

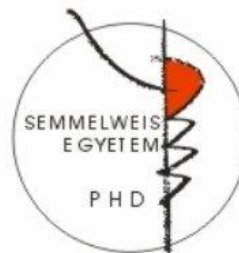
DOI:10.14753/SE.2019.2223

# A központi idegrendszeri sejtek metabolikus profilja

Doktori értekezés

**Dr. Nagy Ádám Miklós**

Semmelweis Egyetem  
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezetők:

Dr. Ádám Veronika egyetemi tanár, a MTA rendes tagja

Dr. Tretter László tanszékvezető egyetemi tanár, a MTA doktora

Hivatalos bírálók:

Dr. Kardon Tamás, egyetemi docens, PhD

Dr. Márk László, egyetemi docens, PhD

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Mandl József egyetemi tanár, a MTA rendes tagja

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Zelles Tibor, egyetemi docens, PhD hab

Dr. Csala Miklós, egyetemi tanár, a MTA doktora

Budapest  
2018

## Tartalomjegyzék

<b>A központi idegrendszeri sejtek metabolikus profilja.....</b>	<b>1</b>
<b>Tartalomjegyzék .....</b>	<b>2</b>
<b>1. Rövidítések jegyzéke.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Bevezetés.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2. Energiaigényes folyamatok a központi idegrendszerben.....</b>	<b>9</b>
2.2.1. A Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPáz, mint legjelentősebb energiafogyasztó.....	9
2.2.2. „Housekeeping” folyamatok energiaigénye .....	12
<b>2.3. Energiadonor vegyületek a központi idegrendszerben .....</b>	<b>15</b>
2.3.1. Glukóz .....	15
2.3.2. Piruvát.....	16
2.3.3. Laktát .....	16
2.3.4. Glutamin .....	19
2.3.5. Ketontestek: β-hidroxibutirát és acetoacetát .....	21
<b>2.4. Anyagcsere a kifejlett idegszövetben .....</b>	<b>22</b>
2.4.1. Asztrogliá sejtek fiziológiás sajátosságai és metabolikus kapcsolatai .....	22
2.4.2. Oligodendroglia sejtek fiziológiás sajátosságai és metabolikus kapcsolatai .....	27
2.4.3. Mikroglia sejtek fiziológiás sajátosságai és metabolizmusa .....	31
<b>2.5. Anyagcsere-változás az embrionális fejlődés során.....</b>	<b>34</b>
2.5.1. Őssejtek fiziológiás sajátosságai és metabolizmusa .....	34
<b>3. Célkitűzések .....</b>	<b>37</b>
<b>4. Módszerek .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1. Oldatok, reagensek .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2. Sejtenyésztetek létrehozása és fenntartása .....</b>	<b>38</b>
4.2.1. BV-2 mikroglia sejtenyésztet fenntartása.....	38
4.2.2. Primer mikroglia sejtek izolálása és tenyésztése .....	38
4.2.3. NE-4C neuronális őssejtek tenyésztése és neuronná történő differenciálata	39
.....	39
4.2.4. Primer neuronális sejtek izolálása és fenntartása .....	39

4.2.5. Primer asztroglia sejtek izolálása és fenntartása.....	40
<b>4.3. Mitokondriális oxigénfogyasztás és extracelluláris pH változás mérése mikrofluorimetriás módszerrel .....</b>	<b>40</b>
<b>4.4. Intracelluláris ATP és ADP szintek detektálása kemilumineszcens módszerrel .....</b>	<b>41</b>
<b>4.5. Sejtviabilitás mérése MTT spektrofotometriás módszerrel .....</b>	<b>42</b>
<b>4.6. Apoptózis- és nekrozisvizsgálat Annexin V/Calcein fluoreszcens festéssel ..</b>	<b>42</b>
<b>4.7. Western-blot és immuncitokémia.....</b>	<b>42</b>
<b>4.8. Statisztika .....</b>	<b>43</b>
<b>5. Eredmények .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1 Mikroglia sejtek szubsztrát-preferencia vizsgálata.....</b>	<b>44</b>
5.1.1. Energia szubsztrátok hatása mikroglia sejtek oxigénfogyasztására és glikolízisére .....	44
5.1.2. Energia szubsztrát-kombinációk hatása mikroglia sejtek oxigénfogyasztására .....	56
5.1.3. Energia szubsztrátok hatása mikroglia sejtek intracelluláris ATP és ADP szintjére.....	60
5.1.4. Energia szubsztrátok hatása mikroglia sejtek viabilitására .....	62
5.1.5. Energia szubsztrátok hatásának vizsgálata a mikroglia sejtek apoptózisára és nekrozisára.....	64
5.1.6. Energia szubsztrátok hatása az mTOR és AMPK fehérjék foszforilációjára, valamint a p-S6 fehérje szintjére .....	66
5.1.7. Autofágia vizsgálata mikroglia sejtekben.....	69
<b>5.2 Neuronális őssejtek, neuronok és asztroglia sejtek szubsztrát-hasznosításának összehasonlító vizsgálata .....</b>	<b>71</b>
<b>6. Megbeszélés .....</b>	<b>75</b>
<b>6.1. Mikroglia sejtek metabolikus vizsgálata .....</b>	<b>75</b>
<b>6.2. Anyagcsere folyamatok vizsgálata a neuronális differenciáció során .....</b>	<b>82</b>
<b>6.3. A módszer kritikája.....</b>	<b>83</b>
<b>7. Következtetések .....</b>	<b>84</b>
<b>8. Összefoglalás .....</b>	<b>85</b>

<b>9. Summary .....</b>	<b>87</b>
<b>10. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>89</b>
<b>11. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>90</b>
<b>12. Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>120</b>

## 1. Rövidítések jegyzéke

Ac-KoA: acetil-koenzim A

Acetoacetát: AcAc

ACSF: artificial cerebrospinal fluid; mesterséges cerebrospinális folyadék

AMPA: 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1, 2-oxazol-4-il) propánsav

AMPK: AMP-aktivált protein kináz

ASC: amino acid solute carrier family, aminosavak transzportjáért felelős fehérjecsald

ATP: adenzin-5'-trifoszfát

BCA: bichoninic acid; bichoninic sav

BOHB: béta-hidroxibutirát / béta-hidroxivajsav

BSA: bovine serum albumin; marha szérum albumin

calcein-AM: acetoxymethyl-calcein ester; calcein-acetoxi-metilészter

CNP-áz: 2', 3'-ciklikus-nukleotid 3'-foszfodiészteráz

CPT-1: carnitine palmitoyltransferase I; karnitin-palmitoiltranszferáz 1

CSF: cerebrospinal fluid; cerebrospinális folyadék

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DNP: 2,4-dinitrophenol; 2,4-dinitrofenol

EAAT: excitatory amino acid transzporter; excitatorikus aminosav transzporter

ATP-szintáz: F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP szintáz:

FCCP: carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone

FCS: borjú szérum

GABA:  $\gamma$ -aminobutirate;  $\gamma$ -aminovajsav

Gln: L-glutamin

Glukóz: D-glukóz

Lak: L-laktát

LC3 II: phosphatidylethanolamine-conjugated LC3

LC3 I: phosphatidylethanolamine-unconjugated LC3

LDH: laktát dehidrogenáz enzim

MCT: monokarboxilát transzporter

mTOR: mammalian target of rapamycin

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dipheniltetrazolium bromid

NMDA: N-metil-D-aszpartát OPS: oligodendroglia progenitor sejtek

PBS: phosphate buffered saline; foszfát pufferelt fiziológiás sóoldat

PDH: piruvát dehidrogenáz komplex

PDK: piruvát dehidrogenáz kináz

PEP: foszfoenol-piruvát

Pir: piruvát

PK: piruvát kináz

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

ROS: reactive oxygen species, reaktív oxigénszármazékok

SDS: sodiumdodecyl sulphate; nátrium-dodecil-szulfát

$\alpha$ KG: alfa-ketoglutarát

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Bevezetés

Míg az agy testünk tömegének mindössze 2%-a, a teljes test oxigén felhasználásának 20%-áért, glukóz felhasználásának pedig akár 50%-áért felelős lehet (Kety 1957, Rolfe és Brown 1997, Sokoloff 1960). Más szövetekkel összehasonlítva az agy kiemelkedően magas energiaigénnyel rendelkezik, amelynek fedezését térben és időben rendkívül finoman összehangolt szabályozási mechanizmusok teszik lehetővé. Ezen regulált folyamatok közé sorolható a központi idegrendszeri sejtek funkcionális anatómiai szerveződésének dinamizmusa, valamint a cerebroszpinális folyadékban megtalálható energiadonor metabolitok transzport és anyagcsere folyamatai.

Az agyi bioenergetika kutatásában hosszú időn keresztül az idegsejtek anyagcséréje és a glukóz kizárólagos energiadonor szerepe állt a középpontban. Az utóbbi három évtized kutatási eredményei azonban az anyagcsere korábbi neurocentrikus felfogásánál sokkal komplexebb képet mutatnak. A központi idegrendszerben megtalálható gliasejteket (asztroglia, oligodendroglia és mikroglia sejtek) az idegsejtekkel szemben sokáig metabolikus szempontból közömbös sejtekként tartották számon. Ezt a nézetet megváltoztatta az a megfigyelés, amely szerint az asztrocita sejtek neurotranszmitterekre membrán depolarizációval válaszolnak (Kettenmann és mtsai 1984). Bár a gliasejtek a neuronokkal ellentétben akciós potenciálokat nem képesek létrehozni, elsődleges funkcióik között szerepel a plazmamembránjuk két oldala közötti iongrádiens fenntartása, amely minden depolarizációt mutató sejt típus esetén rendkívül energiaigényes folyamat. Későbbi felfedezések mutattak rá arra is, hogy a neurotranszmitterek számtalan jelátviteli útvonalat indítanak el az asztroglia sejtekben (G-fehérjék által mediált szignálok, kalcium szignálok, intracelluláris nátriumszint növekedés), amelyek mind-mind energiát igényelnek (Rose és Karus 2013). A neuronok, mint legfőbb energiafelhasználók mellett az energia szubsztrátok termelésében, metabolizmusában, raktározásában és szállításában is jelentős szerepet töltenek be az agyban megtalálható gliasejtek, amelyek egymással és a neuronokkal is szoros metabolikus kooperációban állnak (Belanger és mtsai 2011, Hirrlinger és Nave 2014). Fluorodezoxiglukóz pozitron emisziós tomográfia (FDG PET) és funkcionális mágneses rezonancia (fMRI) vizsgálatok eredményei igazolják a központi

idegrendszer sejtjei közötti funkcionális anatómiai szerveződést és metabolikus kapcsolatot, amely lehetővé teszi az agyban tárolt információ áramlását és feldolgozását. A gliasejtek anyagcsere sajátosságainak felfedezése, valamint a neuronok és gliasejtek közötti szerteágazó metabolikus kapcsolatok feltérképezése alapvető jelentőségű az agy bioenergetikájának és funkcióinak megértésében.

Doktori értekezésemben a kifejlett agy gliasejtjei közül a mikroglia sejtek metabolikus sajátosságaival, illetve a fejlődő agyban jelenlévő őssejtek anyagcsere változásaival foglalkozom. A disszertáció irodalmi áttekintése a terjedelmi szempontok miatt a központi idegrendszert érintő patológiás körülményekkel nem foglalkozhat, ezért a következőkben azokat a fiziológiás folyamatokat részletezem, amelyek a kísérletes munkám megértéséhez nélkülözhetetlenek.



