

GÉNEXPRESSZIÓ METABOLIKUS STRESSZ ÉS ANTIPSZICHOTIKUM  
KEZELÉST KÖVETŐEN HUMÁN SEJTKULTÚRÁKBAN

PhD Tézis

Kálmán Sára

Témavezetők:

Prof. Mirnics Károly

Prof. Janka Zoltán

Szegedi Tudományegyetem

Pszichiátriai Klinika

Szeged

2016

## **A disszertációval összefüggő publikációk**

---

- I. Kálmán S, Garbett KA, Vereczkei A, Shelton RC, Korade Z, Mirnics K. Metabolic stress-induced microRNA and mRNA expression profiles of human fibroblasts. *Exp Cell Res*. 2014 320(2):343-53.
- IF<sub>2014</sub>= 3.25**
- II. Garbett KA, Vereczkei A, Kálmán S, Brown JA, Taylor WD, Faludi G, Korade Ž, Shelton RC, Mirnics K. Coordinated messenger RNA/microRNA changes in fibroblasts of patients with major depression. *Biol Psychiatry*. 2015 77(3):256-65.
- IF<sub>2015</sub>= 10.25**
- III. Garbett KA, Vereczkei A, Kálmán S, Wang L, Korade Ž, Shelton RC, Mirnics K. Fibroblasts from patients with major depressive disorder show distinct transcriptional response to metabolic stressors. *Transl Psychiatry*. 2015 5:e523.
- IF<sub>2015</sub>= 5.62**
- IV. Kálmán S, Hathy E, Réthelyi JM. A dishful of a troubled mind: induced pluripotent stem cells in psychiatric research. *Stem Cells Int*. 2016 2016:7909176.
- IF<sub>2015</sub>= 2.81**
- V. Kálmán S, Garbett KA, Janka Z, Mirnics K. Human dermal fibroblasts in psychiatry research. *Neuroscience*. 2016 320:105-21.
- IF<sub>2015</sub>= 3.36**

**Kumulatív impakt faktor: 25.29**

## TARTALOMJEGYZÉK

---

---

BEVEZETÉS.....	4
Diatézis–stressz dermális fibroblasztokban .....	4
Pszichofarmakológiai vizsgálat iPSC-ből létrehozott neuronokon .....	5
Célkitűzések .....	5
MÓDSZEREK ÉS ANYAGOK.....	6
Fibroblaszt kultúrák és metabolikus stresszkezelés.....	6
mRNS és microRNS szintek meghatározása, útvonal analízis.....	6
iPSC differenciáció és antipszichotikum kezelés .....	7
Real-time quantitative PCR és adatelemzés .....	7
EREDMÉNYEK és MEGBESZÉLÉS .....	8
Hogyan alkalmazkodnak a fibroblasztok transzkriptom szinten? .....	8
MD-diatézis manifesztációja fibroblasztokban .....	8
Stresszérzékenység a MD-fibroblasztokban.....	9
iPS és iNC sejtek karakterizálása .....	10
Antipszichotikum kezelés indukált génexpressziós változások .....	11
KONKLÚZIÓK.....	12
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	14

## **BEVEZETÉS**

### **Diatézis–stressz dermális fibroblasztokban**

A mentális betegségek speciálisan humán állapotok, melyek nem tanulmányozhatók közvetlenül a kórosan működő szervben. Állatkísérletekben, sejttenyészetekben történő modellezésük számos problémát vet fel és kompromisszumokat kíván. A betegektől származó *in vitro* funkcionális assay-k rendszerszemléletű megközelítést tesznek lehetővé, mely szerint a mentális betegségek a gén \* környezet és gén \* gén interakció manifesztációi.

2012-ben a major depresszió (MD) közel minden 5. embert érintett és a munkaképtelenség vezető oka volt a világon. Poligénes betegség, a diatézis-stressz hipotézis szerint bizonyos genetikai faktorok konstellációja eredményez fokozott érzékenységet a környezeti stressz hatásokkal szemben, maladaptációt és a klinikai tünetek megjelenését vagy épp remisszióját.

A MD komplex metabolikus és immunzavarral jár. A betegek mintáiban az egészségesekétől eltérő stresszhormon, endokrin és immunfaktor szinteket találtak. Ez arra utal, hogy a genetikai terheltség (stresszt követően) molekuláris és sejt szinten is detektálható a központi idegrendszerben és a periférián egyaránt.

