Ringeling F, Su Y, Zheng W, Zhou G, Christian KM, Song H, Zhang M, Ming GL. (2019) Structural interaction between DISC1 and ATF4 underlying transcriptional and synaptic dysregulation in an iPSC model of mental disorders. *Mol Psychiatry*, doi:10.1038/s41380-019-0485-2.
- Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A, Katayama T, Nozaki S, Kawasaki H, Watanabe Y, Mizuseki K, Sasai Y. (2005) Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci*, 8: 288-296.
- Wen Z, Nguyen HN, Guo Z, Lalli MA, Wang X, Su Y, Kim N-S, Yoon K-J, Shin J, Zhang C, Makri G, Nauen D, Yu H, Guzman E, Chiang C-H, Yoritomo N,

- Kaibuchi K, Zou J, Christian KM, Cheng L, Ross CA, Margolis RL, Chen G, Kosik KS, Song H, Ming G-l. (2014) Synaptic dysregulation in a human iPS cell model of mental disorders. *Nature*, 515: 414-418.
- Wen Z, Nguyen HN, Guo Z, Lalli MA, Wang X, Su Y, Kim NS, Yoon KJ, Shin J, Zhang C, Makri G, Nauen D, Yu H, Guzman E, Chiang CH, Yoritomo N, Kaibuchi K, Zou J, Christian KM, Cheng L, Ross CA, Margolis RL, Chen G, Kosik KS, Song H, Ming GL. (2014) Synaptic dysregulation in a human iPS cell model of mental disorders. *Nature*, 515: 414-418.
- Won H, de la Torre-Ubieta L, Stein JL, Parikshak NN, Huang J, Opland CK, Gandal MJ, Sutton GJ, Hormozdiari F, Lu D, Lee C, Eskin E, Voineagu I, Ernst J, Geschwind DH. (2016) Chromosome conformation elucidates regulatory relationships in developing human brain. *Nature*, 538: 523-527.
- Woodson W, Nitecka L, Ben-Ari Y. (1989) Organization of the GABAergic system in the rat hippocampal formation: a quantitative immunocytochemical study. *J Comp Neurol*, 280: 254-271.
- Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM, Bullmore ET. (2000) Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 157: 16-25.
- Wu J, Lim E-C, Nadkarni NV, Tan E-K, Kumar PM. (2019) The impact of levodopa therapy-induced complications on quality of life in Parkinson's disease patients in Singapore. *Scientific reports*, 9: 9248-9248.
- Yamanaka S. (2009) A Fresh Look at iPS Cells. *Cell*, 137: 13-17.
- Yamanaka S. (2010) Patient-specific pluripotent stem cells become even more accessible. *Cell Stem Cell*, 7: 1-2.
- Ye F, Kang E, Yu C, Qian X, Jacob F, Yu C, Mao M, Poon RYC, Kim J, Song H, Ming G-l, Zhang M. (2017) DISC1 Regulates Neurogenesis via Modulating Kinetochore Attachment of Ndel1/Ndel during Mitosis. *Neuron*, 96: 1041-1054.e1045.
- Yi F, Danko T, Botelho SC, Patzke C, Pak C, Wernig M, Südhof TC. (2016) Autism-associated SHANK3 haploinsufficiency causes Ih channelopathy in human neurons. *Science*, 352: aaf2669.

- Yoon KJ, Nguyen HN, Ursini G, Zhang F, Kim NS, Wen Z, Makri G, Nauen D, Shin JH, Park Y, Chung R, Pekle E, Zhang C, Towe M, Hussaini SM, Lee Y, Rujescu D, St Clair D, Kleinman JE, Hyde TM, Krauss G, Christian KM, Rapoport JL, Weinberger DR, Song H, Ming GL. (2014) Modeling a genetic risk for schizophrenia in iPSCs and mice reveals neural stem cell deficits associated with adherens junctions and polarity. *Cell Stem Cell*, 15: 79-91.
- Yu DX, Di Giorgio FP, Yao J, Marchetto MC, Brennand K, Wright R, Mei A, McHenry L, Lisuk D, Grasmick JM, Silberman P, Silberman G, Jappelli R, Gage FH. (2014) Modeling hippocampal neurogenesis using human pluripotent stem cells. *Stem cell reports*, 2: 295-310.
- Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. (2019) Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 10: 68.
- Zeltner N, Studer L. (2015) Pluripotent stem cell-based disease modeling: current hurdles and future promise. *Current Opinion in Cell Biology*, 37: 102-110.
- Zhao D, Lin M, Chen J, Pedrosa E, Hrabovsky A, Fourcade HM, Zheng D, Lachman HM. (2015) MicroRNA Profiling of Neurons Generated Using Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Patients with Schizophrenia and Schizoaffective Disorder, and 22q11.2 Del. *PLoS One*, 10: e0132387.



