

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

Doktori tézisek

**Hathy Edit Margit**

Semmelweis Egyetem  
Mentális Egészségtudományok Doktori Iskola  
Pszichiátria program



Témavezető:

Dr. Réthelyi János egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Adorján István adjunktus

Dr. Kobilák 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

## Bevezetés

A pszichiátriai zavarok, mint például a szkizofrénia, a bipoláris affektív zavar, szorongásos zavarok, vagy a major depresszió a lakosság jelentős hányadát érintő betegségek, együttes élettartam prevalenciájuk majdnem 50%, ezért népegészségügyi szempontból kiemelt jelentőségűek. A pszichiátriai zavarok jellemzően multifaktorális etiológiával rendelkeznek, genetikai hátterük komplex, kockázati tényezők komplex háttérrel rendelkeznek, csak részlegesen ismertek a betegségekre ható környezeti (ún. „trigger”) faktorok, és egyelőre nincsenek megbízható biomarkereik sem.

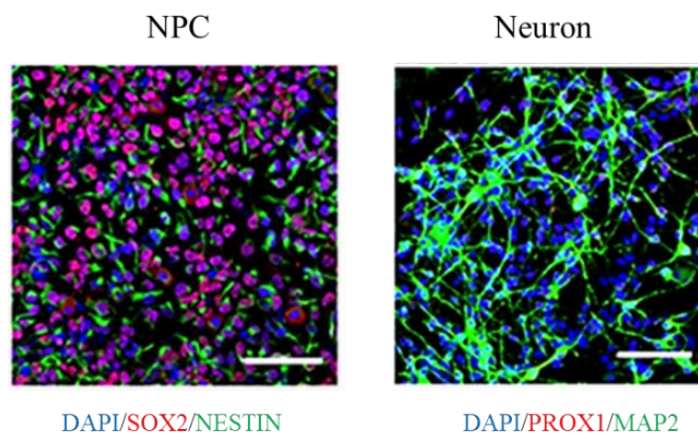
A szkizofrénia (SZ) és más pszichiátriai zavarok molekuláris patogenezisének felderítésére leginkább *post mortem* agyminták vagy állatmodellek szolgálnak eszközül, ugyanis *ex vivo* kísérletet nem végezhető, biopsziás agyminták nem állnak rendelkezésre. A *post mortem* minták egyfelől korlátozott mértékben hozzáférhető forrást jelentenek, másfelől a betegség végállapotára jellemző elváltozásokat, jellegeket viselnek, így csak egy pillanatfelvételnként szolgálhatnak a betegség megismerésében. Eredményeik értékelésénél figyelembe kell venni még a fehérje és RNS lebomlásának lehetőségét, továbbá a minták funkcionális vizsgálatokra nem alkalmasak. Állatmodellek segítségével 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 sejtbioológiai folyamatokkal vagy viselkedési endofenotípusokkal kapcsolatos kérdésekben.

Ezen modellrendszerek limitációinak áthidalására, valamint korábbi megfigyeléseinek kiegészítésére lehet alkalmas az indukált pluripotens őssejt (induced pluripotent stem cell, iPSC) alapú *in vitro* betegségmodellezés a pszichiátriai betegségek celluláris szintű vizsgálatában és feltárásában.

Az iPSC alapú betegségmodellezés központi gondolata, hogy betegek szomatikus sejtjeiből, például fibroblasztjaiból vagy fehérvérsejtjeiből létrehozott pluripotens sejtvonalak differenciáltatásával olyan molekuláris és funkcionális fenotípusokat tudunk vizsgálni, amely különbségeket mutathat egészséges kontroll személyekből létrehozott sejtvonalakhoz képest.

Továbbá ezek a fenotípusok előrébb vihetnek minket az *in vivo* folyamatok, molekuláris betegségútvonalak megértésében.