## 2.2. Energiaigényes folyamatok a központi idegrendszerben

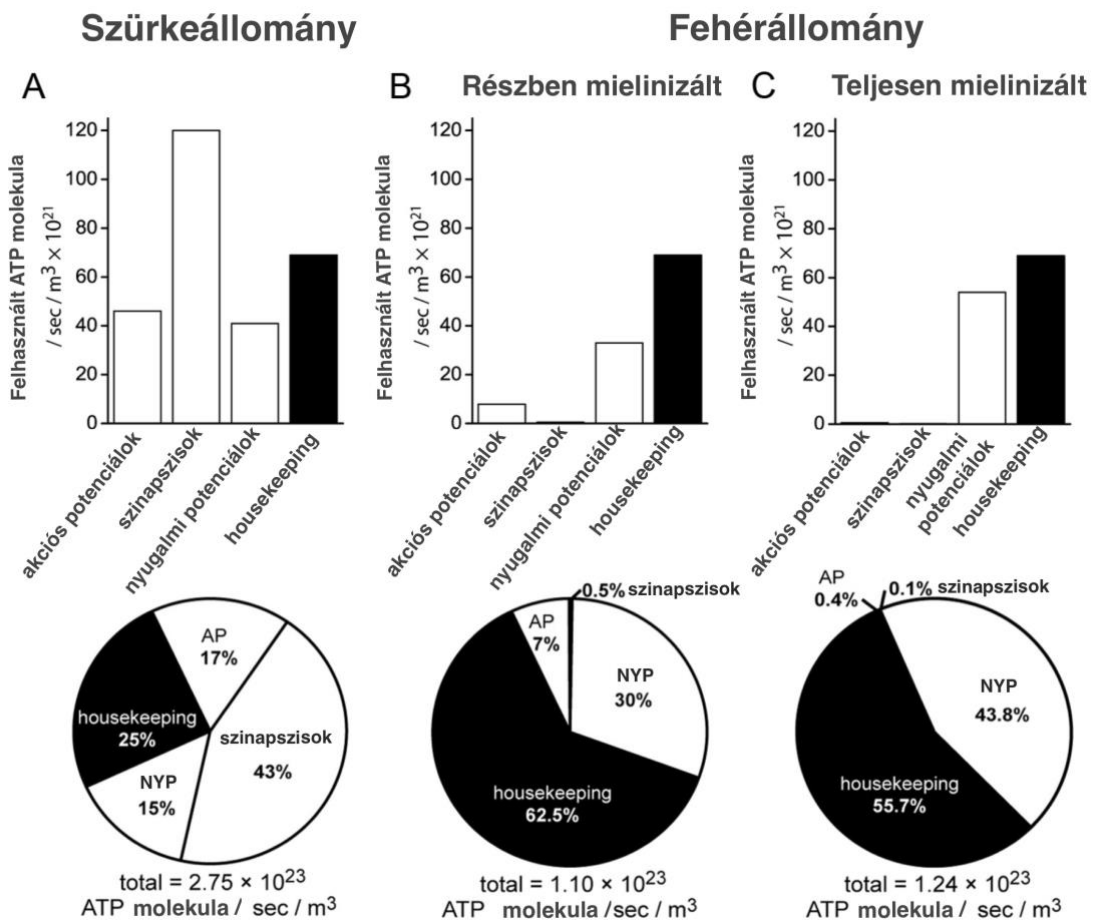
### 2.2.1. A $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPáz, mint legjelentősebb energiafogyasztó

A központi idegrendszeri sejtek számára rendelkezésre álló energia meghatározza az információ továbbításának és feldolgozásának sebességét és ezen keresztül támogatja az agy legjelentősebb funkcióját, az idegsejtek közötti információcserét. A legjelentősebb energia a szinaptikus és akciós potenciálok során a neuronok intracelluláris terébe kerülő nátrium ionok kipumpálására fordítódik (Attwell és Laughlin 2001). Ez a jelentős mennyiségű energia az agy alapvető funkcionális paramétereit határozza meg, a neuronok tüzelési sajátságait, a szinapszisok neurotranszmitter ürítési képességét, valamint a szinaptikus kapcsolatok fizikai terjedelmét (Attwell és Gibb 2005, Harris és Attwell 2012, Laughlin és Sejnowski 2003, Lennie 2003, Niven és Laughlin 2008). A sejthártya két oldala közötti ionaszimmetria (ezáltal a membránpotenciál) fenntartásáért a  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPáz (másnéven  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  pumpa) felelős, amely működése során 3  $\text{Na}^+$  és 2  $\text{K}^+$  cseréjét teszi lehetővé 1 ATP, mint energiavaluta, felhasználása mellett. Nyúl agyszeleteken végzett kísérletekben 50%-os csökkenést tapasztaltak oxigénfogyasztásban a  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  pumpa gátlására használt ouabain jelenlétében (Whittam 1962). Kutyaon végzett *in vivo* vizsgálatokban az agy teljes oxigénfogyasztását a  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  pumpa gátlása 55%-kal csökkentette (Astrup és mtsai 1981). Ezekben a kísérletekben a  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  pumpa gátlására használt ouabain mellett már lidokaint is használtak a  $\text{Na}^+$  beáramlás gátlására, amely pontosabb eredményekhez vezetett. A fennmaradó 45% feltételezhetően nem szignalizációs folyamatokhoz köthető. Attwell és munkatársainak elméleti becslésekre alapuló kutatásai ezeket a kísérleti eredményeket kiegészítették az oxigénfogyasztásból ATP-re átszámolt adatokkal (Attwell és Laughlin 2001). A neuronok 4 Hz-es átlagos tüzelési frekvenciájára számolva az agykéreg jelátviteli folyamataihoz köthető energiafelhasználás az alábbiak szerint oszlik meg: a legnagyobb energiaigény az akciós potenciálok (47%), illetve a posztzinaptikus ionotróp (NMDA, AMPA) és G-fehérje kapcsolt receptorok (34%) működéséhez szükséges, ennél kevesebb energia fordítódik a nyugalmi potenciál fenntartására (13%), a glutamát újrahasznosítására (3%) és a preszinaptikus  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlásra (3%). Ez a munka később kiegészítésre került az agy fehérállományának energiaigényével (Harris és Attwell 2012). A fehérállomány glükóz felvétele közel egyharmada a szürkeállományának (Sokoloff és mtsai 1977). A

mielinizált axonon létrejövő akciós potenciál energetikailag sokkal kifizetődőbb, mint a nem mielin hüvelyes axonon végbemenő akciós potenciál. A szinapszisok hiánya a fehérállományban ugyancsak hozzájárul a kisebb energiaigényhez a szürkeállománnyal szemben, amelynél az energiafelhasználás 59%-a köthető az agykéreghez és 30%-a a kisagyhoz. Ebben a munkában már figyelembe vették az egy akciós potenciálra vonatkozó, alacsonyabb  $\text{Na}^+$  beáramlást (Alle és mtsai 2009, Hallermann és mtsai 2012), amely kis mértékben módosította Attwell és Laughlin 2001-es számításait. Az 1. ábra szemlélteti a szignalizációs folyamatok energiaigényének megoszlását az agy szürke- és fehérállományán belül. Az ábrán az „ATP molekula/sec/ $\text{m}^3$ ” mértékegység az egy másodperc alatt felhasznált ATP molekulák darabszámát jelöli, agyi cortex esetén  $9,2 \times 10^{13}$  db neuron/ $\text{m}^3$  agyszövetre (Attwell és Laughlin 2001, Braitenberg és Schüz 1998) és egységnyi látóideg térfogatra számítva (Harris és Attwell 2012, Matheson 1970). Az akciós potenciálok és a szinaptikus transzmisszió becsült energiafelhasználása a fehérállományban ( $7,86 \times 10^{21}$ , illetve  $5,19 \times 10^{20}$  ATP molekula/sec/ $\text{m}^3$ ) számottevően alacsonyabb, mint a szürkeállományban ( $4,6 \times 10^{22}$ , illetve  $1,2 \times 10^{23}$  ATP molekula/sec/ $\text{m}^3$ ). Ezzel ellentétben azonban a nyugalmi potenciál fenntartására fordítódó energia igen hasonló az agy fehér- ( $3,33 \times 10^{22}$  ATP molekula/sec/ $\text{m}^3$ ) és szürkeállományában ( $4,08 \times 10^{22}$  ATP molekula/sec/ $\text{m}^3$ ). Fontos megjegyezni, hogy nyugalmi potenciál mellett is aktívan működik a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pumpa, amely így jelentősen hozzájárul az agy energiafelhasználásához (Niven és mtsai 2007).

A számított adatok alapján a nem jelátvitelhez köthető, úgynevezett „housekeeping”-re felhasznált ATP egységre vonatkoztatott mennyisége megegyezik az agy szürke- és fehérállományában, azonban a szignalizációs folyamatokhoz viszonyított aránya különböző. A részben mielinizált fehérállomány teljes energiafelhasználása a szürkeállományénak közel 40%-a, amely egyezést mutat a korábban, Sokoloff és mtsai által glukózfogyasztásra kapott adatokkal (Sokoloff és mtsai 1977). Az agy szürke- és fehérállományának energiaigényében a legnagyobb különbség a szinapszisok esetében tapasztalható, ahol 230-szoros különbség látható a vizsgált neocortex (szürkeállomány) és látóideg (fehérállomány) között (1. ábra). Az akciós potenciálokra fordítódó energiafogyasztásban az agy említett két régiója között mindössze 6-szoros a különbség. Így elmondható, hogy az axonok mielinizációja jelentősen hozzájárul a fehérállomány kisebb energiaigényéhez, a meghatározó tényező a szinaptikus transzmisszió, amely az

energiafelhasználás mérlegét döntően a szürkeállomány felé billenti el. Ugyanezt az összehasonlítást elvégezték teljesen mielinizált axonokkal is, a szinaptikus transzmisszió ATP igénye  $1,37 \times 10^{20}$  ATP molekula/sec/m<sup>3</sup>, míg az akciós potenciálé  $5,08 \times 10^{20}$  ATP molekula/sec/m<sup>3</sup>, mindkét adat jelentősen alacsonyabb, mint az agykéreg esetében. A szürkeállomány tehát 2,6-szor több energiát igényel a szinaptikus transzmissziók fenntartására, mint az akciós potenciálokra. Ennek pont az ellenkezője igaz a fehérállományra, amelynél fejlődő látóideg esetén 15-szörös, míg kifejlett látóideg esetén 3,7-szeres különbség tapasztalható az akciós potenciálok és szinapszisok energiaigényében. A fehérállomány kisebb szinaptikus energiaigénye nagyrészt a kevesebb szinaptikus számnak tulajdonítható a szürkeállománnyal szemben (1. ábra).



1. ábra

Energiaigény megoszlása az agy szürke- és fehérállományán belül

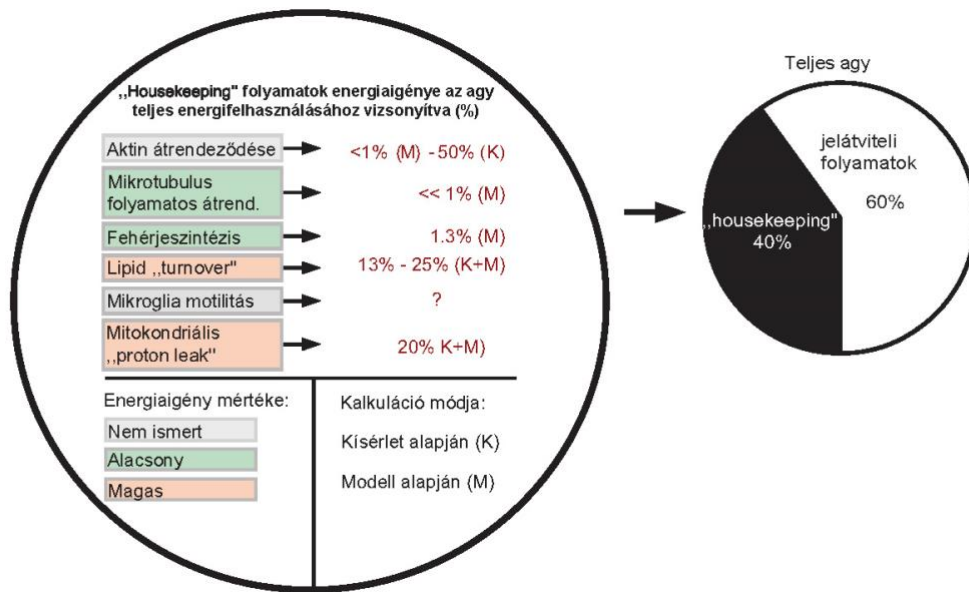
((Harris és Attwell 2012) nyomán)

*Az ábrán szereplő oszlopdigrammok az agy fiziológias folyamataira (akciós potenciálok, szinapszisok, nyugalmi potenciálok és housekeeping) kalkulált ATP igényét fejezik ki a szürkeállományban (A), valamint a részben (B) és teljesen (C) mielinizált látóidegben. Az ábra alján szereplő kördiagramok e fiziológias folyamatok energiaigényének megoszlását jelölik a szürkeállományban (A), valamint a részben (B) és teljesen (C) mielinizált látóidegben százalékban kifejezve. Rövidítések: AP: akciós potenciál, NYP: nyugalmi potenciál.*