A microRNS-ek gyors, pontos, koordinált génexpresszió szabályozást biztosítanak, mely alapvető a stresszválaszban. Szerepük van a sejtciklus, apoptózis, differenciáció, regeneráció, metabolikus adaptáció és szinaptikus plaszticitás irányításában. MD, szorongás, bipoláris affektív zavar és szkizofrénia esetében is találtak eltéréseket a vér, agyszövet és liquor microRNS szintek tekintetében humán és állatkísérletekben. Ezen felül a microRNS-ek részt vesznek a stressz, pszichotróp és antidepresszáns gyógyszerek génexpresszió és viselkedés moduláló hatásában is.

Az utóbbi 5 évben, egyre nagyobb irodalom foglalkozik a humán dermális fibroblasztokkal (HDF) a pszichiátriai betegségek vonatkozásában, mint potenciális modell rendszerekkel, biomarker forrásokkal. A betegektől származó HDF tenyészeteket könnyen hozzáférhető, fenntartható és propagálható sejt kultúrák. Homogének, mentesek a mintavételt megelőző *in vivo* hatásoktól és 15-20 passzázsra keresztül megőrzik genetikai stabilitásukat. Ezen felül, génexpressziós és receptor profiljukban, szignalizációs útvonalaikban hasonlítanak a neuroektodermális eredetű sejtekhez. Korábban alkalmazták őket affektív, neurodevelopmentális és neurodegeneratív kórképek patológiájának megismerésében, főleg a metabolikus és redox homeosztázis, membrántranszport, apoptotikus szuszeptibilitás, cirkadián ritmus eltéréseinek vizsgálatára.

## **Pszichofarmakológiai vizsgálat iPSC-ből létrehozott neuronokon**

Mióta Yamanaka és Takahashi megmutatta, hogy humán posztmitotikus sejtek reprogramozhatók indukált pluripotens őssejteké (iPSC), az iPSC-kutatás az élettudományok egyik leggyorsabban fejlődő metodikájává nőtte ki magát, egyedülálló lehetőségekkel az *in vitro* betegségmodellezés, regeneratív medicina és gyógyszerfejlesztés területein. Mai tudásunk szerint az iPS sejtek neurális sejtekké történő differenciációja az *in vitro* spatio-temporális fejlődési útvonalakat követi. Növekedési hormonok és/vagy kis szignálmolekulák kombinációja elegendő nagy neurotranszmitter specifitású idegsejtek létrehozásához (pl.: GABA-erg, glutamáterg kortikális, dopaminerg középagyi neuronok).

2014-ben Yu és mtsai. a gyrus dentatus *in vivo* fejlődésmenetét utánozva hippocampális, glutamáterg szemcsesejteket differenciáltattak iPSC-ből, így lehetővé téve a felnőttkori neurogenesis *in vitro* modellálását. Ismert, hogy a hippocampusz subgranuláris zónájában az idegsejtképzés élethosszig tart. Az új, éretlen neuronok a belsőbb rétegekbe vándorolnak, glutamáterg granuláris sejtekké differenciálódnak és integrálódnak a hippocampális neuron-körökbe. Ez a folyamat esszenciális a tanulási és memória folyamatokban, azonban számos intrinsic és extrinsic hatás modulálja, éppen ez teszi olyan érdekessé az *in vitro* kutatások számára. A neurogenesis zavarát számos pszichiátriai betegségben leírták, például csökkent stresszben, MD-ban és szkizofréniában, mely helyreállítható antidepresszáns és atípusos antipszichotikum medikációval.

### **Célkitűzések**

Célunk a MD diatézis-stressz modelljének vizsgálata volt MD-betegektől és kontroll személyektől származó HDF kultúrákban. A következő kérdéseket tettük fel: (1) Hogyan befolyásolja a metabolikus stresszkezelés a HDF-ek mRNS és microRNS expresszióját? (2) Van-e különbség a MD és kontroll fibroblasztok transzkriptomjában standard körülmények között? (3) Különbözik-e a MD és kontroll sejtek metabolikus stresszválasza?

Második vizsgálatunkban arra voltunk kíváncsiak, hogyan hatnak a különböző antipszichotikumok (AP) a differenciálódó és érő hippocampális szemcsesejtekre *in vitro*. Humán iPS sejtekből származó neurális kultúrákat 19 napig kezeltünk a típusos AP haloperidollal (HL), az atípusos AP olanzapinnal (OL) vagy risperidonnal (RP) két koncentrációban.