Az általunk használt *in vitro* betegségmodell szkizofrénia beteg-szülő trióból származó PBMC-k Sendai-vírus alapú visszaprogramozásával létrehozott iPSC-eket használt fel. A modell célja a *de novo* mutációk szkizofrénia kialakulásában való hatásának vizsgálata, az iPSC-ekből Yu és mtsai 2014-es publikációja alapján létrehozott a felnőttkori neurogenesisben érintett, a SZ szempontjából releváns PROX1-expresszáló humán *in vitro* neurális progenitorok és neuronok felhasználásával (1. ábra).



**1. ábra:** A létrehozott NPC-k és idegsejtek immuncitokémiai vizsgálata. Egy SOX2 (piros) és NESTIN (zöld) pozitív NPC vonal, valamint egy PROX1 (piros) és MAP2 (zöld) neuron kultúra reprezentatív fluoreszcens képe.

Beteg-szülő trió betegségmodell használatának előnye a közel azonos genetikai háttérű biológiai kontrollok alkalmazása. A teljes genom-szekvenálási technikák egyre szélesebb körben való elérésével számos egy családon belül két generáció között kialakuló *de novo* mutációkat is feltáró kutatás zajlik pszichiátriai betegségek esetében is. Azonban ezen kutatások a mutációk azonosításán túl, azok további hatásait általában nem vizsgálják. Rendszerünk újító jellege abban mutatkozik, hogy ettől a lépéstől folytatva, a feltáró kutatások eredményeire támaszkodva kíséreltük meg egy iPSC alapú szkizofrénia betegségmodellben vizsgálni a családban megjelenő *de novo* mutációk esetleges betegség-specifikus hatásait. Viszonylag kevés tanulmány alkalmazta az iPSC alapú betegség modellezést eset-szülő triók vagy családok esetére, ugyanakkor a családon belül érvényesülő genetikai hatásoknak vagy az egyik generációról a másikra megjelenő *de novo* mutációk vizsgálatának ez egy fontos eszköze lehet.

## Célkitűzések

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, neurális progenitorok, majd neuronok jönnek létre, amelyek a betegekben kialakult genetikai variánsokat hordozzák. Munkánk során egy beteg-szülő trióból alkotott *in vitro* betegségmodellrendszerben vizsgáltuk a *de novo* mutációk hatásait.

1. Célunk volt egy *in vitro* neuronális modellrendszer protokolljának beállítása kontroll vonalon, tesztrendszerben, továbbá hippokampális neurális progenitor sejtek létrehozása, PROX1 pozitív gyrus dentatus szemcsesejtek differenciáltatása.
2. Célunk volt egy neuronális vizsgálati panel megalkotása és beállítása, melyben a neurális prognitor sejtek és érett neuronok molekuláris és funkcionális jellemzőit tudjuk leírni.
3. Célunk volt *in vitro* szkizofrénia betegségmodell iPSC vonalainak létrehozása Sendai visszaprogramozási technikával perifériás mononukleáris sejteken alkalmazva egészséges (szülők, mint kontroll) és beteg (gyerek) egyénekből.
4. Célunk volt az *in vitro* szkizofrénia betegségmodell NPC és idegsejtjeinek differenciáltatása, molekuláris és funkcionális fenotípusainak vizsgálata és összehasonlítása, valamint a betegséghez köthető celluláris fenotípusok keresése.

## Anyagok és módszerek

*Kontroll sejtvonala, tesztrendszer:* Vizsgálati rendszerünk beállításához egy, a Salk Institute for Biological Studies genetikai laborjában, egészséges férfi fibroblasztjából, Sendai-vírus alapú rendszerrel visszaprogramozott kontroll iPSC-t használtunk.