### **2.2.2. „Housekeeping” folyamatok energiaigénye**

Számtalan nem jelátvitelhez köthető, összefoglalóan „housekeeping”-nek nevezett folyamatról tudjuk, hogy energiát igényel (2. ábra). Az aktin citoszkeleton szabályozza az idegsejtek morfológiáját, fejlődését és a szinaptikus funkciókat. Mindehhez az aktin citoszkeleton folyamatos átrendeződése, a G-aktin monomerek F-aktinhoz történő kötődése szükséges, amelyhez ATP hidrolízise biztosítja a megfelelő energiát (Carlier és mtsai 1988). Modellekre épülő számítások alapján az agy teljes energia-felhasználásának kevesebb, mint 1%-a fordítódik az aktin és ennél is kevesebb a mikrotubulus rendszer átrendeződésére (Engl és Attwell 2015). A kísérleti eredmények azonban ennél jóval magasabb arányt mutatnak. Bernstein and Bamberg vizsgálataiban a neuronális sejt kultúra teljes energiafogyasztásának mintegy fele fordítódik az aktin átrendeződésére. Kísérleti módszerük azonban jelentősen visszazsorította a glutamát felszabadulást, amely alapján feltételezhető, hogy a citoszkeletonális rendszer fenntartásának energiaigényére kapott közel 50%-os érték túlbecsült eredmény. Az aktin citoszkeleton átrendeződésénél fontos megemlíteni az agyban rendkívüli dinamikus hely- és alakváltozást mutató mikroglia sejteket is, amelyek motilitásának energiaigényét ugyancsak nem ismerjük. A mikrotubulus rendszer átrendeződése során felhasznált energiára vonatkozóan ugyancsak kevés adatot találunk az irodalomban. Ez a dinamikus változó struktúra a tubulinhoz kötött GTP hidrolíziséből nyeri energiáját a folyamatos növekedéshez és összehúzóódáshoz (Margolis 1981, Mitchison és Kirschner 1984, Vorobjev és mtsai 1999). A citoszkeleton dinamizmusának fenntartásához az agyban elengedhetetlen a foszfolipidek és fehérjék folyamatos szintézise. Bár kevés kísérleti adat áll rendelkezésre ezen folyamatok energiaigényéről, elméleti becslések alapján az agy teljes ATP felhasználásának 2%-át teszi ki a fehérjék szintézise (Attwell és Laughlin 2001, Rolfe és Brown 1997). Az agy foszfolipid szintézisére fordítódó energiafogyasztás mértékét

sokáig alábecsülték (Ames 2000), Purdon és Rapoport számításai alapján azonban ez az érték az agy teljes ATP felhasználásának 25%-át is jelentheti (Purdon és Rapoport 2007), amelyből 12% a lipidek foszforilálására (foszfatidil-inozitol-ciklus), 8% a lipid aszimmetria fenntartására szolgáló foszfolipid transzportra (Beleznay és mtsai 1993) és 5% a rövid életidejű zsírsavak foszfolipidekbe történő beépítésére fordítódik. Patkányból származó hippocampusz agyszeleteken, Clark-típusú oxigén mikroszenzorral végzett kísérletek igazolják, hogy az agy teljes energiafelhasználásának mintegy 47%-a köthető a citoskeleton dinamikus változásához és közel 18%-a lipidszintézishez, míg a proteinek szintézisére fordítódó energia ezek mellett elhanyagolható. Az aktin és mikrotubulus rendszer energiaigénye közel azonos (Engl és mtsai 2017). Érdekes azonban figyelembe venni, hogy ezen kísérletek kiértékelésénél több feltételezéssel éltek a szerzők, amelyek nem minden esetben állnak fenn. i) Feltételezték, hogy az oxigénfelhasználás egyenes arányos az energiafelhasználással, amely csak abban az esetben lehet igaz, ha a glukóz teljes aerob oxidációja megtörténik. Ez sem fiziológiás, sem patológiás körülmények között nem egyértelműen igaz. Példaként említve a mikroglia sejtek környezetüktől függően képesek megváltoztatni metabolizmusukat: hipoxiás körülmények között, illetve aktivációjuk során az oxidatív anyagcsere helyett a glikolitikus folyamatok kerülnek előtérbe (Orihuela és mtsai 2015, Voloboueva és mtsai 2013). ii) Megfigyelték, hogy az *in vitro* agyszeleteken mért oxigénfogyasztás alacsonyabb az *in vivo* mért értékeknél, amelyet az agyszeletek spontán neuronális aktivitásának hiányával hoznak összefüggésbe.



## 2. ábra

### Housekeeping folyamatok becsült energiaigénye ((Engl és Attwell 2015) nyomán)

A baloldali ábrán a nem jelátvitelhez köthető, housekeeping folyamatok kísérletek, illetve modellek alapján becsült energiaigénye látható százalékban kifejezve az agy teljes energiaigényéhez képest. A jobboldali ábra a jelátviteli folyamatok és a housekeeping-hez tartozó folyamatok egymáshoz képesti arányát mutatja az agy teljes energiaigényéhez viszonyítva.

## 2.3. Energiadonor vegyületek a központi idegrendszerben

Glukóz az elsődleges energia szubsztrát az agy számára, azonban nem az egyetlen energiadonor vegyület. Számos egyéb metabolit képesek felhasználni a központi idegrendszeri sejtek energiatermelésre, így a cerebroszpinális folyadékban jelenlévő laktátot (Boumezbeur és mtsai 2010, Bouzier-Sore és mtsai 2003b, Larrabee 1995), glutamint (Pascual és mtsai 1998, Zielke és mtsai 1998), ketontesteket (Tildon és mtsai 1983) és zsírsavakat (Edmond és mtsai 1987). Az agy különböző régióira és sejtípusaira jellemző pontos szubsztrát-specificitás azonban még nem tisztázott. A témában megjelent számos értékes közlemény ellenére e komplex metabolikus sajátosságok felfedezéséhez és megértéséhez további kutatásra van szükség.

### 2.3.1. Glukóz

Az 1940-es és 1950-es évektől kezdődően nagyszámú publikáció jelent meg az agy bioenergetikájával kapcsolatban (Kety 1957, Kety és Schmidt 1948, Sokoloff 1960), amelyek az agyat metabolikus szempontból egységesen oxidatív szervként írták le. Ezekben a kutatásokban a D-glukózt (továbbiakban glukóz) az agy számára kizárólagos energiadonor vegyületként említik, amelynek szén-dioxiddá és vízzé történő oxidációja során 32-36 ATP molekula keletkezik. Az agyi kortexre vonatkozó respirációs kvóciens 1 körüli érték, amely a **glukóz** aerob oxidációjára utal (Cahill és Owen 1967, Dickens 1936, Krebs 1964, Stiles és Lusk 1903). Az utóbbi 20 év eredményei azonban rávilágítottak a központi idegrendszeren belüli sejt-specifikus metabolizmusra, különös hangsúllyal a glukóz oxidatív és glikolítikus hasznosulásának módjaira. Ismerve a központi idegrendszer sejtípusokra vonatkozó heterogén jellegét nem meglepő az a felismerés, hogy az agy különböző sejtípusai egyedi bioenergetikai profillal rendelkeznek. Míg a neuronokra elsősorban az oxidatív anyagcsere jellemző, az asztrocita és oligodendroglia sejtek főleg glikolítikus úton fedezik energiaigényüket és a felvett glukózból laktátot, illetve piruvátot állítanak elő (Magistretti és Allaman 2015, Weber és Barros 2015). *In vivo* glukóztranszport vizsgálatok alapján meglepő következtetésre jutottak, amely szerint a fiziológiai körülmények között, nyugalmi állapotban mért glukózfelvétel megegyezik neuronokban és asztrocitákban (Chuquet és mtsai 2010, Nehlig és mtsai 2004). A glukóz facilitált diffúzióval keresztüli transzportját a központi idegrendszeren belül elsősorban a GLUT1 és a GLUT3 végzi. A GLUT1 a vér-agy gát

endotéliumán (55 kDa izoforma), illetve az asztrocita sejtek perivaszkuláris végtalpain (45 kDa izoforma) található (Gerhart és mtsai 1989, Vannucci és mtsai 1997). A központi idegrendszeren belül a kapillárisok denzitása arányos és egyben fő meghatározója a GLUT1 transzporterek denzitásának (Duelli és Kuschinsky 2001). A GLUT3 jellemzően a neuronon található, denzitása a környezettől és a neuronális energiaigénytől függ, míg a mikroglia sejtekben a GLUT5 transzporter (elsődlegesen fruktóz transzporterként ismert) található meg (Vannucci 1994, Vannucci és mtsai 1997). A glukóz anaerob körülmények között, illetve a Warburg-effektust mutató sejtek esetén (Harami-Papp és mtsai 2016) laktáttá metabolizálódik a glikolízisben, amely egy glukóz molekula esetén nettó két ATP molekula szintézisét teszi lehetővé szubsztrátszintű foszforiláción keresztül. Aerob körülmények között a glukózból keletkező piruvát nem alakul át laktáttá, hanem a mitokondriumba transzportálódik, majd a piruvát dehidrogenáz enzim által katalizált reakcióban acetil-koenzim A-vá (AcKoA-vá) alakul, ez utóbbi intermedier belép a citrát-ciklusba, majd a mitokondriális oxidatív foszforiláción keresztül ATP szintézisét teszi lehetővé.

### **2.3.2. Piruvát**

A piruvát fiziológias körülmények között más energia metabolitokhoz képest igen kis mennyiségben, 0,1-0,2 mM koncentrációban van a jelen a cerebrospinális folyadékban (Benoist és mtsai 2003, Zhang és Natowicz 2013). Patológias körülmények esetén azonban mennyisége jelentősen megnövekedhet. A CSF-ban emelkedett piruvát koncentrációhoz vezethet a piruvát dehidrogenáz enzimkomplex valamely alegységének deficienciája, amely során így a piruvát átalakulása Ac-KoA-vá gátolt; valamint a mitokondriális légzési lánc gátolt működése (Benoist és mtsai 2003). A piruvát plazmamembránon keresztüli transzportjéért a későbbiekben (2.3.3. fejezet) részletezett monokarboxilát transzporterek felelősek.

### **2.3.3. Laktát**

A XX. század elején az izom metabolizmussal foglalkozó tudományterület az L-laktátot (továbbiakban laktát), mint toxikus metabolitot tartotta számon (Schurr 2014). A Cori-ciklus felfedezése, miszerint a máj glukoneogenezis útján képes glukózzá alakítani az izommunka során keletkező laktátot, az 1930-as években alapvetően megváltoztatta ezt a nézetet. Egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy léteznek olyan szövetek/szervek (az agy és a



szív), amelyek energiatermelésre tudják használni a laktátot. Az agy akkoriban, mint kizárólagos glukózfelhasználó volt nyilvántartva. Ezt a nézetet erősítette az a megfigyelés, miszerint a glukóz vér-agy gáton keresztüli transzportjának sebessége mintegy tízszerese a laktát transzportnak (Cremer és mtsai 1979). Az utóbbi években vált csak világossá, hogy a központi idegrendszeren belül léteznek laktátot termelő sejtek (gliasejtek), illetve laktátot energiatermelésre felhasználni képes sejtek (elsősorban neuronok) és ezen sejtfeleségek között metabolikus kapcsolat áll fenn. A laktát jelenlétét a központi idegrendszeren belül sokáig kizárólag az ischémiához kötötték, azonban az utóbbi évtizedek kutatásai számos fiziológiás folyamatban betöltött szerepére is rávilágítottak. A laktátot elsősorban asztrociták állítják elő glukózból vagy glikogénből neuronális szignálok hatására, így szoros metabolikus kapcsolat alakul ki az asztrocita sejtek és neuronok között. Az asztrocita sejtek által termelt laktátot a neuronok képesek felvenni és energiaigényük fedezésére, funkcióik (excitabilitás, plaszticitás, memóriafejlesztés) ellátására fordítani. Ezen felül a laktát jelentős szerepet tölt be a központi idegrendszer homeosztázisának fenntartásában (Magistretti és Allaman 2018). McIlwain humán és majom agyszeleteken végzett vizsgálataiban a neuronok képesek voltak a laktátot energiatermelésre használni (Mc 1953). Ezt a megfigyelést később megerősítették izolált dorzális ganglionon, hippokampusz agyszeleten és izolált látóidegen is (Brown és mtsai 2001, Dolivo és Larrabee 1958, Schurr és mtsai 1988). Ezeket az eredményeket sok kritika érte, ugyanis glukóz hiányában történt méréseken alapultak. Később azonban megjelentek olyan publikációk, amelyek glukóz és laktát együttes jelenlétében mért hasonló eredményeket tartalmaztak. Ezeket már nagyrészt mágneses rezonancia spektroszkópiával (Bouzier-Sore és mtsai 2003a, Hassel és mtsai 1995), illetve  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxiglukóz ( $^{18}\text{F}$ -FDG) PET-tel mérték (Dalsgaard 2006, Smith és mtsai 2003). Összességében elmondható, hogy az utóbbi hat évtized különböző módszerrel mért kutatási eredményei azt igazolják, hogy a CSF-ban 2-5 mM koncentrációban jelenlévő laktátot (Abi-Saab és mtsai 2002, Reinstrup és mtsai 2000, Zilberter és mtsai 2010) a neuronok képesek felhasználni energiaigényük fedezésére. A laktát a glikolízis végtermékeként keletkezik glukózból. Normál oxigéntenzió mellett az ATP jelentős része a mitokondriális oxidatív foszforiláció során képződik. Ebben az esetben a glukóz több lépésen keresztül piruváttá alakul, majd a PDH által katalizált reakcióban képződő Ac-KoA belép a citrát-ciklusba. A citrát-ciklus működése során

elektronok szállításáért felelős redukált koenzimek keletkeznek ( $\text{NADH}+\text{H}^+$  és  $\text{FADH}_2$ ), amelyek feltöltik a mitokondriális elektrontranszport láncot, majd végül ATP molekula képződését eredményezik. Előfordul azonban olyan körülmény is, amikor nem áll rendelkezésre a megfelelő mennyiségű oxigén, ilyen esetben a glikolízisben keletkező piruvátból és redukált koenzimből ( $\text{NADH}+\text{H}^+$ ) a LDH által katalizált, reverzibilis reakcióban laktát és  $\text{NAD}^+$  képződik. Egy glukóz molekulából kiindulva ezt az anaerob glikolízisnek is nevezett folyamatot összesen 2 ATP képződése kíséri. Az LDH által katalizált reakcióban történő  $\text{NADH}+\text{H}^+$  oxidáció elengedhetetlen a  $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$  arány, ezen keresztül a glikolízis sebességének fenntartásához. Otto Warburg és Herbert Grace Crabtree nevéhez fűződik a glukóz katabolizmusának egy harmadik formája, az úgynevezett aerob glikolízis, amely során normál oxigéntenzió mellett a glikolízisben keletkező piruvátból Ac-KoA helyett laktát keletkezik (Crabtree 1929, Warburg 1956).