## **MÓDSZEREK ÉS ANYAGOK**

### **Fibroblaszt kultúrák és metabolikus stresszkezelés**

16 MD-vel diagnosztizált és 16 nemben, életkorban, rasszban illesztett kontroll (CNT) személytől vettünk bőr biopsziát (12 nő és 4 férfi). A fennálló MD epizód a DSM-IV-TR alapján volt diagnosztizálva, a vizsgálatot a Vanderbilt University Institutional Review Board (Nashville, TN, USA) engedélyezte és a vizsgálati alanyok írásos tájékozott beleegyezésüket adták.

A bőr biopsziákból primer fibroblaszt sejt kultúrákat indítottunk, standard körülmények között, heti háromszor cserélve a mediumot. Az *in vivo* hatások minimalizálása érdekében, a sejtvonalakat 5-10 alkalommal passzáltuk. Két-három hét elteltével valamennyi sejtvonalból 3 plate-t indítottunk ( $1.2 \times 10^6$  sejt/plate) két különböző metabolikus stresszkezeléssel: (1) glükóz hiányos, galaktóz tartalmú (GAL); (2) lipid csökkentett (RL) medium, illetve (3) egy standard (STD) kondíció. A hét napos stresszkezelés a sejtek növekedését, proliferációját nem befolyásolták. Egy hét múlva a kultúrákat kétszer lemostuk jég hideg PBS-sel, majd tripszineztük és a pelletet  $-80^\circ\text{C}$ -on tároltuk az RNS izolálásig.

### **mRNS és microRNS szintek meghatározása, útvonal analízis**

A fagyasztott mintákból totál sejt RNS-t és kis sejt RNS-t izoláltunk mirVana miRNA isolation Kit segítségével a gyártó útmutatásai szerint. Az RNS oldat minőségét, méretmegoszlását Agilent 2100 Bioanalyzer-rel határoztuk meg. A cDNS szintézis, amplifikáció és jelölés az Enzo Life Sciences Single-Round RNS Amplifikációs és Biotin Jelölő Rendszerrel történt.

A génextpresszió szintje az Affymetrix GeneChip HT HG-U133\_PM Array Plate-tel, átlagos logaritmus arányszámmal (ALR) lett meghatározva minden csoportban, minden gén esetében. Ha az  $ALR \geq 0.585$  és a t-próba  $p \leq 0.05$  feltételek teljesültek, a génextpresszió változást szignifikánsnak tekintettük. A microarray adatok validálásához kvantitatív polimeráz láncreakcióval (qPCR) mértük a mRNS-ek relatív mennyiségét.

A microRNS szint meghatározáshoz a cDNS-t tartalmazó mintákat 4 csoportba vontuk össze nem és kor alapján ( $n=4$ /csoport). 1008 microRNS relatív mennyiségét határoztuk meg humán miRNome PCR array-jel a miScript SYBR Green PCR Kit-et használva a gyártó utasításait követve. A microRNS expresszió kvantifikálása a komparatív Ct módszerrel történt. Amennyiben a  $|\Delta\Delta Ct| \geq 0.3785$  és  $p$ -érték  $\leq 0.05$  kettős kritérium teljesült, a változást statisztikailag szignifikánsnak tekintettük. Validálás céljából 22 microRNS-t szintjét

határoztuk meg az individuális (csoportokba nem összevont) mintákban ugyanezek a próbákat használva.

A szignifikáns változást mutató géneken GenePattern szoftverrel végeztünk génhalmaz feldúsulás elemzést (gene set enrichment analysis (GSEA)). A mRNom és a microRNom közötti összefüggések feltárásához a miRDB internetes adatbázist használtuk, a szignifikánsan változó microRNS-ek lehetséges target útvonalait pedig a DIANA-mirPath szoftverrel azonosítottuk.

### **iPSC differenciáció és antipszichotikum kezelés**

Második vizsgálatunkban humán iPSC sejteket differenciáltattunk Prox1 pozitív hippocampális granulás neuronokká a Yu és mtsai. által leírt protokoll szerint (2014). Röviden: az iPSC kultúrák mTeSR mediummal tenyésztettük matrigéllal fedett csészékben, naponta cserélve a tápfolyadékot, majd a sejtkolóniákat ultra-alacsony adherenciájú csészékbe vittük át (1. nap) és differenciációs mediummal kezeltük, hogy szabadon lebegő embrionális testeket (EB) hozzunk létre. Húsz nap elteltével az EB-eket poly-L-ornitin/lamininnel (PORN/L) bevont plate-re helyeztük át (N2B27 médium). A letapadt, neuronális rosettákat tartalmazó EB-eket manuálisan felszedtük, majd akkutázzal szétválasztottuk a sejteket (27-30. nap) és PORN/L-bevont csészékbe helyeztük, ahol a bFGF-et és laminint tartalmazó N2B27 médium hatására neurális progenitor sejtek (NPC) alakultak ki belőlük. Ezeket  $1.7 \times 10^5$  sejt/well sűrűségben 6-welles plate-ekre helyeztük. Másnap elindítottuk a Prox1 irányú differenciációt és párhuzamosan az AP-kezelést (3 biológiai replikátum/kezelés). Minden sejtenyészetet standard körülmények között tartottunk