*Betegségmodellben használt sejtvonala:* Kísérleteinkhez 4 humán alanyból származtatott sejtvonalaikat használtunk: egy szkizofrénia-ban szenvedő beteg (SZ-HU PROB, 2 klón) és szülei (SZ-HU-MO, 2 klón és SZ-HU-FA, 1 klón), azaz egy eset-szülő trió és egy független

egészséges kontroll (iPSC UCB2). A kiválasztott szkizofrén beteg 3 misszensz DNM hordozója: KHSRP (19:6416869C>A), LRRC7 (1:70505093G>A) és KIR2DL1 (19:55286658A>T) gének kódoló részeiben.

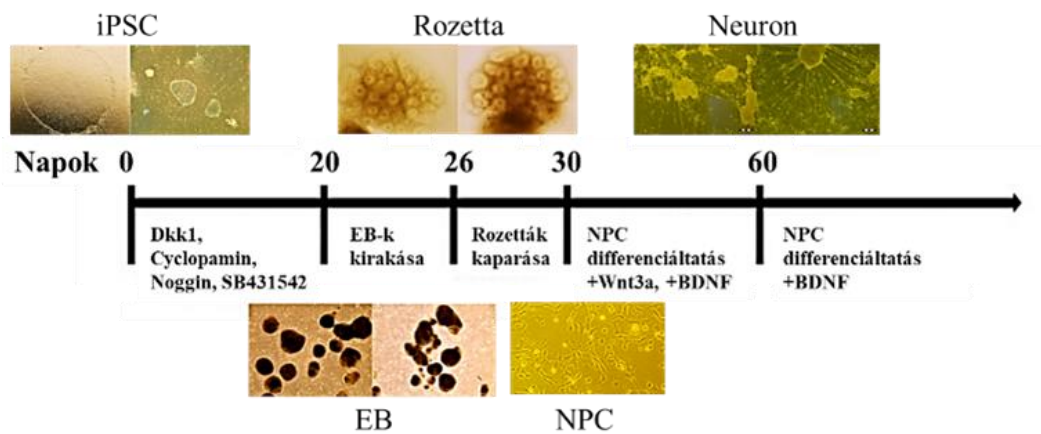
*Visszaprogramozás:* Az Egészségügyi Tudományos Tanács, Humán Reprodukciós Bizottság (ETTHR) engedélye alapján, engedély száma: 33873-3/2014-EHR és az érintettek írásbeli tájékoztatásával, beleegyezésével végeztük. Minden vérminta esetében a perifériás mononukleáris sejtek (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) izolálására alkalmas nátrium-heparinos csövekbe gyűjtöttük. A PBMC-eket 4 napig StemPro®-34 tápfolyadékban, 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) tenyésztettük. A 4. napon a PBMC-eket Sendai vírus kittel (Fusaki és mtsai 2009) transzdukáltuk (Thermo Fisher Cytotune 2.0). A transzdukciót után 2 nappal MEF sejtekkel bevont tenyésztőlemezen, citokinek nélküli StemPro®-34 tápközegbe helyeztük a sejteket. A transzdukciót követő 6. napon a tápfolyadékot fokozatosan HUES médiumra (KO-DMEM, kiegészítve 15% KO Serum Replacement-tel, 100 mM glutaminnal, 1% nem esszenciális aminosavak, 0,1 mM  $\beta$ -merkaptotanol és 4 ng/ml rekombináns humán fibroblaszt növekedési faktor (FGF2)) cseréltük.

*Áramlási citometria:* A méréseket Erdei és mtsai 2014-es cikkben közöltek szerint hajtottuk végre. A pluripotencia vizsgálatához SSEA4-PE-t, TRA1-60 és TRA1-81 ellenanyagokat és izotípus kontrolljaikat használtunk. A MEF jelölésére anti-egér Sca-1 (Ly-6A/E) -APC, antitestet alkalmaztunk. A TRA1-60 és a TRA1-81 esetében AlexaFluor-488 szekunder antitestként kecske anti-egér IgG-t, IgM-et (H + L). A halott sejtek kizárására Topro3-jodidot (1:300) használtunk. Az adatokat a FACS Aria III Cell Sorter segítségével gyűjtöttük és az FCS Express 6 szoftverrel elemeztük.