A laktát, mint monovalens anion, sejtmembránon keresztüli transzportja a monokarboxilát transzportereken (MCT) keresztül történik (Barros és Deitmer 2010, Bouzier-Sore és Pellerin 2013, Halestrap és Price 1999, San Martin és mtsai 2013, Stobart és Anderson 2013). A MCT szupercsaládnak 16 tagját ismerjük, amelyek közül az MCT1, MCT2, MCT3 és MCT4 található meg a központi idegrendszerben (Halestrap 2013, Halestrap és Wilson 2012). A MCT1-4 a laktát, piruvát és ketontestek  $\text{H}^+$ -nal történő kotranszportját teszik lehetővé a plazmamembránban a koncentrációgrádiensnek megfelelően. Ezeknek a monokarboxilát transzportereknek más a kinetikája, illetve expressziója a különböző sejtípusokban. Az MCT1, amelynek a legkisebb az affinitása laktátra, elsősorban az asztrocitákban és endotél sejtekben expresszálódik (Broer és mtsai 1997, Pierre és mtsai 2000), míg a laktátra közepes affinitású MCT2 elsősorban neuronokban. A laktátra nézve kis affinitású MCT4 ugyancsak asztrocitákban van jelen (Rafiki és mtsai 2003). MCT3 kizárólag a retina pigment bazális membránjában fordul elő (Philp és mtsai 1998).

Fontos megemlíteni a laktát-transzfer egy különleges, nemrég felfedezett formáját a pannexin és connexin sejtkapcsolatokon keresztül történő laktát-kiáramlást is (Karagiannis és mtsai 2016).

### 2.3.4. *Glutamin*

A központi idegrendszeren belül az L-glutamin (továbbiakban glutamin) mennyisége, az agyszövet 1 mg-jára vonatkoztatva regionális különbségeket mutat. Nyúlágy 15 különböző régióját vizsgálva 4,1 nmol/mg - tól (hippokampusz) egészen 6,8 nmol/mg (kisagy) –ig találunk értékeket. A 7 nmol/mg kevesebb, mint a glutamát, de magasabb, mint az aszpartát vagy taurin mennyisége (Nitsch és mtsai 1983). A cerebrospinális folyadékban (CSF) a glutamin koncentrációja ~0,5 mM, amely mintegy 10-100-szorosa más aminosavak mennyiségének a központi idegrendszeren belül (Garseth és mtsai 2000, Reichel és mtsai 1995, Xu és mtsai 1998). A glutamin továbbá az egyetlen olyan aminosav, amelynek extracelluláris koncentrációja megegyezik vérbeli koncentrációjával (Dejong és mtsai 1993). A glutamin transzportja a vér-agy gáton keresztül csekély, a vérplazmából az agykéregbe történő transzport  $K_m$  értéke mintegy két nagyságrenddel magasabb, mint más aminosavak esetén (Smith és mtsai 1987). Így a glutamin szintézis jelentős része endogén úton az agyban történik glutamátból a glutamin szintetáz enzim által katalizált reakcióban.

A glutamin sejtmembránon keresztüli transzportjéért a  $Na^+$  - függő ASC, *system N* és A transzporter családot felelnek. (Broer és mtsai 2002, Broer és mtsai 1999, Broer és Brookes 2001). *In vivo* és *in vitro* glutamin felvétel és immunocitokémiai vizsgálatok egyértelműen kimutatták az asztrocita- és neuron-specifikus transzporterfehérjék közti különbségeket. A neuronális glutamin felvételért felelős, *system A* transzporter családba tartozó SNAT1 (másnéven ATA1 vagy GlnT) egyirányú transzportot tesz lehetővé (Mackenzie és mtsai 2003, Varoqui és mtsai 2000). A *system A*-n keresztüli glutamin felvétel jelentőségére utal az az eredmény, amely során a transzporter gátlása neuronális sejt kultúrán az epileptiform aktivitás csökkenését eredményezte (Bacci és mtsai 2002). Nemcsak a transzporter gátlása, hanem az asztrocita sejtekben megtalálható glutamin szintáz enzim gátlása is hasonló eredményt adott. Bacci és munkatársainak eredményei arra utalnak, hogy az asztrocita és neuron közötti glutamát-glutamin ciklus a szinaptikus vezikulák glutamáttal történő feltöltésében és így az epileptiform aktivitásban jelentős szerepet töltenek be. Asztrocita sejtekben jellemzően a *system N* család két tagja, a SNAT3 (másnéven SN1) és a SNAT5 (másnéven SN2) végzi a glutamin sejtmembránon keresztüli kétirányú transzportját (Broer és Brookes 2001, Chaudhry és mtsai 1999, Cubelos és mtsai 2005, Deitmer és mtsai 2003). Az asztrocita sejtekből történő glutamin

exportért elsősorban a SNAT3 felelős, amelynek  $K_m$  értéke  $\sim 0,4$  mM a glutamin CSF koncentrációhoz közeli érték. Ezen kívül a transzporter további két tulajdonsága teszi lehetővé a glutamin hatékony exportját: i) a transzporter független más extracelluláris aminosavak jelenlététől (Deitmer és mtsai 2003) és ii) az intracellulárisan felhalmozódó glutamát a transzportert aktiválja (Broer és mtsai 2004).

A glutamin mitokondriális transzportja történhet aktív, illetve diffúz módon, amely lehetőségek közül az aktív transzport a domináns (Minn 1982, Roberg és mtsai 1995, Steib és mtsai 1986). A mitokondriális glutamin felvételt serkenti a magas mitokondriális membránpotenciál, gátolja a glutamát, citrát-ciklus intermedierek, a hisztidin és a leucin aminosavak (Roberg és mtsai 1999a, Roberg és mtsai 1999b, Zieminska és mtsai 2004). A glutamin lebontásában elsődleges szerepet játszik a foszfát-aktivált glutamináz (továbbiakban glutamináz) enzim, amely reakció során glutaminból hidrolízis útján glutamát és ammónia keletkezik. Biokémiai (Roberg és mtsai 1995) és immuncitokémiai vizsgálatok (Laake és mtsai 1999) rámutattak arra, hogy a glutamináz aktív formája elsődlegesen a mitokondriális belső membrán külső felszínén található meg, de nem zárható ki az inaktív forma jelenléte a mitokondriális mátrixban. Szubcelluláris frakcionálási (Nimmo és Tipton 1979, Roberg és mtsai 1995) és elektronmikroszkópos immuncitokémiai (Aoki és mtsai 1991) vizsgálatok kimutatták ugyanakkor a glutamináz jelenlétét a citoplazmában is. *In situ* vizsgálatok eredményei a glutamináz lokalizációját elsősorban a neuronokban igazolták (és *in vitro* asztrocita sejt kultúrában (Schousboe és mtsai 1979)), amely összefüggésben áll a továbbiakban részletezett glutamát-glutamin ciklussal (Laake és mtsai 1999). A glutamináz enzim mindkét létező formájának (máj-típusú és vese-típusú glutamináz enzim) jelenlétét kimutatták agyban (Olalla és mtsai 2002), azonban míg a vese-típusú glutamináz elsősorban a mitokondriumban található meg és a glutamin lebontásáért felelős (Schousboe és mtsai 1979), addig a máj-típusú a sejtmagba lokalizálódik és szerepe lehet a glutamin transzkripció apparátusra kifejtett hatásában, vagy a nukleáris glutamin mennyiségének szabályozásában (Olalla és mtsai 2002).

### **2.3.5. Ketontestek: $\beta$ -hidroxibutirát és acetoacetát**

A ketontestek, mint a  $\beta$ -hidroxibutirát és az acetoacetát, jelentős energiadonor vegyületek a fejlődő agy számára, amelynek teljes energiaigényét 30-70%-ban képesek fedezni (Nehlig 2004). A felnőtt, kifejlett agyhoz képest a fejlődésben lévő agyban jelentősen magasabb a monokarboxilát transzporterek száma és aktivitása (Gerhart és mtsai 1997, Pellerin és Magistretti 1994). Hasonlóan patkány agyban a ketontestek metabolizmusában részt vevő enzimek aktivitása lényegesen magasabb szoptatás idején, mint az elválasztás után (Page és Williamson 1971). A ketontestek aktív felhasználása az agy fejlődése során nemcsak az energiaigény fedezéséhez szükséges, hanem az agy érésében szerepet játszó aminosav- és lipidszintézishez is (DeVivo és mtsai 1975, Yeh és mtsai 1977). Patkányban a  $\beta$ -hidroxibutirát szénatomjainak beépülése aminosavakba mintegy 2-3-szorosa a glukózból származó szénatomokénak szoptatás idején (DeVivo és mtsai 1975). Az anabolikus funkciókon kívül a ketontestek oxidációja alapvető jelentőségű a posztnatális periódusban. Az irodalomban humán adatokat is találunk, amelyekben bizonyított az aktív ketogenezis és ketontest oxidáció újszülöttekben (Bougnères és mtsai 1986). A ketontestek lebontásában kulcsfontosságú enzim, a szukcinil-KoA-3-ketosav KoA transzferáz, deficienciája ketotikus állapotot, a vérplazmában alacsony glukóz és laktát szintet eredményezett egerekben megszületésüket követően (Cotter és mtsai 2011). Kifejlett agyban a ketontestek oxidációja visszaszorul jóllakott állapotban. Éhezés, alacsony szénhidrátbevitel vagy intenzív izommunka esetén azonban a ketontestek felhasználása jelentősen növekedhet. Ilyen esetben elsődlegesen a máj a felelős a ketontestek szintéziséért, azonban az agyban asztrociták is képesek ketontesteket szintetizálni a zsírsavak  $\beta$ -oxidációján keresztül (Auestad és mtsai 1991, Bixel és Hamprecht 1995, Edmond 1992). Ennek a sebessége azonban jóval kisebb, mint a májból történő ketontest transzport. Mind a neuronok, mind pedig a gliasejtek képesek azonban a ketontestek felvételére monokarboxilát transzportereken keresztül, továbbá a ketontestek Ac-KoA intermedierré alakítására és ezen keresztüli energiatermelésre. Felnőtt agyban a ketontestek metabolizmusáért felelős enzimek aktivitása elég magas ahhoz, hogy glukóz hiányában a ketontestekből történjen a szükséges energiaigény fedezése (Krebs és mtsai 1971). A ketontestek szintézisének sebessége sosem éri el az azt metabolizáló enzimek és transzportereik szaturációs szintjét, így a ketontest lebontását a vérplazmában mért koncentrációja határozza meg (Sokoloff 1973).

## 2.4. Anyagcsere a kifejlett idegszövetben

### 2.4.1. Asztrogliá sejtek fiziológiás sajátosságai és metabolikus kapcsolatai

Az asztrogliá sejtek száma a legmagasabb a központi idegrendszeren belül, az emberi agykéregben mintegy 1,4-szerese a neuronok számának (Nedergaard és mtsai 2003). Szerepet játszanak az agy számos funkciójában, beleértve a glutamát, a víz és különböző ionok homeosztázisát, az oxidatív stressz elleni védelmet, szöveti regenerációt, a szinaptikus aktivitás szabályozását gliotranszmisszió útján, valamint a szinapszisok újrendezését (Belanger és mtsai 2011, Volterra és Meldolesi 2005). Az asztrocita sejteket egyedi citoarchitektúrájuk és morfológiai tulajdonságaik alkalmassá teszik arra, hogy érzékeljék és reagáljanak mikrokörnyezetük változásaira. Két alapvető folyamat jellemző rájuk: a szinapszisokat támogató periszinaptikus folyamatok és a végtalpakon keresztüli vaszkuláris folyamatok. A periszinaptikus folyamatokhoz elengedhetetlen, hogy a sejtek a receptorok (neurotranszmitterek, citokinek, növekedési faktorok), transzmitterek és ioncsatornák széles skáláját expresszálják. Ezek közül is elsősorban a glutamát receptorok és transzporterek előfordulása gyakori, ugyanis ez a glutamáterg neurotranszmisszió érzékeléséért fontos. Az asztrocita végtalpak teljesen körülölelik az agyi vérereket (Iadecola és Nedergaard 2007, Oberheim és mtsai 2009). Az asztrocita sejtek territórikus sejtek, a rendelkezésre álló teret kitöltik, a szomszédos asztrocitákkal átfednek, így egy jól szervezett funkcionális anatómiai egységet képeznek, amelyen belül réskapcsolatok biztosítják az anyagok áramlását (Giaume és mtsai 2010).

Az asztrocita sejtek és a neuronok metabolikus útvonalaiban érintett fehérjék génexpressziójában nagyfokú eltérés látható, amely alapvetően meghatározza ezen sejtek energiatermelő folyamatait és a központi idegrendszerben betöltött metabolikus funkcióit. Míg az asztrocitákra elsősorban a glikogén raktározás és laktáttermelés jellemző, addig a neuronok a glukózt a pentózfoszfát-ciklusban (elsődleges funkciók: i) oxidatív stressz elleni védelem, ii) nukleotid és lipid szintézishez prekursorok előállítás) használják, a laktátot pedig a mitokondriális oxidatív foszforiláción keresztül energiatermelésre fordítják. Glikogén raktározásához szükséges a glikogén szintáz enzim, amely az agyban kizárólag asztrocita sejtekben található meg, neuronokban ez az enzim foszforilált (gátolt) állapotban van és proteaszomális degradáción megy keresztül (Vilchez és mtsai 2007). Asztrocita sejtekben a 6-foszfofrukto-2-kináz / fruktóz-2,6-

biszfoszfátáz 3 (továbbiakban Pfkfb3) enzim génexpressziója magas, amely a glikolízist serkentő fruktóz-2,6-biszfoszfát sejten belüli magas koncentrációját eredményezi. Neuronokban azonban a Pfkfb3 enzim proteasomális degradáción megy keresztül, így a glukóz metabolizmusa részben a pentózfoszfát-ciklus irányában folytatódik (Herrero-Mendez és mtsai 2009).