Hét kezelése csoportot különítettünk el: HL<sub>low</sub> és HL<sub>high</sub> (10 ng/ml és 100 ng/ml haloperidol); OL<sub>low</sub> és OL<sub>high</sub> (50 ng/ml és 500 ng/ml olanzapin); RP<sub>low</sub> és RP<sub>high</sub> (100 ng/ml and 1000 ng/ml risperidon). Mivel az antipszichotikumok dimetil-szulfoxidban (DMSO) voltak oldva, a kontroll csoport DMSO-t tartalmazó tápfolyadékot kapott (0,2 µl/ml). A neuronokat 19 napig differenciáltattuk.

Az iPSC tenyészetek pluripotenciájának igazolására a szuszpendált sejteket anti-humán SSEA4-PE-vel jelöltük és fluoreszcencia aktivált sejt osztályozással (FACS) számoltuk a jelölt sejteket. A sejt tipizáláshoz az iPSC és differenciált neuron kultúrákat összesített markerekre (NANOG, OCT3/4) és neuronális markerekre (PROX-1, MAP2) festettük.

### **Real-time quantitative PCR és adatelemzés**

A 19 napos differenciációt és AP kezelést követően teljes sejt RNS-t izoláltunk Trizollal a gyártó utasításait követve. Az RNS minták minőségét Nanodrop 2000

spektrofotométerrel határoztuk meg. A cDNS szintézishez a Promega reverz transzkripció rendszerét használtuk, majd TaqMan PCR próbákkal mértük a metabotrop glutamát receptor 2 és 7 (mGluR2, mGluR7), vezikuláris glutamát transzporter 1 (VGLUT1), mikrotubulus-asszociált protein 2 (MAP2), neuronális differenciáció 1 (NeuroD1) és gliális fibrilláris acidikus protein (GFAP) mRNS relatív mennyiségeit. Endogén kontrollnak a nagy ribizómális protein P0-t (RPLP0) választottuk. A normalizált génexpresszió szintet a  $\Delta\Delta Ct$  módszerrel számoltuk. A változást akkor tekintettük szignifikánsnak, ha  $|\Delta\Delta Ct| \geq 0.3785$  és  $p \leq 0.05$  kritériumok teljesültek.

## **EREDMÉNYEK és MEGBESZÉLÉS**

### **Hogyan alkalmazkodnak a fibroblasztok transzkriptom szinten?**

A GAL-kezelés, melyet oxidatív stresszként alkalmaznak *in vitro*, 2063 gén expresszióját befolyásolta a STD kondícióhoz képest. Az útvonal analízis szerint 19, köztük DNS-javító, ellenőrző és sejtciklussal kapcsolatba hozható géncsoport volt érintett. Az RL-kezelés ismereteink szerint metabolikus megterhelést jelent a sejtnek: 984 gén expressziója változott (65% emelkedett) melyek 15, főként az immunitással, protein- és sejtregenerációval összefüggő útvonalakban vesznek részt. A kétféle metabolikus stressz között az átfedés 4 útvonal volt: PPARA (oxidatív stressz és gyulladásos válasz); CHREBP2 (anyagcsere); RACCYCD (sejtciklus); HSP27 (apoptózis, stresszválasz).

A GAL-kezelés 45, az RL-medium 34 microRNS expresszióját befolyásolta. Négy olyan microRNS volt, mely mindkét stressz hatására változott: hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-129-3p, hsa-miR-543 és miR-550a. A target útvonal analízis szerint ezek összesen 57 géncsoport expressziójának szabályozásában vesznek részt, melyből 22 útvonalat mind a 4 microRNS modulál. Figyelemre méltó, hogy közülük 16 intracelluláris jelátviteli út.