*Genetikai elemzés:* A kariotipizálást és a mikroszatellita, „apasági” (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-sávossal elemzésével vizsgálták. A kariotípusokat az International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2016) szerint írták le. Az iPSC klónokat STR elemzéssel a GenePrint® 10 rendszer segítségével ellenőrizték. Az iPSC-ekből genomi DNS-t (gDNS) izoláltunk Quick-DNA Miniprep Kit alkalmazásával. A Sanger szekvenálási reakciókat a 3130 Genetic Analyzer-rel hajtották végre.

*Spontán differenciációs vizsgálat:* A MEF-en tartott iPSC kolóniákat 3 lyuk/tenyésztőlemez mennyiségben felszedtünk kollagenázzal és az embriótestecskéket 20% FBS-sel, 1 mM glutaminnal, 1% nem esszenciális aminosavakkal és 0,1 mM  $\beta$ -merkaptoetanollal kiegészített KO-DMEM tápfolyadékban 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

*Neurális progenitorok és idegsejtek differenciáltatása:* Az iPSC-eket neurális progenitor sejtekké (NPC) Yu és mtsai által publikált protokollban leírt módon differenciáltattuk (2. ábra).



**2. ábra: Neurális progenitor és hippocampális gyrus dentatus neuronok differenciáltatási protokolljának összefoglaló idővonalis 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 köztes sejtípus tovább differenciáltható PROX1-expresszáló érett neuronokká aszkorbinsav, cAMP, Wnt3a és BDNF adásával.

*Immuncitokémia:* Az iPSC-ken MEF-fel bevont, valamint poliornitin-lamininnal bevont 8 lyukú kamrákra kirakott NPC-ken és belőlük az előzőekben leírt módon 5 hétig differenciáltatott GD neuronokon végeztük. A sejteket 4%-os paraformaldehiddel 15 percig szobahőmérsékleten fixáltuk, majd 1 órán át blokkoltuk DPBS-ben oldott 2 mg/ml szarvasmarha szérum albumint, 1% halzselatint, 5% kecskeszérumot és 0,1% Triton-X 100-at tartalmazó blokkoló oldatban. A pluripotens, NPC és neuron állapot markereinek elsődleges ellenanyagaival 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintákat. Majd DPBS-sel való mosás után a sejteket 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten a megfelelő másodlagos antitestekkel is. A magokat DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) magfestékkel jelöltük. A

minták feldolgozását és az eredmények kiértékelését Zeiss LSM 710 konfokális mikroszkóppal és ZEN 3.1 blue szoftverrel végeztük.

*Génexpressziós analízis:* Az iPSC-kből, az NPC-kből és az idegsejtekből a teljes RNS-t TRIzol™ reagenssel izoláltuk a gyártó utasításait követve. 1 µg RNS-ből a cDNS mintákat gyártói ajánlással a Promega Reverse Transcription System Kit segítségével nyertük ki. Valós idejű kvantitatív PCR-hoz TaqMan® esszéket használtuk. Az RT-PCR elemzéseket a gyártó utasításai szerint a StepOnePlus™ valós idejű PCR szoftverrel végeztük.

*RNS szekvenálási kísérletek:* Az RNS-szekvenálási kísérleteket a beteg-szülő trió betegségmodell esetén három-négyszeres ismétlésszámmal minden sejtvonal NPC állapotában, p7-12 passzázsszámon végeztük el. A minták szekvenálását és a könyvtár előkészítését az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Ltd (Debrecen) Illumina NextSeq 500 rendszerrel végezte. A szekvenálási adatok bioinformatikai elemzésének első lépéseként a humán 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 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.