## 10. Saját publikációk jegyzéke

### A disszertáció alapjául szolgáló cikkek:

1. Vőfély G, Berecz T, Szabó E, Szebényi K, Hathy E, Orbán TI, Sarkadi B, Homolya L, Marchetto MC, Réthelyi JM, Apáti Á. (2018) *Characterization of calcium signals in human induced pluripotent stem cell-derived dentate gyrus neuronal progenitors and mature neurons, stably expressing an advanced calcium indicator protein.* Mol Cell Neurosci, 88: 222-230., doi: 10.1016/j.mcn.2018.02.003
2. Hathy E, Szabó E, Varga N, Erdei Z, Tordai C, Czehlár B, Baradits M, Jezsó B, Koller J, Nagy L, Molnár MJ, Homolya L, Nemoda Z, Apáti Á, Réthelyi JM. (2020) *Investigation of de novo mutations in a schizophrenia case-parent trio by induced pluripotent stem cell-based in vitro disease modeling: convergence of schizophrenia- and autism-related cellular phenotypes.* Stem Cell Res Ther, 11: 504., doi: 10.1186/s13287-020-01980-5
3. Hathy E, Szabó E, Vincze K, Haltrich I, Kiss E, Varga N, Erdei Z, Várady G, Homolya L, Apáti Á, Réthelyi JM. (2021) *Generation of multiple iPSC clones from a male schizophrenia patient carrying de novo mutations in genes KHSRP, LRRC7, and KIR2DL1, and his parents.* Stem Cell Research, 51: 102140., doi.org: 10.1016/j.scr.2020.102140

### Disszertáció témájához kapcsolódó cikkek:

4. Hathy E, Kalman S, Apati A, Nemoda Z, Rethelyi JM. (2016) *Modeling neurological and psychiatric disorders in vitro using induced pluripotent stem cells: highlighting findings in Alzheimer's disease and schizophrenia.* Neuropsychopharmacol Hung, 18: 188-198.
5. Kálmán S, Hathy E, Réthelyi JM. (2016) *A Dishful of a Troubled Mind: Induced Pluripotent Stem Cells in Psychiatric Research.* Stem Cells International, 2016: 7909176., doi.org/10.1155/2016/7909176

6. Szabó E, Juhász F, Hathy E, Reé D, Homolya L, Erdei Z, Réthelyi JM, Apáti Á. (2020) Functional Comparison of Blood-Derived Human Neural Progenitor Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 9118., doi.org/10.3390/ijms21239118

**A disszertáció témájához nem kapcsolódó publikáció:**

7. Vető B, Szabó P, Bacquet C, Apró A, Hathy E, Kiss J, Réthelyi JM, Szeri F, Szüts D, Arányi T. (2018) Inhibition of DNA methyltransferase leads to increased genomic 5-hydroxymethylcytosine levels in hematopoietic cells. *FEBS open bio*, 8: 584-592., doi.org/10.1002/2211-5463.12392

## 11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani családomnak, hogy folyamatosan biztosítottak támogatásukról és szeretetükről. Meghallgatták örömeimet, bánatomat és tanácsaikkal segítettek az elém gördülő helyzetek és akadályok megoldását. Támaszt nyújtottak a nehezebb időszakokban és megteremtették a körülményt és lehetőséget, hogy elérjem céljaimat és elkészüljön ez a dolgozat.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Réthelyi Jánosnak, témavezetőmnek és Dr. Apáti Ágotának, laborvezetőmnek, hogy szakmai fejlődésemhez tudást és támogatást biztosítottak. Formálták szemléletemet. Szeretném megköszönni a belföldi és külföldi konferenciákon való részvételek lehetőségének megteremtését. Köszönöm az emberileg is fontos tapasztalatokat.

Köszönöm Ágotának az összejtekkel kapcsolatos tudást és a befogadást az Őssejtlaborba.

Szeretném megköszönni tiszteletbeli témavezetőmnek Dr. Nemoda Zsófiának a kimeríthetetlen precíz szakmai és emberi támogatást.

Köszönettel tartozom az Őssejtlabor összes egykori és mostani munkatársának az együtt töltött évekért, beszélgetésekért, társasjátékozásért és családias légkörért. Számomra Mindannyian kiemelten fontosak: Adri, Bálint, Bea, Csongor, Dóri, Eszter, Gábor, Gergő, Gyöngyi, Kata, Nelli, Nóri, Szilvi, Tündi, Zsuzsi, Sára. Köszönöm segítségüket, munkájukat, áldozataikat, segítő kritikájukat, támogatásukat. Szerves és nélkülözhetetlen részeként járultak hozzá fejlődésemhez, szakmailag éppúgy, mint emberileg.

Szeretném megköszönni az Enzimológia Intézet munkatársainak, név szerint: Anitának, Editnek, Gyurinak, Julinak, Katának, Nelinek, Orsinak, Zolinak szakmai tanácsait és segítségét.