A GAL- és RL-kondíciók által létrehozott mRNS és microRNS expressziós profilokat összevetve arra jutottunk, hogy bár a legnagyobb mértékben változott géntermékek különböztek, összességében a két stresszkezelés által előidézett transzkriptom módosulások jelentős hasonlóságot mutattak. Ezen felül valószínű, hogy a microRNS expresszió nagy mértékben hozzájárult a mRNom profilhoz mind a GAL-, mind a RL-tápfolyadékban.

### **MD-diatézis manifesztációja fibroblasztokban**

A STD-mediumban tenyésztett MD- és CNT-fibroblasztok mRNomját összevetve 162 olyan gént találtunk, mely eltérően fejeződött ki a MD-mintákban. Közülük 114 expressziója



csökkent, mely inkább funkcióvesztéssel járó génszabályozás-zavart jelez. A legmarkánsabb különbségeket a sejt-sejt kommunikációban, adhézióban és immunfunkciókban érintett génekben és útvonalakban találtuk. Adataink tehát összhangban vannak korábbi perifériás és posztmortem vizsgálatok eredményeivel, melyek szerint a MD genetikája immunitással és idegfejlődéssel kapcsolatos géncsoportok zavaraiiban jelentkezhet.

Érdekes, hogy a MET/HGF intracelluláris jelátviteli út génjeinek 43%-a mutatott MD-specifikus expressziós mintázatot. Ismert, hogy a géncsoport a fejlődés, stressz, és regeneráció során aktiválódik: a MET receptor motilitást, proliferációt vált ki és védi a sejteket a hipoxia és szérum-depriváció káros hatásai ellen. Ugyanakkor, sejtípustól függően, proapoptotikus hatást is kifejthet. A szakirodalom szerint a szérum HGF-szint korrelálhat a depressziós tünetek jelenlétével, súlyosságával és progressziójával. Elképzelhető és további kutatások tárgyát képezheti, hogy MD-ban az általunk detektált HGF/MET-jelátviteli deficit miatt nem tud érvényesülni a jótékony hatása az akár kompenzatorikusan emelkedett HGF-nek.

Az MD sejtekben 38 microRNS fejeződött ki másként (17 csökkent és 21 fokozódott). Ezekből minimum 8-at már korábban is kapcsolatba hoztak neuropszichiátriai betegségekkel. A target útvonal analízis szerint az MD-specifikus microRNS-ek univerzális intracelluláris jelátviteli útvonalak, sejt ciklussal, sejt-sejt kommunikációval, adhézióval, immun és neurális funkciókkal kapcsolatban álló géncsoportok szabályozásában vesznek részt. Fan és mtsai. MD-betegek vérsejtjeinek microRNom-ját vizsgálva 22 ilyen útvonalat azonosított. Kiemelendő, hogy bár a fibroblasztok eltérő microRNS profilt expresszáltak, a 22-ből 18 géncsoport érintettsége a mi eredményeink alapján is felmerül, ami arra emlékeztet minket, hogy a MD genetikailag determinált, multidimenzionális betegség, melynek molekuláris nyomait a perifériás sejtekben is detektálhatjuk.

Amikor a mRNS és microRNS profilt összevetettük, funkcionális kapcsolatot találtunk: az MD-specifikus mRNom 50%-át magyarázták a microRNom különbségek. Ugyanakkor a pontos ok-okozati összefüggésekről csak hipotéziseket gyárthatunk, hiszen az azonosított mRNS-ek 64%-a több mint egy microRNS által szabályozott és azt is tudjuk, hogy a microRNS-ek csökkenthetik és/vagy fokozhatják is a target gén kifejeződését.

### **Stresszérzékenység a MD-fibroblasztokban**

A MD stressz-diatézis modellje alapján feltételeztük, hogy a génexpressziós vizsgálatok még informatívabbak lehetnek, ha stressznek tesszük ki a MD-betegtől származó sejttenyészeteket. Mind a GAL-, mind a RL-kezelés robosztus transzkriptom változásokat idézett elő a fibroblasztokban: 1196 és 312 gén kifejeződését módosították.

Körülbelül a stresszválasz egyharmada (a gének 26 és 33%-a, az útvonalak 48 és 52%-a) MD-specifikusnak bizonyult. A géncsoportok egy része már a STD-kondícióban is eltérően fejeződött ki az MD és CNT mintákban, de a metabolikus stressz rámutatott más, az MD-hez kapcsolható adaptációs zavarokra az energia háztartás, anyagcsere reguláció, sejtvándorlás, sejtciklus és apoptózis területén.