*Kalcium-képző technika:* Kísérleteink során 2 nappal a kalcium mérést megelőzően az NPC-ket poliornitin-lamininnal bevont 8 lyukú kamrára tettük ki. A Fluo-4 Ca<sup>2+</sup> indikátor festékkel való töltéses vizsgálatokhoz az NPC-ket szérumentes tápfolyadékban oldott 1,0 µM Fluo-4 AM-mel 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<sub>2</sub>), amelyben később az összes mérést is végeztük. A ligand koncentrációkat az irodalmi adatok alapján választottuk meg: 100 µM ATP, 2,5 µg/ml tripszin, 100 µg/ml tripszin inhibitor, 10 µM lizofoszfátsav, 50 mM KCl, 50 µM glutamát. A kalibrációhoz 5 µM ionomycint, az alacsony extracelluláris Ca<sup>2+</sup>-szint eléréséhez pedig ötszörös feleslegben EGTA oldatot használtunk. A kísérleteket Ibidi fűtőrendszeren hajtottuk végre. A felvételeket ImageJ szoftverrel értékeltük ki

*Funkcionális fenotípus vizsgálatok:* Az NPC-k sejtproliferációs, sebzéses és neuritnövekedési tesztjét használtuk. A sejtproliferációs vizsgálatához 35.000 NPC-t 24 lyukú

tenyésztőlemezre 3 párhuzamossal 3 időpontos mérésre helyeztünk ki. Az NPC-eket 24 óránál és 2., 3., és 4. napon felszedve és propidium-jodiddal jelölve Attune áramlási citométeren 120 µl-es végtérfogatban mértük. A sebzéses tesztet Liang és mtsai 2007 nyomán végeztük. 6 lyukú tenyésztőlemezre 450.000 NPC-t tettünk ki. A konfluens állapot elérése után 5 ml-es szerológiai pipettaheggyel 3-3 párhuzamost húzva hoztuk létre a sebzéseket. A változást 24 és 48 óránál áteső fénymikroszkóppal rögzítettük. A neuritnövekedési kísérletekhez 96-os tenyésztőlemezekon lyukanként 3.500 NPC-t raktunk ki és töltöttünk meg 10 mM kalcein AM-mel, majd 2 óra elteltével a sejteket a nyúlványnövekedés ismert induktórával 10 µM para-nitroblebbisztatin (para-nitroblebbistatin, PNBS) oldattal, illetve kontrollként azoldószerével, DMSO-val kezeltük. A neuritok növekedését ImageXpress Micro XLS Widefield High-Content Analysis System-mel követtük nyomon és értékeltük.

*Oxidatív stressz és mitokondriális tesztek:* Az oxidatív stressztolerancia vizsgálatához sejtvonalanként hármassával 35.000 sejt/lyuk helyeztünk ki 48 lyukú tenyésztőlemezre. A konfluenssé vált tenyészeteken a tápfolyadékot 3 koncentrációban CoCl<sub>2</sub>-tartalmú médiumra váltottuk. 24 óra elteltével reoxigenizáltuk a tápközeget, normál tápfolyadékra cseréltük. Két nap múlva PrestoBlue hozzáadásával Enspire Multimode lemezolvasóval megmértük a sejtek viabilitását. Az NPC-k reaktív oxigéngyök (reactive oxygen species, ROS) szintjét CellROX kit alkalmazásával jellemeztük. 200.000 NPC-t 37°C-on 500-szoros hígítású CellROX oldattal 30 percig inkubáltuk, amelyet háromszoros PBS-es mosás követett. Ezután áramlási citometriával (Attune NxT Flow Cytometer) határoztuk meg és hasonlítottuk össze a jelölt sejtek átlagos fluoreszcencia jeleit. A halott sejteket propidium-jodidos jelöléssel kapuztuk ki. A neurális progenitor sejtek mitokondriumainak funkcióit Mitotracker festéssel jellemeztük. A konfluenssé vált kultúrákat 250 nM Mitotracker Red festékkel jelöltük. 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. A kiértékeléshez az ImageJ szoftvert használtuk.