A glikolízis másik szabályozási pontján, az irreverzibilis reakciót katalizáló piruvát kináz (PK) génexpressziójában is különbség látható, az asztrocita sejtekben az aerob glikolízist elősegítő PK M2 izoforma, míg neuronokban az M1 izoforma fordul elő (Zhang és mtsai 2014). Asztrocita sejtekben a PDH-t szabályozó PDK4 izoforma fokozott expressziójának következménye, hogy a PDH túlnyomóan foszforilált állapotban van jelen, a PDH működése gátolt, így megakadályozza a piruvát mitokondriális oxidációját (Itoh és mtsai 2003, Zhang és mtsai 2014). Következésképpen az asztrocita sejtekben a piruvát csak laktáttá alakulhat, amely a sejt számára az aerob glikolízist jelenti. A laktát dehidrogenáz enzimnek is többféle izoformája létezik, expressziója ugyancsak különböző neuronokban és asztroglia sejtekben. Míg idegsejtekben a LDH1 izoforma dominál, asztrocitákban az LDH5 izoforma (mely nagyobb enzimaktivitást mutat piruvátra) van jelen nagyobb mennyiségben (Bittar és mtsai 1996, Tholey és mtsai 1981).

A neuronok funkcionálisan aktív, nem nyugalmi állapotában a vérből történő glukózfelvétel nagyrésze az asztrocitákban megy végbe (Chuquet és mtsai 2010, Voutsinos-Porche és mtsai 2003, Zimmer és mtsai 2017). Funkcionális aktivitás esetén a neuronok az agykéreg teljes energiafelhasználásának 80-90%-áért felelősek (Howarth és mtsai 2012). Figyelembe véve, hogy az ATP szintézisének leghatékonyabb módja az oxidatív útvonal, feltételezhető az asztrocita sejtek által termelt oxidatív energiadonor vegyületek (laktát és piruvát) transzportja a neuronokba majd az idegsejteken belüli oxidatív hasznosulása. Ezt a hipotézist később asztrocita-neuron laktát transzportnak nevezték el (Magistretti és Pellerin 1996, Magistretti és Pellerin 1999, Sibson és mtsai 1998, Tsacopoulos és Magistretti 1996). Fontos azonban megjegyezni, hogy fiziológias körülmények között a laktát:piruvát koncentrációarány legalább 10:1 (Gjedde és Magistretti 2011), így az asztrocita-neuron glikolítikus szubsztrát transzportban a laktát dominál. Ez az arány hipoxiás körülmények között az agy oxidatív kapacitásának csökkenése miatt ennél még magasabb is lehet. Tudva azt, hogy az asztrocita sejtek jelentős mennyiségben tartalmaznak mitokondriumot (Lovatt és mtsai 2007), felmerül a

kérdés, hogy miért termelnek ezek a sejtek túlnyomó részben laktátot az energetikailag kifizetődőbb piruvát helyett. Erre magyarázat lehet az asztroglia sejtek csökkent PDH aktivitása, amely az enzim nagyfokú foszforiláltságának a következménye (Itoh és mtsai 2003). Az asztrocita sejtek másik jellegzetessége a mitokondriális légzési lánc komplexeinek egyedi szerveződése. Míg az idegsejtekben a mitokondriális légzési lánc I. komplexe a lánc többi tagjával szuperkomplexbe szerveződve található meg és így ezek a sejtek magas mitokondriális respirációra képesek, addig asztrocita sejtekben a mitokondriális I. komplex nem része a légzési lánc többi tagja által létrehozott szuperkomplexnek és ezáltal alacsony oxigénfogyasztás jellemzi őket (Lopez-Fabuel és mtsai 2016). Az asztrocita sejtek mitokondriális respirációjának kis jelentőségére utal az a nemrég megjelent vizsgálat, amely során egerek asztroglia sejtjeiben a citokróm-oxidáz enzim (légzési lánc IV. komplexe) génjét szupresszálták, majd az ezt követő több, mint egy éves vizsgálat során nem találtak sem metabolikus rendellenességet, sem fenotípusos vagy neurodegeneratív elváltozást (Supplie és mtsai 2017).

Számos publikáció jelent meg az asztrocita-neuron laktát modell kiterjesztéseként. A glutamátion kívül más, neuron által termelt vegyületek, illetve ionok is kiválthatják az asztrocita sejt fokozott glukóz felvételét és laktát termelő metabolikus választ. Genetikailag kódolt nanoszenzorokkal végzett kísérletekben  $K^+$  és  $NH_4^+$  ionok, amelyek koncentrációja neuronális aktivitás esetében megnő az intracelluláris térben, serkentette az aerob glikolízist asztrocita sejtekben (Bittner és mtsai 2011, Lerchundi és mtsai 2015). Nemrég fedezték fel, hogy fiziológiás koncentrációjú nitrogén monoxid (NO), amelyet ugyancsak termelnek neuronok, hasonlóan laktáttermelésre serkentette az asztrocita sejteket (San Martin és mtsai 2017). Anesztetizált egér kortikális asztrocita sejtjeiből gyors laktát felszabadulást figyeltek meg az agyterület stimulációjának következményeként (Sotelo-Hitschfeld és mtsai 2015).

*Drosophila melanogaster*-en végzett vizsgálatok mutatják, hogy az asztrocita-neuron laktát ingát szabályozó gének evolúciósan konzervált régiót képeznek. A laktát ingában szereplő glikolitikus enzimek génszintű gátlásán (szelektív knockout) keresztül vizsgálták a neuronális funkciókat, a gátlás neurodegeneratív elváltozásokat eredményezett (Volkenhoff és mtsai 2015). A laktát asztrocitából neuronba történő koordinált transzfere az idegsejtekben a lipogenezis serkentéséhez szükséges metabolitok előállítását eredményezte, amely neuroprotektívnek bizonyult. Neuronokban a reaktív



oxigénszármazékok miatt kialakult mitokondriális diszfunkcióban az asztrocita sejt által termelt laktát a neuronban tehát lipogenezist indukált, majd az így kialakult lipid cseppek az asztrogliá sejtekben tárolódtak. Ennek a lipid transzportnak a gátlása neurodegeneratív elváltozásokat okozott (Liu és mtsai 2017).

Az asztrocita glikogén raktárakból történő laktáttermelés az asztrocita-neuron metabolikus kapcsolatnak egy újabb lehetősége. A neuronok által termelt noradrenalin, vazóaktív intesztinális peptid, adenozin, illetve a neuronális aktivitás következtében létrejövő magas extracelluláris  $K^+$  mind kiválthatják a glikogén asztrocita raktárakból történő mobilizációját (Choi és mtsai 2012, Hof és mtsai 1988, Magistretti és mtsai 1981, Ruminot és mtsai 2011, Sorg és Magistretti 1991, Sorg és mtsai 1995). Ez a glikogén eredetű laktát bizonyítottan részt vesz a neuronális plaszticitásban és a memória kialakulásában (Gao és mtsai 2016, Newman és mtsai 2011, Suzuki és mtsai 2011).

A neuronális transzmisszióhoz a mitokondriális  $Ca^{2+}$  beáramlás következményeként fokozott ROS képzés társul (Mattson és Liu 2002). A neuronális antioxidáns rendszer kapacitása azonban viszonylag csekély a legfőbb, antioxidáns védelemért felelős mester transzkripciós faktor (nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 [Nrf2]) fehérje destabilizációja miatt. (Jimenez-Blasco és mtsai 2015). Ezzel szemben azonban a neuronok környezetében lévő asztrociták Nrf2 fehérjéje nagyfokú stabilitást mutat, így ezek a sejtek igen magas oxidatív stressz elleni védelemmel rendelkeznek. Asztrocita-neuron kokultúrán kimutatták, hogy a két sejtfeleség közötti metabolikus kapcsolatok része az antioxidáns védelem, hiszen az asztrocita sejtekből glutathion prekursorok transzportja történik a neuronba, amelyek az idegsejt *de novo* glutathion szintézisét támogatják (Bolanos 2016, Dringen és mtsai 1999).

Az asztrogliá neuronális aktivitást gátló funkciójára is találunk példát az irodalomban. Az asztrocita sejtek rendelkeznek ionotróp és metabotróp glutamát receptorokkal, amelyek aktivációja a glia sejt intracelluláris  $Ca^{2+}$  szintjének megnövekedését eredményezhetik.  $Ca^{2+}$  beáramlást követően az asztrogliá sejtek képesek milliszekundumok alatt ATP-t jutatni az extracelluláris térbe. A gliotranszmisszió következményeként az ATP neuronális purinerg receptorokat (P2X) aktivál, amelynek eredménye egy GABA-n keresztüli gátlás a neuronális transzmisszióban (Lalo és mtsai 2014).

A glutamát a központi idegrendszer fő excitatorikus neurotransmittere, míg ennek a vegyületnek a dekarboxilezésével jön létre az agy legfontosabb inhibitorikus

transzmittere, a GABA. A felnőtt agyban található neuronok glutamát szintéziséhez elengedhetetlen az asztrocita sejtek metabolikus támogatása. A glutamát, valamint a prekursorának számító glutamin vér-agy gáton keresztüli transzportja igen csekély, így a vérplazma glutamin koncentrációjának változása kevés hatással rendelkezik a központi idegrendszeren belüli glutamát koncentrációra (Patel és mtsai 2015, Smith 2000). A glutamát, illetve a GABA szintézise így az agyban történik. A neuronokból felszabaduló glutamát neuronális visszavételének mértéke csekély, ugyanis a glutamát transzportjáért felelős EAAT transzporter család közül az EAAT-1 kizárólagosan, míg az EAAT-2 transzporter 80-90%-ban csak az asztrocita sejtekben lokalizálódik. Az EAAT 3-5 transzporterek megtalálhatóak ugyan a neuronok membránján, azonban mennyiségük és transzport kapacitásuk jelentősebb kisebb, mint az EAAT-1 és EAAT-2 transzportereké (Danbolt és mtsai 2016). A glutamát jelentős része így az asztrogliá sejtekben metabolizálódik. A neuronokból felszabaduló GABA egy része ugyancsak glutamáttá alakul és felhalmozódik az asztrocita sejtekben (Duarte és Gruetter 2013, Schousboe és mtsai 2013). A glutamát *de novo* szintéziséhez citrát-köri intermedier,  $\alpha$ KG szükséges. A piruvát karboxiláz enzim, amely sok sejt típus esetén (pl.: asztrogliá sejtben) mint citrát-köri anaplerotikus reakció piruvátból oxálacetát képződését katalizálja, neuronokban hiányzik, ezért az idegsejtek mitokondriumában  $\alpha$ KG-ből nem keletkezik glutamát, inkább – a glia-neuron kooperáció eredményeképpen – a glutamátból keletkezik  $\alpha$ KG (Shank és mtsai 1985, Yu és mtsai 1983). Asztrocita sejtek magas piruvát karboxiláz aktivitást mutatnak, a citrát-köri anaplerotikus folyamatok közül ez a meghatározó, az így keletkező  $\alpha$ KG-ből lehetővé válik a glutamát *de novo* szintézise. Az újonnan szintetizált glutamátot, valamint a szinaptikus részből felvett glutamátot is képes az asztrocita sejt glutaminná alakítani a glutamin szintetáz enzim által katalizált reakcióban (Norenberg és Martinez-Hernandez 1979). Az így keletkező glutamin transzportálódik a neuronba, amely végül a neuronális glutamát és GABA keletkezését eredményezi. Ezt a folyamatot glutamát-glutamin ciklusnak nevezték el (Benjamin és Quastel 1975, Stobart és Anderson 2013, van den Berg és Garfinkel 1971). A ciklus funkciója tehát kettős, egyrészt az asztrocitában glutamátból szintetizálódott glutamin transzportja a neuronba, másrészt a neuronból felszabadult glutamát és GABA transzportja az asztrocita sejtbe. Érdekes jelenség, hogy a glutamát *de novo* szintézise mellett az asztrocita sejt képes a glutamátot oxidálni és saját energiatermelésére fordítani. Hertz és munkatársainak hipotézise szerint

a két folyamat feltehetően térben elkülönül egymástól (glutamát szintézise  $\alpha$ KG-ból a citoszólban, míg  $\alpha$ KG képződése glutamátból a mitokondriumban), de mindkét reakciót az aszpartát aminoszferáz végzi (Hertz és Rothman 2017).