Érdekes, hogy a microRNS-stresszválasz még nagyobb fokú MD-specificitást mutatott: a GAL-érintett gének 81%-a és a RL-által módosított gének 90%-a nem vett részt a CNT minták stresszreakciójában. A stressz-indukált microRNS-ek az anyagcsere kontroll (38%), a proliferáció és apoptózis (60%), valamint a sejtmozgás (30%) szabályozásában játszanak szerepet. Említést érdemel még, hogy a microRNS-ek jelentős részét a tumor szuppresszor p53 regulálja (GAL: 13%, RL: 33%). A GAL és RL-kezelés transzkriptom profil között az átfedés 23 microRNS volt.

A RL-környezetben különösen kidomborodott a MD-sejtek adaptációs deficitje: a microRNom-ban elsősorban negatív változások következtek be, mely arra utal, hogy új enzimműködés jelent meg például a lipidszintézishez vagy anaerob energiatermeléshez. A RL-kezelés rámutatott továbbá a hipoxamir-válasz elégtelenségére. Ezek a microRNS-ek alapvető fontosságúak a mitokondriumok oxidatív stressz adaptációjához. Vizsgálatunkban 6 hipoxamir szintje emelkedett a CNT mintákban a RL-kondíció hatására, míg a MD-fibroblasztokban csökkent mértékben fejeződtek ki. Ez további bizonyítékul szolgálhat a MD-ban leírt mitokondriális diszfunkcióra.

Eredményeink tehát a sejt proliferációval és túléléssel, apoptózissal kapcsolatos regulációs zavarokra engednek következtetni és alátámasztják, hogy a stresszkezelés kihangsúlyozhatja a genetikailag determinált stresszérzékenység molekuláris nyomait.

### **iPS és iNC sejtek karakterizálása**

Második vizsgálatunkban hippokampális szemcsesejteket differenciáltattunk iPS sejtekből. A pluripotens és differenciált sejteket morfológia, FACS és immuncitokémia segítségével karakterizáltuk. A 6/2/F iPS sejteknek több mint 95%-a összejszerű fenotípust mutatott morfológiailag valamint felszíni marker (SSEA4) és pluripotencia-specifikus transzkripciós faktor (Oct3/4 és NANOG) expresszióját tekintve egyaránt. Az iPSC-k képesek voltak embrionális testeket létrehozni és tovább fejlődni radiális glia-szerű, majd NPC sejtekké. Három héttel a differenciáltatás megkezdése után a sejtek Prox1 és MAP2 pozitivitást mutattak, mely arra utalt, hogy körülbelül 80%-uk hippokampális szemcsesejt.

## Antipszichotikum kezelés indukált génexpressziós változások

A differenciálódó hippokampális szemcsesejteket HL, OL és RP antipszichotikumokkal kezeltük két különböző koncentrációban 19 napig. A HL egy típusos AP, mely elsősorban a D2 receptorokon hat, kisebb affinitással a D1, D3, D4, szerotonin (5-HT<sub>2A</sub>) és  $\alpha$ 1 adrenerg receptorokon, illetve hiperglutamáterg hatást is kifejt. Ezzel szemben az OL és a RP atípusos AP, melyek elsősorban a 5HT<sub>2A</sub> antagonistái és viszonylag gyenge D2 antagonisták. Közepes affinitással számos más szerotonin, dopamin, hisztamin és alfa-adrenerg receptort blokkolnak.

A *NeuroD1*, az idegfejlődésben kulcs szerepet játszó transzkripciós faktort kódoló gén, fokozottan expresszáldott a HL<sub>low</sub>, OL<sub>high</sub>, RP<sub>low</sub> és RP<sub>high</sub> sejtenyészetekben a CNT mintákhoz képest, míg a HL<sub>high</sub> ellentétes hatást fejtett ki. Korábbi publikációk szerint, ha egy hatóanyag növeli a NeuroD1 szintet, az arra utal, hogy serkenti a neurális differenciálódást. Ismert továbbá, hogy az AP-ok kedvező hatását részben az idegsejt képződés/túlélés fokozásának tudható be, bár az eredmények sokszor inkonzisztensek, főként a HL esetében. Tekintettel arra, hogy posztmitotikus tenyészetekkel dolgoztunk, adataink arra utalnak, hogy az AP-ok bizonyos koncentrációkban segítik a neuronok túlélését.

Ehhez hasonlóan, a HL alacsony koncentrációban fokozta a *MAP2* transzkripciót, míg magas dózisban csökkentette azt. A *MAP2* indukciót általában a fokozott szinaptikus plaszticitás, a dendritfában bekövetkező strukturális és/vagy funkcionális változások jeleként értékelik. Ennek fényében eredményeink szerint a HL<sub>low</sub> kezelt sejtek szinaptikus hálózata dinamikusabb volt, mint a kontrolloké, de az atípusos AP-ok nem váltottak ki hasonló hatást.