## **Eredmények**

### *1. Tesztrendszer beállítása kontroll iPSC vonalon*

Az egészséges kontroll férfi személy fibroblasztjából létrehozott iPSC-kből adott protokoll alapján létrehoztunk NPC-eket, majd ezekből GD neuronokat differenciáltattunk. Sikeresen beállítottuk karakterizáló panelünket, amelyben iPSC-kre, NPC-kre és idegsejtekre jellemző markereket vizsgáló immuncitokémiai, génexpressziós és kalcium-képző vizsgálatokat



végeztünk.

## *2. Beteg-szülő trió összejtjeinek molekuláris jellemzése*

A trió esetében a PBMC-ket sikeresen visszaprogramoztuk iPSC vonalakká (a beteg és anyja esetében 2 független klónt, míg az apából 1 klónt vizsgáltunk). Mindegyik iPSC vonal tipikus morfológiai tulajdonságokat mutatott, amely az expresszált pluripotencia markerekben is megmutatkozott. Immunfluoreszcens festésnél az OCT4 és NANOG magi kifejeződésű transzkripciós faktorral bizonyítottuk iPSC vonalaink pluripotens jellegét. Áramlási citometriás vizsgálattal az SSEA4 és TRA1-60, TRA1-81 jelöléssel is megerősítettük a vonalak differenciálatlan állapotát. Kariotipizálással igazoltuk, hogy sem a kromoszómák számában, méretében vagy szerkezetében nem volt kimutatható eltérés az iPSC vonalakban. A korábban a páciensben talált KHSRP, LRRC7 és KIR2DL1 DNМ-eket Sanger szekvenálás segítségével igazoltuk vissza az iPSC-kben. Az iPSC-k mind a 3 csírvonal irányába képesek voltak differenciálódni (endoderma: AFP és SOX17, mezoderma: SMA és BMP4, ektoderma:  $\beta$ -TUBULIN és NESTIN).

## *3. NPC-k és idegsejtek létrehozása és jellemzése*

Az iPSC-ket irányított differenciáltatási protokollal hippokampális progenitorokká, majd PROX1 pozitív gyrus dentatus idegsejtekké differenciáltattuk tovább. A beteg-szülő trióból létrehozott NPC-kben és neuronokban a NANOG csökkenő szintje, a neurális progenitor markerek, mint NESTIN, FOXG1, PAX6 NPC-kben történő emelkedése és a neurális markerek, mint NEUROD1, PROX1, GRIA1 és GRIN1, neuronokban megfigyelhető fokozódás volt detektálható mRNS szinten. is bizonyít. A létrehozott idegsejtek morfológiai tulajdonságait immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk, illetve molekuláris vizsgálatainkba felvettük a DNМ-ket hordozó célgéneket is (KHSRP és LRRC7), hogy teszteljük az RNS vagy a fehérje expresszió szintjének különbségeit, de nem találtunk szignifikáns különbségeket.

## *4. RNS-szekvenálási mérések*

NPC állapotban RNS-szekvenálási elemzéseket végeztünk potenciális transzkripciós különbségeket keresve, amelyek okozati összefüggésbe hozhatók a szkizofrén beteg által hordozott DNМ-ekkel. Eltérően expresszáldó (DE) gének, amelyek a beteg NPC vonalában mind az apai, mind az anyai génekhez képest eltérően fejeződtek ki, dúsulása volt

megfigyelhető a GO és PATHWAY analízisek során a neuronok kialakulásáért felelős ligandum-receptor kölcsönhatások, az axon fejlődésért felelős útvonalak, a neurogenesis, az idegsejtek differenciálódásában fontos Wnt-jelátvitel, és  $Ca^{2+}$  jelátvitel gének csoportjaiban. A 100 vizsgált fokozott és csökkent expressziójú gén között számos transzkripció faktor és neuron-specifikus gén volt azonosítható.