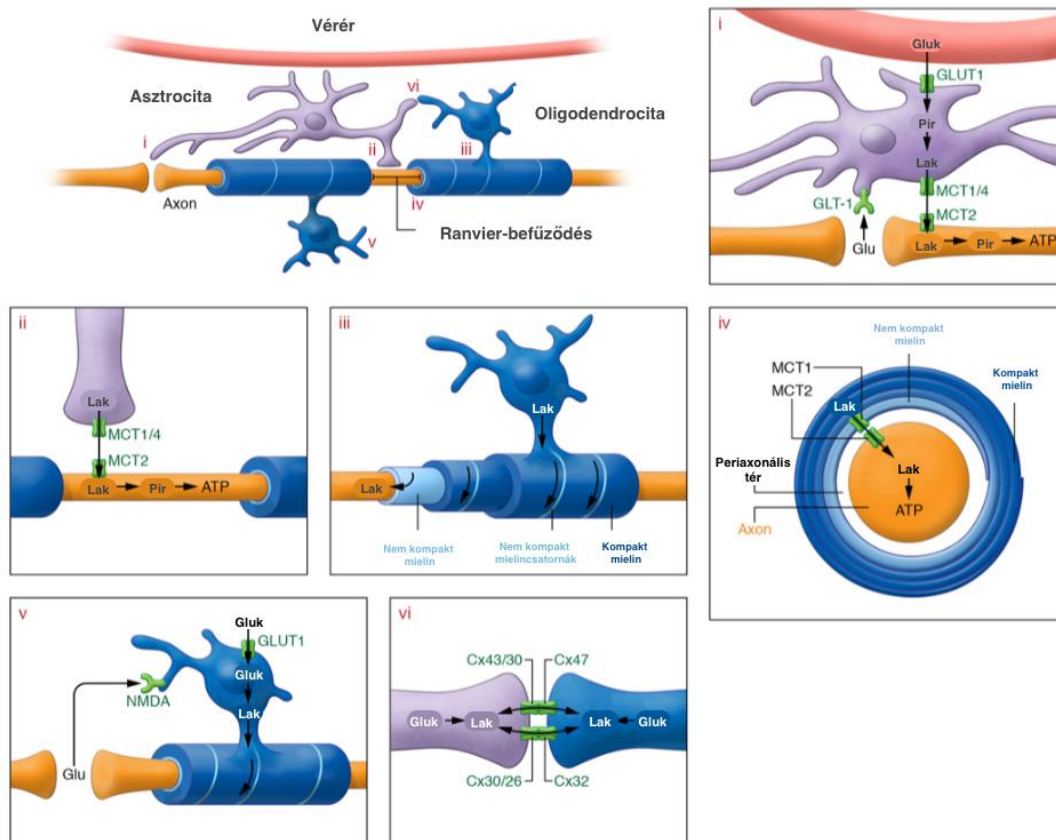
#### ***2.4.2. Oligodendroglia sejtek fiziológiás sajátosságai és metabolikus kapcsolatai***

Az oligodendroglia sejtek az NG2-gliának is nevezett progenitor sejtekből fejlődnek ki, amelyek már embrionális fejlődési szakaszban benépesítik a központi idegrendszert (Kessaris és mtsai 2006). Az oligodendroglia sejtek elsődleges funkciója a központi idegrendszerben megtalálható mielin szintézise. A mielin egy multilamelláris szerkezetű lipid struktúra, amely körülöleli az idegsejtek axonjait így biztosítva a megfelelő konduktivitást az akciós potenciál létrejöttéhez. Az oligodendrocita sejtek által létrehozott mielinhüvely többrétegű szegmensekből áll, az axonok mentén pedig mielin nem tartalmazó axonális szakaszok, úgynevezett Ranvier-befűződések tagolják (Chang és mtsai 2016, Snaidero és Simons 2017). Az oligodendrocita sejtekhez hasonlóak a periférián megtalálható Schwann-sejtek, azonban ez utóbbiak nem képesek több axonon multilamelláris mielin képzésére. Amint befejeződik a fejlődési szakaszban a mielinizáció, az új oligodendroglia sejtek feladata a mielin folyamatos újrendezése (Schneider és mtsai 2016, Young és mtsai 2013). Előfordul, hogy az axonon hosszabb, mielinhüvellyel nem borított részek találhatóak. Elektronmikroszkópos vizsgálatokban egér piramidális neuronok axonjain vizsgálták a mielin longitudinális eloszlását, és ez alapján három típust különböztettek meg: 1) mielinnel nem borított axonrész, 2) mielinnel szakaszosan borított axonrész és 3) az internodális szakaszt megelőző hosszú mielinszegmensekkel borított rész (Tomassy és mtsai 2014). Ez a mielin-mintázat feltehetőleg fontos szerepet játszik a metabolitok transzportjában is.

Az asztrocita-neuron laktát modell nemrég kiegészült az oligodendroglia sejtek metabolikus részvételével (3. ábra). Egéren végzett *in vivo* vizsgálatok eredményei mutatják, hogy oligodendrocita sejtek is képesek aktív aerob glikolízisre és az így glukózból termelt laktát (Morrison és mtsai 2015) a neuronális axonok funkcionális integritásának fenntartására szolgál (Funfschilling és mtsai 2012, Saab és mtsai 2013). Az oligodendroglia – axon laktát transzport genetikai úton történő gátlása axonális diszfunkciót eredményezett. A laktáttranszport jelentőségére utal továbbá az is, hogy amiotrófiás laterálszklerózis modellben kimutatható a glia sejtekre jellemző MCT1 laktát transzporter csökkent expressziója (Lee és mtsai 2012).

Az első oligodendroglia metabolizmussal foglalkozó vizsgálatok knockout állatokon történtek. Az oligodendrocita-specifikus mielin proteolipid fehérje hiánya ezekben a transzgén állatokban axonális degenerációhoz vezetett (Griffiths és mtsai 1998, Klugmann és mtsai 1997). Ez az eredmény arra utal, hogy a mielinhüvellyel borított axon funkcionális egységéhez elengedhetetlen az oligodendroglia sejtek metabolikus támogatása. A reszkető egerek (shiverer mice), amelyek kromoszómájából hiányzik a mielinfehérjét kódoló gén, nem mutattak semmilyen axonális diszfunkciót egy enyhe axon duzzadástól eltekintve a kisagy területén, illetve a gerinvelői fehérállományban (Joshi és mtsai 2015, Loers és mtsai 2004). Ezeknél az állatoknál súlyos tremor jelei mutatkoztak és nem élték meg a 3 hónapnál idősebb kort. Annak ellenére, hogy ezekben az állatokban a mielin nem képes a neuronok elektromos aktivitásának támogatására, az axonok degenerációja nem történik meg, feltehetőleg a nem-kompakt mielin folyamatos metabolikus támogatása miatt (Griffiths és mtsai 1998). Az irodalomban találunk a fent leírtakkal ellentmondásos eredményeket is: a központi idegrendszer mielin fehérjéjének szintéziséért felelős CNP-áz enzim hiánya egerekben progresszív axonális degenerációhoz vezetett amellet, hogy nem befolyásolta az axonális akciós potenciálok lefolyását (Lappe-Siefke és mtsai 2003). Jelentős diszfunkció volt jellemző a paranodális régióban (Edgar és mtsai 2009, Rasband és mtsai 2005). Fagyasztásos elektronmikroszkóp vizsgálatok alapján kiderült, hogy a CNP-áz enzim szerepet játszik a citoplazmatikus mielin nanocsatornákat körülvevő aktin-citoszkeleton rendeződésében (Snaidero és mtsai 2017). Ezek a csatornák a mielin nem kompakt részén találhatóak (3. ábra) és fontos feladatuk a tápanyagok, metabolitok, valamint szignál molekulák eljuttatása az axonhoz (Simons és Nave 2015, Snaidero és mtsai 2014). A CNP-áz hiánya

ezeknek a csatornáknak a számát csökkentette, így a kompakt mielin létrejöttét eredményezte (Snaidero és mtsai 2017). Összefoglalva az oligodendrocita specifikus knockout állatokon végzett vizsgálatok rámutattak arra, hogy a mielin egy dinamikus struktúra, amely sokkal komplexebb, mint korábban hitték. A fent leírtak egyértelmű bizonyítékul szolgálnak arra vonatkozóan, hogy az oligodendrogliá sejtjei metabolikus támogatást nyújtanak az axonoknak a citoplazmatikus csatornákon és periaxonális téren keresztül (Philips és Rothstein 2017). Az oligodendrocita sejtjei monokarboxilát transzportert (MCT1) expresszálnak, amelyet korábban csak asztrocita sejtjei lokalizáltak (Lee és mtsai 2012, Saab és Nave 2016). Az oligodendrogliá specifikus MCT1 gátlása organotipikus gerincvelői szeleten axonális károsodást eredményezett, amelyet a tenyészmédium laktáttal történő kiegészítése megszüntetett (Lee és mtsai 2012). Az oligodendrogliá sejtjei GLUT1 transzporterrel keresztül képesek felvenni a glukózt, majd glikolitikus úton azt laktáttá alakítják, amely képes a neuronok energiaigényét fedezni. A glukóz felvételben, így a neuron-oligodendrocita metabolikus kommunikációban jelentős szerepe van az oligodendrogliá sejtjei taláható glutamát receptoroknak (Saab és mtsai 2016). Az oligodendrogliá sejtjei képesek a glikolitikus úton előállított laktátot MCT1-en keresztül a periaxonális térbe transzportálni, ahonnan a neuronok MCT2 transzporterrel keresztül ezt a laktátot felveszik és energiaigényük fedezésére fordítják (Funfschilling és mtsai 2012, Halestrap 2013, Lee és mtsai 2012). Következésképpen a neuronok hatalmas energiaigényét részben azok környezetében megtalálható gliasejtjei képesek fedezni (Funfschilling és mtsai 2012, Nave 2010, Pellerin és Magistretti 1994).



### 3. ábra

#### A laktát szerepe az asztroglia-oligodendroglia-neuron metabolikus kapcsolatban (Philips és Rothstein 2017) nyomán)

i) Szinapszisoknál neuronális aktivitás esetén glutamát szabadul fel a szinaptikus résben, amelyet az asztrocita sejt *GLT-1* transzporteren keresztül felvesz. Asztrocita sejtekben a glutamát felvétel serkenti a glukóz felvételét *GLUT1* transzporteren keresztül. Asztrocita sejtekben a glukóz piruváttá és laktáttá alakul. Az intracellulárisan felhalmozódó laktát az asztrocita sejtek *MCT1* és *MCT4* transzporterein keresztül elhagyják a sejtet, majd a neuronok ezt képesek felvenni *MCT2* transzporteren keresztül. A neuronális laktát így piruváttá alakul, majd *ATP* szintézisére fordítódik a mitokondriális oxidatív foszforiláción keresztül. ii) Az asztrocita sejtek a Ranvier-befűződéseknél képesek *MCT1* és *MCT4* transzportereken keresztül metabolitokat átadni a neuronoknak. iii) Az oligodendroglia sejtek által alkotott mielinhüvely kompakt és nem kompakt régiókból áll. A nem kompakt régiókban lehetővé válik a metabolitok transzportja a mielinen belül, majd az adaxonális membránon keresztül az anyagcsere termékek eljutnak a neuronba.

iv) *MCT1-en keresztül is történik metabolit transzport az oligodendroglia sejtek adaxonális folyamatai során, majd ezek a metabolitok a periaxonális téren keresztül jutnak el a neuronokba.* v) *Az oligodendrocita sejtek is expresszálnak glutamát receptorokat, a glutamát receptorhoz történő kötődése pedig serkenti az oligodendroglia glukóz felvételét és laktáttermelését. A laktát egy másik forrása lehet az asztrocita sejt által glukózból termelt laktát, amelyet az oligodendroglia sejt réskapcsolatokon (Cx) keresztül képes felvenni. Rövidítések: Gluk (glukóz), Pir (piruvát), Lak (laktát)*

#### **2.4.3. Mikroglia sejtek fiziológiás sajátosságai és metabolizmusa**

A mikroglia sejtek a központi idegrendszer veleszületett immunitásáért felelős sejtjei, immunológiai szerepük elsősorban az agyparenchima folyamatos monitorozásában rejlik, emellett azonban mind fiziológiás, mind pedig patológiás körülmények között az agy számos egyéb funkciójában részt vesznek (Casano és Peri 2015). Szerepet játszanak a neuronális sejthalál szabályozásában (Bessis és mtsai 2007), a szinapszisok átrendezésére utaló ún. 'synaptic pruning' folyamatban (Paolicelli és mtsai 2011), továbbá a neuronális hálózatok szabályozásában (Schafer és mtsai 2012). A mikroglia sejtek funkcióinak sokszínűsége különböző fenotípusú mikroglia sejt kialakulását eredményezi (Michell-Robinson és mtsai 2015).