A *GFAP* expressziót viszont befolyásolta az OL és RP a koncentrációtól függő mértékben: fokozta alacsonyabb, de csökkentette magasabb dózisban. Ezen hatásuk további figyelmet érdemelne, hiszen az asztrociták fontos szerepet játszanak az agy (pato)fiziológiájában és számos neuropszichiátriai kórképben mutattak ki asztrocita és GFAP eltéréseket, azonban nagyon keveset tudunk arról, hogyan hatnak rájuk a pszichofarmakonok.

A HL<sub>low</sub>, RP<sub>low</sub> és RP<sub>high</sub> kezelés csökkentette a *VGLUT1* mRNS szinteket. A *SLC17A7* génről leíró fehérje rendezi össze a szinaptikus vezikulák szállító funkcióit, így expressziós mintázata közvetlenül befolyásolja a glutamát felszabadulást (a glutamát egységek mennyiségét), így a szinaptikus plaszticitást és korrelál a tanulási és memória folyamatokkal. Csökkent kifejeződését az affektív és neurodegeneratív betegségek kognitív tüneteivel hozzák kapcsolatba.

Végül, de nem utolsó sorban két metabotróp glutamát receptor expressziós szintjét is mértük. Az *mGluR2* gén aktivitását csökkentette az OL<sub>high</sub> de fokozta a HL<sub>low</sub>. Utóbbihoz

képezt szignifikánsan alacsonyabb *mGluR2* mRNS szintet mértünk a HL<sub>high</sub>-kezelt sejtekben. A preszinaptikus mGluR2 receptorok a glutamát neurotranszmisszió fontos szabályozói és a receptor agonistáit új, potenciális AP-okként tartják számon. Állatkísérletes és posztmortem adatok szerint a 5HT<sub>2A</sub> receptoron ható atípusos AP-k hiszton módosítás révén csökkentik a *mGluR2* gén aktivitását. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a HL – koncentrációtól függően - szintén modulálja az *mGluR2*-t egy jelenleg ismeretlen mechanizmuson keresztül.

Az *mGluR7* kifejeződés fokozódott a HL<sub>low</sub>, de csökkent a HL<sub>high</sub> és RP<sub>low</sub> kezeléseknél. Irodalmi adatok szerint az alacsony *mGluR7* expresszió kapcsolatban állhat a szkizofrénia rizikóval és a receptor terápia target lehet neurokognitív zavarokban és extrapiramidális mozgászavarokban. Éppen ezért lehet érdekes a jövőre nézve a már elérhető és fejlesztés alatt álló AP-ok mGluR7-re kifejtett hatásának vizsgálata.

## KONKLÚZIÓK

A fent bemutatott megfigyeléseink és az ide kapcsolódó szakirodalom alapján a mellett érvelünk, hogy az *in vitro* modellrendszereknek van helye és jövője a pszichiátriai kutatásban. Először a klasszikus, a mai napig előszeretettel alkalmazott, betegektől származó HDF tenyészetekkel dolgoztunk, melyet az 1970-es évek óta használnak a mentális zavarokkal összefüggő szignál transzdukciós, membrán transzport, redox homeosztázis eltérések vizsgálatára. Tudomásunk szerint mi voltunk az elsők, akik perifériás sejteket használtunk a stresszreakció és a MD (epi)genetikai szabályozásának megismeréséhez. Eredményeink beilleszkednek abba az elterjedt hipotézisbe, hogy a MD egy genetikailag meghatározott, szisztémás, maladaptációs betegség.

Első kérdésünk úgy hangzott, hogy a metabolikus stresszválasz hogyan jelentkezik a HDF-ekben a mRNS-ek és microRNS-ek szintjén? Eredményeink szerint a kétféle metabolikus stresszkezelés nagyon hasonló, robosztus transzkriptom változásokat eredményezett a sejt ciklusban, apoptózisban, gyulladásban és metabolikus adaptációban szerepet játszó génekre hatva. A microRNom stresszválasz jelentősen hozzájárult a mRNS mintázathoz.