#### *5. Kalcium-képződési kísérletek eredményei*

Az NPC-k funkcionális tulajdonságait a transzkriptomaikai glutamát ingerületátviteli és szinaptikus különbségek mentén kalcium-képződő módszerrel vizsgáltuk tovább spontán és glutamát által kiváltott aktivitásukat rögzítve és elemezve. az NPC-k alacsony szintű spontán aktivitást mutattak, de glutamáttal történő stimulációra jellegzetes lefutással reagáltak. Az alanyokat tekintve a szkizofrén betegből származtatott NPC-k a glutamátra szignifikánsan gyengébb reakciót mutattak a többiekhez képest.

#### *6. NPC-k proliferáció, sebzés és neuritnövekedési tesztei*

A transzkriptomikai eredmények alapján az NPC vonalak proliferációs és migrációs potenciálját, és az NPC-k neuritnövekedését is teszteltük. Megállapítottuk, hogy a szkizofrén betegből származó NPC-k a 4. napon, követve a Wnt-típusú gének fokozott kifejeződését, szignifikánsan megnövekedett sejtproliferációt mutatnak az anyai és az apai NPC-khez képest egyaránt.

Nem találtunk szignifikáns különbséget az NPC sebzéses tesztje során, amely mind a proliferációt, mind a migrációs kinetikát méri.

Megvizsgáltuk a neuritnövekedés mértékét differenciálódó NPC-kben, mind DMSO hozzáadott, mind a neurit növekedést bizonyítottan elősegítő, a para-nitroblebbistatin (PNBS) kezelés hatására bekövetkező növekedés szempontjából. 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.

#### *7. A mitokondriális funkció és az oxidatív stressz toleranciájának eredményei*

A ROS változásainak és az oxidatív stressz toleranciájának tesztelésére három független módszert alkalmaztunk. A betegből származtatott NPC vonalon tendenciálisan alacsonyabb ROS szintek voltak mérhetőek. A sejtvonalak oxidatív stressz-toleranciájában nem találtunk

szignifikáns különbséget, amelyet 24 órán keresztül  $\text{CoCl}_2$ -dal történő kezelés és az azt követő reoxigenizáció váltott ki.

Az NPC-k mitokondriumainak mennyiségi meghatározásához mitokondrium-specifikus festéket használtunk, amely lehetővé teszi a funkcionális mitokondriumok mérését fluoreszcencia intenzitás alapján. A beteg NPC-iben a funkcionális mitokondriumok csökkent mennyiségét mutatta, mind az anyai sejtvonalhoz, mind az egészséges kontroll sejtvonalhoz képest.

Az eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze röviden.

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

<b>Főbb mérföldkövek (célkitűzések)</b>	<b>Állapot</b>	<b>Módszer</b>	<b>Főbb eredmények, megfigyelések</b>
<b>Differenciációs protokoll beállítása, optimalizálása</b>	iPSC NPC Neuron	Sejttenyésztés qPCR Kalcium-képzővizsgálat	- NPC és neuron stádiumú sejtek létrehozása, molekuláris karakterizálás - OCT 3/4 és NANOG NPC és neuron ↓ expresszió - NESTIN NPC ↑ expresszió - PAX6, NEUROD1, PROX1, FOXG1 neuron ↑ expresszió - NPC nincs spontán kalciumjel; ATP, LPA, Try, GLU indukció kiváltása - neuronok spontán aktivitás; KCl-ra depolarizáció, TTX spontán aktivitás gátlás
<b>Beteg-szülő trió kiválasztása</b>	Vér	Exom-szekvenálás Bioinformatikai analízis Sanger-szekvenálás	- 16 szkizofréria eset-kontroll trió exom-szekvenálása =1500 mutáció - bioinformatikai elemzés=66 valószínű DNM-t - Sanger-szekvenálással=12 de novo mutációt - 9 DNM misszensz vagy nonszensz mutáció - 1 trióban 3 mutáció: KHSRP, LRRC7, KIR2DL1, ennek a kiválasztása
<b>Beteg-szülő trió PBMC sejteiből iPSC vonalak alapítása</b>	iPSC	Kariotipizálás Mikroszkópia Szekvenálás Immunitokémia qPCR	- egészséges kariotípus - iPSC morfológia - Sanger szekvenálással a beteg 3 DNM-jának visszaigazolás - 90% feletti FACS pluripotencia markerek - 3 csíralemez irányú differenciációs képesség - minőségileg megfelelő 5 klón kiválasztása