A mikroglia sejtek az agy sejtjeinek mintegy 5-15%-át teszik ki (Lyck és mtsai 2009, Pelvig és mtsai 2008). Az idegsejtek, valamint a makroglia sejtek csoportjába tartozó asztrocita és oligodendrocita sejtek neuroektodermális eredetűek, míg a mikroglia sejtek a szikzacskó falában ülő primitív mieloid elődsejtekből származnak, ahonnan migrációval jutnak el a neuroepitéliumba és ott megtörténik a kolonizáció (Prinz és Priller 2014, Reemst és mtsai 2016). A perifériás makrofágokkal és vérben keringő monocitákkal ellentétben a mikroglia sejtek életsiklusa jóval hosszabb (Askew és mtsai 2017, Lawson és mtsai 1992, Tay és mtsai 2017), fiziológiás körülmények között a mikroglia sejteknek nincs perifériás utánpótlása (Ajami és mtsai 2011, Ajami és mtsai 2007). A mikroglia sejtek leginkább figyelemreméltó és egyedi tulajdonsága a rendkívüli morfológiai plaszticitás, amely által képesek a központi idegrendszer folyamatos monitorozására (Davalos és mtsai 2005, Nimmerjahn és mtsai 2005). Ez a dinamikus sejtstruktúra lehetővé teszi a neuronális sejttel (Eyo és mtsai 2014, Li és mtsai 2012), axonokkal (Baalman és mtsai 2015), dendritekkel és szinapszisokkal történő interakciót (Eyo és mtsai 2015, Eyo és mtsai 2017, Tremblay és mtsai 2010, Wake és mtsai 2009), így a

mikroglia sejtek képesek a neuronális hálózatok aktivitásának folyamatos érzékelésére és szabályozására (Chen és mtsai 2010, Parkhurst és mtsai 2013, Schafer és mtsai 2012). A mikroglia sejtek az agy elsődleges fagocitái, így fiziológiai funkcióik közé tartozik a felesleges vagy diszfunkcionális neuronok, neuronális sejtrészek bekebelezése az agy korai fejlődése során (Marin-Teva és mtsai 2004, Petersen és Dailey 2004), továbbá neurogén régiók kiválasztása a kifejlett agyban (Abiega és mtsai 2016, Fourgeaud és mtsai 2016, Sierra és mtsai 2014). Morfogenezis, fagocitózis és transzlokáció az aktincitoszkeleton dinamikus átrendezését jelenti, ez mind energiaigényes folyamat, amely jelentős mennyiségű ATP-t igényel. Míg a perifériás makrofágok anyagcseréjéről sok adat áll rendelkezésre (Diskin és Palsson-McDermott 2018, Nemeth és mtsai 2015), a hozzájuk sokáig hasonlóan hitt mikroglia sejtek energia metabolismusáról rendkívül keveset tudunk. A következőkben a mikroglia sejtek bioenergetikai vizsgálatára irányuló néhány irodalmi példát ismertetem.

A mikroglia sejtek expresszálják az összes olyan transzportert, amely a cerebrospinális folyadékban előforduló szubsztátok szállításához szükséges. Ezek között megtalálhatóak a glukóz felvételére szolgáló GLUT transzporterek; a piruvát, laktát és a ketontestek transzportjára szolgáló MCT1 és MCT2 monokarboxilát transzporterek; valamint a glutamát és glutamin transzporterek (Zhang és mtsai 2014). A mikroglia sejtek bioenergetikájával foglalkozó kutatások fókuszában az aktiváció hatásainak metabolikus aspektusai állnak. Az irodalom azonban rendkívül hiányos ezen a területen, hiszen a mikroglia sejtek számtalan fenotípust mutathatnak az aktivációt kiváltó szignál jellegéből adódóan. A képet még komplexebbé teszi, hogy a mikroglia sejt mikrokozonyezetétől függően az aktivációs fenotípusok között is válthat, amely egyedi dinamizmusra utal a fehérjeszintézist, metabolizmust és morfológiát tekintve (Wolf és mtsai 2017). Az elmúlt néhány évben megjelent közlemények eredményei rámutattak arra, hogy LPS-re történő aktivációt követően a mikroglia sejtek metabolismusában változás történik. Míg a nyugvó állapotban lévő sejtek anyagcseréjére az oxidatív metabolizmus a jellemző, addig az aktivációt követően a sejtek glikolitikus úton fedezik energiaigényüket (Ghosh és mtsai 2017, Gimeno-Bayon és mtsai 2014, Orihuela és mtsai 2015, Voloboueva és mtsai 2013). Ezek a kutatások elsősorban a glukóz hasznosulását vizsgálták a mikroglia sejtekben. Mikroglia sejtek képesek extracelluláris vezikulumok (exoszómák és mikrovezikulák) létrehozására. Az exoszómák szintézisének rendkívül jelentős a poszttranszlációs



modifikáció, amely során oxidáció, foszforiláció vagy ubiquitiniláció alakíthatja ki a mikrovezikulák végső összetételét (Szabo-Taylor és mtsai 2015). A 100nm – 1µm méretű, mikroglia eredetű exoszómákba csomagolt fehérjék és lipidek képesek más sejtek (asztrociták, neuronok) működését, metabolizmusát szabályozni. A mikroglia által történő *in vitro* és *in vivo* szinaptikus szabályozásra példa a mikroglia sejt által kibocsátott exoszóma, amellyel a neuronális ceramid és szfingozin termelés indukciója történik (Antonucci és mtsai 2012). Mikroglia-eredetű mikrovezikulák proteomikai analízise kimutatta a metabolizmusban, protein szintézisben jelentős enzimek jelenlétét (Hooper és mtsai 2012).

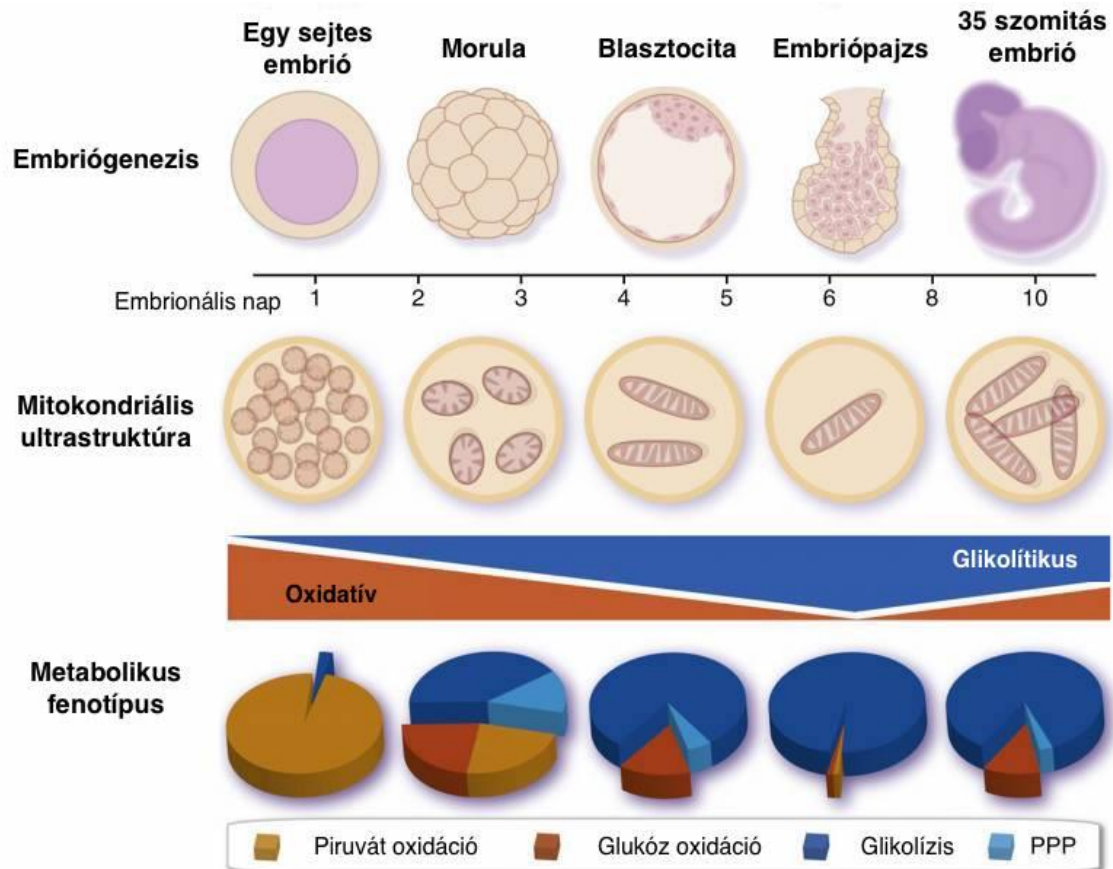
Obezitásra jellemző hiperkalorikus életmód hipotalamikus diszregulációhoz vezet, amelynek következménye a hipotalamusz mediobazális régiójában található mikroglia sejtek aktivációja (Thaler és mtsai 2012). A mikroglia reaktivitásának elsődleges kiváltója a telített zsírsav. Nem meglepő, hogy a hipotalamusznak ezen a részén megtalálható mikroglia sejtek aktiválódnak telített zsírsavak és vér-eredetű faktorok hatására, hiszen ezen a részen csökkent a vér-agy gát funkciója, ezt a régiót az agy ablakának is nevezik. A Thaler és munkatársai által leírt eredmény a zsírsavak által kiváltott mikrogliózist részletezik, bioenergetikai vonatkozása azonban e folyamatnak nem ismert.

## 2.5. Anyagcsere-változás az embrionális fejlődés során

### 2.5.1. *Őssejtek fiziológias sajátosságai és metabolizmusa*

Az őssejtek önmegújulásra és differenciálódó utódsejt létrehozására képes, nem specializálódott sejtek. Az embrionális fejlődés korai szakaszában jelennek meg, azonban a kifejlett, felnőtt szervezetben is folyamatosan jelen vannak. Az őssejtek tehát nemcsak önmagukhoz hasonló sejteket hoznak létre, hanem az aszimmetrikus mitózis eredményeként elkötelezett irányú differenciálódásra képes utódsejteket is.

Az őssejtek különböző fejlődési stádiumához meghatározott bioenergetikai támogatás szükséges, ez teszi képessé a sejteket speciális funkcióik ellátására. A metabolikus útvonalak közti flexibilitásnak az eredménye, hogy a szükséges intermedierek és a megfelelő mennyiségű ATP rendelkezésre áll, amely ezáltal az őssejt fejlődése során az anabolikus folyamatokat és a sejtproliferációt támogatni tudja (Vander Heiden és mtsai 2009, Zhang és mtsai 2012). Az embrionális fejlődés kezdeti szakaszán az egy-sejtes embrió energiaigényét elsősorban glukózból a piruvát mitokondriális oxidációján keresztül fedezi (4. ábra). Az oxidatív metabolizmus az anyai úton örökölt mitokondriumoknak köszönhető (Folmes és mtsai 2012). Annak ellenére, hogy a petesejt oxidatív úton ATP termelésére képes, a citoplazmájában található mitokondriumok gömb alakúak és membránszerkezetüket tekintve rendkívül fejletlenek (Van Blerkom 2009). Az embrióban történő korai sejtosztódás a beágyazódás előtt a mitokondriumok szegregációjához, a mitokondriumok számának és denzitásának csökkenéséhez vezet. A glukózfelvétel és ezáltal a glikolízis fokozódik a fejlődés során, így a blasztocisztában már meghaladja a laktát és piruvát felvételének sebességét (Johnson és mtsai 2003). A beágyazódást követően azonban megkezdődik a mitokondriális DNS replikációja, a mitokondriumok számának a növekedése és a vaszkularizáció, amely a sejt anyagcseréjét újra az oxidatív metabolizmus irányába tolja el (Knobloch és Jessberger 2017).



#### 4. ábra

##### Az anyagcsere változása az embrionális fejlődés során

((Folmes és mtsai 2012) nyomán)

Az ábra az embrionális fejlődés napjainak előrehaladtával párhuzamosan szemlélteti a mitokondriális struktúra változását, illetve az energia metabolizmus átalakulását. Rövidítés: pentózfoszfát-ciklus (PPP)

Az embrionális idegi őssejtek metabolizmusáról viszonylag keveset tudunk. A tápanyagok jelenléte a sejtproliferációban jelentős mTOR szignalizációs útvonalat aktiválja neuronális őssejtekben. Mind az mTOR útvonal gátlása, mind pedig az aktivációja hatással volt az őssejtek proliferációjára és differenciációjára (Magri és mtsai 2011, Paliouras és mtsai 2012).

Lipogén fenotípusként ismert jelenség a daganatos sejtek metabolizmusában a lipid anyagcsere speciális útvonala, amely elősegíti a rákos sejt proliferációját (Menendez és Lupu 2007). Neuronális őssejtek esetében is hasonlóan fontos a *de novo* lipidszintézis, a zsírsav-szintáz enzim működésének farmakológiai vagy genetikai úton történő gátlása a

sejtprolifерáció drasztikus csökkenését eredményezi (Knobloch és mtsai 2013), míg a zsírsav-szintáz enzim serkentése a progenitor sejtek proliferációjának kedvezett (Chorna és mtsai 2013). Nemcsak a zsírsavak felépítő folyamatainak van jelentősége az idegi őssejtek metabolizmusában. A neuronális őssejtek képesek a zsírsavak oxidációjára is, a zsírsav-oxidáció gátlása az őssejtek proliferációját csökkentette a szubventrikuláris zónában (Stoll és mtsai 2015).

Régóta ismert *in vitro* és *in vivo* jelenség, hogy hipoxiás körülmények között, alacsony oxigénszint mellett a glikolitikus folyamatok kedveznek a neuronális őssejtek proliferációjának, a háttérben lévő mechanizmusok azonban ismeretlenek (Simon és Keith 2008). Két nemrég megjelent publikáció foglalkozik a hipoxia és a neuronális őssejtek metabolizmusának kapcsolatával. Az egyikben leírják, hogy az idegi őssejtek a hipoxiára nem érzékenyek, azonban a glikolízis farmakológiai gátlása a sejtek viabilitását jelentősen csökkentette még oxidatív szubsztrát jelenlétében is (Candelario és mtsai 2013). A neuronális progenitor sejt glikolízisének a jelentőségére utal, hogy az agykéregben a vérerek kialakulásának a genetikai gátlása (hipoxiás körülmény létrehozása) a neuronális őssejtek proliferációját fokozta, míg a neurogenézist visszaszorította. Genetikai knockout és overexpresszált modellek utalnak arra, hogy a HIF1 gén upregulált az idegi őssejtekben, amely az aktív glikolízist eredményezi (Lange és mtsai 2016).