Következő lépésben azt vizsgáltuk, van-e különbség a MD és kontroll egyénektől származó HDF tenyészetek mRNS és microRNS profiljában? Szorosan összefüggő microRNS - mRNS hálózati anomáliákat találtunk a MD-sejtekben: funkcióvesztéssel járó genetikai szabályozási zavart, mely leginkább a sejt-sejt kommunikációval, adhézióval, immunfunkciókkal és apoptózissal kapcsolatos géneket érintette.

Végül összevetettük a MD és CNT sejtek stresszreakcióját. Ezen adatok alátámasztották feltevésünket, mely szerint a diszregulált microRNom jelentős mértékben hozzájárulhat a MD-ra jellemző adaptációs zavarhoz. Valószínűnek tűnik, hogy a MD-betegek perifériás sejtjeiben a fiziológiaiától eltérő módon játszódnak le a szükséges metabolikus változások, ami fokozott vulnerabilitással jár. Az MD-specifikus stresszválasz további vizsgálata segítheti a patognomikus maladaptáció genetikai hátterének feltárását.

Második vizsgálatunkban a mai neuropszichiátriai kutatások egyik legígéretesebb modellrendszerét használtuk: iPSC-ből differenciáltatott neuronokat. Az *in vitro* farmakológiai assay során: differenciálódó hippocampális szemsesejteket kezeltünk AP-okkal. Figyelembe véve, hogy a felnőttkori hippocampális neurogenézist károsító hatások rontják a kognitív funkciókat, a hangulatot, és a páciensek nagy része évtizedekig szedi az AP-okat, e gyógyszerek neurogenézisre gyakorolt hatásának vizsgálata igen fontos. Ennek ellenére, tudomásunk szerint mi vagyunk az elsők, akik ezt a kísérleti paradigmát használtuk.

Az atípusos RP és OL fokozta a *NeuroD1* expressziót, mely felgyorsult neurogenézisre és/vagy fokozott neurális túlélésre utal. A szinapszisok funkcionális-strukturális változásairól számot adó *MAP2* transzkripciót viszont nem befolyásolták. Eredményeink arra is felhívják a figyelmet, hogy az AP-ok különböző mértékben és irányban hathatnak a metabotróp glutamát receptorok kifejeződésére, melyek részt vesznek a hippocampális LTP-ben és aktívan kutatott új terápiás célpontok pszichiátriai betegségekben. A tény, hogy a RP és  $HL_{low}$  fokozta a VGLUT1 gén aktivitását, szintén hozzájárulhat a hosszú távú AP-kezelés kognitív aspektusainak megértéséhez. Végül az, hogy az atípusos AP-ok módosítják a GFAP expressziót, talán a legkevésbé kontextualizálható, éppen ezért legérdekesebb megállapításunk.

A szakirodalmat és saját eredményeink áttekintve tehát be kell látnunk, hogy AP-ok komplex, jelenleg csak részleteiben ismert hatást fejtenek ki a génextpresszióra és sejt (pato)fiziológiára, mely régió és sejtípus specifikus lehet. Ezen mechanizmusok feltérképezése fontos klinikai és kísérletes farmakológiai következményekkel járhat.

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Hálával tartozom mentoraimnak: Mirnics Károly Professor Úrnak, aki megtanított, milyen fontos a tudományos munka során egymás véleményének, nézeteink megismerése és tiszteletben tartása; és Janka Zoltán Profeszor Úrnak, aki mindig arra biztatott, hogy céltudatos, precíz, lelkiismeretes munkát végezzek. Kritikus támogatásuk és pártfogásuk nélkül ezen kísérletek és tézis nem jöhetettek volna létre.

Köszönöm Réthelyi János Tanár Úrnak, hogy megengedte, hogy csatlakozzam munkájukhoz, mely során megtapasztaltam, milyen lényeges a türelem és tudatában lenni saját és projektünk határainak.

Kihasználom az alkalmat, hogy köszönetet mondjak Pákáski Magdolna Tanár Nőnek. Szakmai és emberi támogatása, tanácsai számos nehézségen átsegítettek az elmúlt években (és még ma is). Szintén hálás vagyok Krassimira Garbettnek és Hathy Editnek, akik mindig odafigyeléssel, vidámsággal fordultak felém és akikkel a mindennapi munka során együtt örültünk a sikereknek és küzdöttük át magunkat a holtpontokon. Köszönet illeti mindazokat, akik közvetve vagy közvetlenül segítettek/segítenek a tudományos munkában.

Végül hálásan köszönöm szüleimnek, hogy elvetették bennem a tudományos munka iránti szeretetet, lelkesedést és elköteleződést. Hálás vagyok inspiráló útmutatásaikért, bátorításukért, támogatásukért.