Főbb mérföldkövek (célkitűzések)	Állapot	Módszer	Főbb eredmények, megfigyelések
iPSC vonalából NPC és neuron differenciáltatása	iPSC NPC Neuron	Sejttenyésztés qPCR RNS-szekvenálási kísérletek Kalcium-képző vizsgálat Sejtproliferációs kísérlet Sebzési kísérlet Neuritműködési kísérlet CellRox próba Oxidatív stressz próba Mitotracker próba	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NPC differenciálódási képességét neuronok létrehozása igazolja</li> <li>- NESTIN/SOX2 pozitív NPC</li> <li>- PROX1/MAP2 pozitív neuron</li> <li>- NANOG NPC, neuron ↓ expresszió</li> <li>- NESTIN, FOXG1 NPC ↑ expresszió</li> <li>- PAX6, NEUROD1, GRIA1, GRIN1 neuron ↑ expresszió</li> <li>- 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</li> <li>- a beteg NPC vonal szignifikánsan ↓ GLU-válasz</li> <li>- a beteg NPC vonalban 4. napon szignifikánsan ↑ sejtosztódás</li> <li>- a beteg vonalban 24 óránál tendenciálisan ↑ sebzáródás</li> <li>- a beteg NPC vonal javára sem kezeletlen, sem indukált neuritműködés esetén sincs szignifikáns különbség</li> <li>- a beteg NPC tendenciálisan ↓ ROS szintet mutatott</li> <li>- nem tapasztaltunk különbséget oxidatív stressz toleranciában</li> <li>- a beteg NPC vonalban ↓ funkcionális mitokondriumok szám</li> </ul>

## Következtetések

1. NPC-ken ligand indukált kalcium-változásokat tudunk kiváltani és bemutatni.
2. Beteg-szülő trió visszaprogramozásával létrehoztunk egy olyan betegségmodellt, amely lehetőséget kínál a betegséget okozó mutációk molekuláris hatásainak vizsgálatára és ezek összehasonlítására közeleső genetikai háttérű sejtvonalakban.
3. Az RNS szekvenálási elemzésekkel DE-gének fokozott expresszióját tudtuk kimutatni a neuronok kialakulásáért felelős ligandum-receptor kölcsönhatásokban, az axon fejlődésért felelős útvonalakban, a neurogenesisben, az idegsejtek differenciálódásában fontos Wnt-jelátviteli, és Ca<sup>2+</sup> jelátviteli útvonalakban.
4. Kalcium-képző eljárással a beteg NPC vonalában csökkent glutamát választ mérünk.
5. Proliferációs vizsgálataink során a SZ betegből származó NPC-kenél a kísérlet 4. napján az anyai és apai vonalhoz képest fokozott sejtosztódást mutattunk ki.
6. A beteg NPC-iben a reaktív oxigén gyökök szintjeinek összehasonlításakor tendencia jelleggel alacsonyabb szint volt mérhető.

7. A MitoTracker kísérletekkel a funkcionáló mitokondriumok csökkent mennyiségét láttuk a SZ beteg NPC vonalában.

#### **A disszertáció alapjául szolgáló publikációk:**

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.

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.

#### **A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk:**

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.

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.

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.

#### **A disszertáció témájához nem kapcsolódó publikáció:**

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.