### 3. Célkitűzések

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

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

A következő kérdésekre kerestük a választ:

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

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

A következő kérdésekre kerestük a választ:

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

## 4. Módszerek

### 4.1. Oldatok, reagensek

Az élő sejtes vizsgálatok során használt extracelluláris médium egy mesterséges cerebrospinális folyadék (ACSF) volt, amelynek összetétele a következő: 145 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES (pH = 7.4). Amennyiben máshogy nem jelzem, a kísérletekben használt standard laboratóriumi reagensek a Sigma (St Louis, MO, USA) cég termékei.

A sejtek passzálásánál a mosáshoz használt PBS oldat összetétele a következő: 2,68 mM KCl; 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 136,89 mM NaCl; 8,00 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH=7,4

### 4.2. Sejtenyészetek létrehozása és fenntartása

#### 4.2.1. BV-2 mikroglia sejtenyészet fenntartása

Az immortalizált BV-2 mikroglia sejtek (RRID:CVCL\_0182; ajándék prof. Rosario Donato-tól - Kísérleti Orvostudományok és Biokémiai Tudományok Intézete, Perugia, Olaszország) poli-L-lizinnel kezelt flasksokban tenyésztettük DMEM (Sigma D6546) tenyészmédiumban, amelyet kiegészítettünk 4 mM glutaminnal, 10% hőinaktivált FCS-sel, 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomycinnel. 3 hónapos passzálást követően új sejteket vettünk fel fagyasztásból a magas passzázsszám elkerülése miatt. A méréseket 24 órával megelőzően ültettük ki a sejteket (a megfelelő kitapadás eléréséhez) 96 lyukú mikroplate-re 15.000 sejt/well denzitással.

#### 4.2.2. Primer mikroglia sejtek izolálása és tenyésztése

A primer mikroglia sejteket 1-2 napos, újszülött, CD1 egerek előagyából izoláltuk (Saura és mtsai 2003). Az egerek tenyésztése, tartása és a kísérletek kivitelezése a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Szabályzatának megfelelően történt. Egy kísérlethez elegendő sejt kultúra előállításához 10-13 egeret használtunk fel. A kialakuló asztrocita-mikroglia vegyes kultúrát 4 mM glutaminnal, 10% hőinaktivált FCS-sel, 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomycinnel kiegészített MEM (Sigma M2279) médiumban, poli-L-lizinnel kezelt petri csészékben tenyésztettük, majd az izolálást követő 24-26. napon a

mikroglia sejteket kétlépéses tripszin kezeléssel elválasztottuk az asztrocita sejtektől és 40.000 sejt/well denzitással kiültettük 96 lyukú mikroplate-re. A primer mikroglia sejteket a mérést megelőzően 48 órával ültettük ki a megfelelő kitapadás eléréséhez.

#### ***4.2.3. NE-4C neuronális őssejtek tenyésztése és neuronná történő differenciálása***

Az NE-4C p53<sup>-/-</sup> egérembrió elülső agyhólyagból izolált idegi őssejt vonalat ((Schlett és Madarasz 1997); ATTC-CRL-2595) 5% FCS-sel (PAA), 4 mM L-glutaminnal, 40 µg/mL gentamicinnel (Chinoin) és 2,5 µg/mL amphotericin B-vel kiegészített MEM tápoldatban tenyésztettük poly-L-lizinnel kezelt petri csészékben. A sejtek passzálásával mindaddig vártunk, amíg a sejtproliferáció el nem érte a petri csésze 85%-os lefedettségét. Az így kialakult szemikonfluens tenyészetet tripszinnel passzáltuk (0.05 w/v% tripszin - 1 mM EDTA PBS-ben). A tripszin kezelés során az aljzatról leváló sejteket szérumszuszpenzióval felfüggesztettük (a szérumszuszpenzió inaktiválta a tripszint), majd Bürker-kamrás sejtszámlálást követően a sejteket az új petri csészében egyenletesen eloszlattuk. A tenyésztési médiumot hetente háromszor cseréltük a sejteken.

A konfluens NE-4C neuronális őssejttenyészethez 10<sup>-6</sup> M végkoncentrációjú all-transz-retinsavat adtunk a neuronális differenciálódás megindítására. A sejtek retinsavas indukcióját sötétben végeztük. 48 óra elteltével a médiumot retinsav- és szérumszuszpenzióval cseréltük, amelynek összetétele a következő volt: 50% DMEM és 50% F12 médium 4 mM L-glutaminnal, 1 v/v% insulin–transzferrin–seleniummal (ITS; Gibco) és 1 v/v% B27 (Gibco) neuronális faktorokkal kiegészítve. Antibiotikumként a médium gentamicint (40 µg/mL; Chinoin) és amphotericin B-t (2.5 µg/mL) tartalmazott. A differenciált NE-4C tenyészeteken végzett metabolikus vizsgálatok az indukciót követő második héten történtek.

#### ***4.2.4. Primer neuronális sejtek izolálása és fenntartása***

A primer idegsejtek izolálása CD1 típusú embrionális egerek (E15-E16) előagyából történt (Állatkísérletes engedély: "Idegi őssejtek izolálása és jellemzése egészséges és betegség-modellként szolgáló állatok agyszövetéből" engedélyszám: 22.1/354/3/2011). Az agyszövet mechanikai disszociációját és a sejtek szuszpenzióját MEM alapú, 10% hőinaktivált FCS-t, 4 mM L-glutamint, 40 µg/mL gentamicint (Chinoin) és 2,5 µg/mL amphotericin B-t tartalmazó médiumban végeztük. A sejtszuszpenziót 40-42 µm pórusátmérőjű hálón keresztül szűrtük (Madarasz és mtsai 1984), majd a sejteket 10<sup>5</sup>

sejt/cm<sup>2</sup> denzitással (15 000 sejt/well) ültettük ki poli-L-lizinnel kezelt, 96 lyukú plate-re az oxidáció vizsgálatához. A médiumcserék 24 órával a sejt kirakását követően, majd hetente kétszer történtek. A kiültetést követő második héten a médiumot szérumentes neuronális médiumra cseréltük, amelynek az összetétele a következő volt: 50% DMEM, 50% F12 medium, 4 mM L-glutamin, 1% (v/v) ITS (Insulin–Transferin–Selenium; Gibco) és 1% (v/v) B27 (Gibco) neuronális kiegészítő. A Seahorse műszerrel végzett metabolikus vizsgálatra a sejtek kirakását követő 11-13. napon került sor.

#### ***4.2.5. Primer asztrogliá sejtek izolálása és fenntartása***

Az asztrocita sejtek izolálását késői magzati és perinatális CD1 egerek előagyából végeztük (Kornyei és mtsai 2000). Tenyészmédiumként MEM alapú, 10% hőinaktivált FCS-t, 4 mM L-glutamint, 40 µg/mL gentamicint (Chinoin) és 2,5 µg/mL amphotericin B-t tartalmazó tápoldatot használtunk. A sejteket poli-L-lizinnel kezelt felületre ültettük ki 10<sup>5</sup> sejt/cm<sup>2</sup> denzitással.

### **4.3. Mitokondriális oxigénfogyasztás és extracelluláris pH változás mérése mikrofluorimetriás módszerrel**

A letapadt sejtek oxigénfogyasztását, amely elsődlegesen a mitokondriális oxidációról ad információt, a mikrofluorimetriás elven működő Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyzer műszerrel követtük (Gerencser és mtsai 2009, Nemeth és mtsai 2015). A műszerrel az extracelluláris médium pH változását is detektáltuk, amely a glikolízis mértékéről ad információt. Az oxigénszint és hidrogénion koncentráció változását a műszer a sejtek feletti mindössze 2,28 µl médiumban méri. Minden méréshez a Seahorse cég által kifejlesztett, speciális kialakítású, 96 lyukú mikroplate-et használtuk. A mérés előtt másfél órával a tenyészmédiumot tápanyagmentes, csak elektrolitot tartalmazó ACSF médiummal mostuk, így a tápanyagban lévő metabolitokat eltávolítottuk. Ezt követően a sejteket 180 µl ACSF médiumban éhezettük másfél óráig. A mérés kezdetén fél órás alapvonalat vettünk fel tápanyagmentes ACSF-ben, így alakult ki az összesen két órán át tartó éheztetés. A sejteket tartalmazó plate-be kerül bele mérés közben az úgynevezett sensor cartridge, amely tartalmazza az oxigén molekulát és hidrogéniont reverzibilisen kötni képes fluorofórokat, valamint wellenként négy darab mikrotartályt.



A sensor cartridge-ot a mérést megelőző nap kalibráló oldatba helyeztük. A mérés napján a mikrotartályokat metabolittal vagy metabolikus gátlószerekkel töltöttük meg, amelyeket előzőleg ACSF-ben oldottunk és az így kapott oldat pH-ját 7.4-re állítottuk. A cartridge-ot a mérés előtt 37 °C-os, CO<sub>2</sub> mentes inkubátorba helyeztük. A cartridge szenzorainak kalibrálását követően indult a mérés, detektáltuk az oxigénkoncentráció és extracelluláris pH értékeket különböző energia metabolitok, illetve metabolikus inhibitorok jelenlétében. A maximális gátlás elérésének érdekében az oligomycin koncentrációját titráltuk, így a kísérletekben 2 µM-os koncentrációt használtunk. Az FCCP optimális, 1.5 µM-os koncentrációját az oligomycinhez hasonlóan titrálás útján határoztuk meg.

#### **4.4. Intracelluláris ATP és ADP szintek detektálása kemilumineszcens módszerrel**

Intracelluláris ATP és ADP szintek detektálását teszi lehetővé a svéd Biothema cég által forgalmazott, kemilumineszcens elven működő, végpontjelzéses ATP assay kit (Lundin és mtsai 1986). Méréseinket Galaxy Bio-Orbit 1258 dedikált luminométeren, fehér, 96 lyukú mikroplate-ben végeztük. Kísérleteink a tenyészmédium ACSF-re történő lecserélésével kezdődött. Két órás éheztetést követően az ACSF-et egy energiadonor metabolittal (szubsztrát) egészítettük ki, majd további két óra után, ACSF-fel történő mosást követően Extraktáns B/S detergenssel lizáltuk a sejteket. Az így szabaddá váló ATP mennyisége mérhető a kit-ben található luciferáz enzim segítségével. Az ADP szint meghatározására egy paralell lyukban a sejtlyúzathoz PEP-ot és PK-t adtunk. Az így kialakuló ATP mennyisége az eredeti lizátum ATP+ADP tartalmának felel meg, amelyből könnyen kiszámolható kezdeti intracelluláris ADP szint az intracelluláris ATP mennyiségének ismeretében. A mérés végén standard mennyiségű ATP hozzáadásával kalibráltunk.

#### **4.5. Sejtviabilitás mérése MTT spektrofotometriás módszerrel**

Sejtviabilitás vizsgálatára alkalmaztuk az MTT reagenst, amellyel spektrofotometriás úton meghatározható a mitokondriális dehidrogenázok aktivitása (Mosmann 1983). Az éheztetés körülményei az ATP/ADP vizsgálatokhoz hasonlóak voltak. A 4 órás inkubálást követően a sejtekhez hozzáadtuk az MTT reagenst, amellyel további egy órán keresztül inkubáltuk 37°C-on a sejteket. Ezidő alatt kialakultak a formazán kristályok, amelyeket sósavas izopropanol elegyében feloldottunk, majd az oldat abszorbanciáját 570 nm-en vakkal szemben mértük.

#### **4.6. Apoptózis- és nekrozisvizsgálat Annexin V/Calcein fluoreszcens festéssel**

Élő sejtek apoptózis/nekrozis vizsgálatára alkalmas az Annexin V-Cy3.18 (továbbiakban: Annexin) és calcein-AM (Invitrogen) kettős fluoreszcens festés. Míg az Annexin a korai apoptózis jelzésére szolgál (Vermees és mtsai 1995), addig a calcein-AM alkalmazása során a sejtmembrán integritásáról kapunk információt (Bozyczko-Coyne és mtsai 1993). Az apoptotikus/nekrotikus mikroglia sejtek arányát a 4 órás kezelést követő festéssel határoztuk meg. Kizárólag calcein-AM-mel festődnek az ép sejtmembránnal rendelkező életképes sejtek, míg Annexinnel is festődnek azok a sejtek, amelyek a korai apoptózis fázisba léptek. Nekrozisra utal, ha a sejt csak Annexinnel festődik.

#### **4.7. Western-blot és immuncitokémia**

BV-2 mikroglia sejtekkel Western-blot vizsgálatot végeztünk. A sejteket 6 lyukú, poli-L-lizinnel kezelt plate-re raktuk ki 300.000 sejt/well sűrűségben a mérést megelőző napon. A 4 órás kezelést követően proteáz inhibitorral (Roche, Bazel, Svájc) és PMSF-dal kiegészített RIPA lízispufferben (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) homogenizáltuk a sejteket. A fehérje mennyiségi meghatározásához BCA kitet használtunk (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US). Minden egyes lizátumból 12-16 µg fehérjét 5× Laemmli pufferben oldva 4-20 %-os, előre elkészített TRIS-Glicin SDS poliakrilamid gélen futtattunk. Az elválasztott fehérjeminták átvitele polivinilidén

difluorid membránra 2 órán keresztül, 350mA-en történt. A blottolás ellenőrzésére Ponceau S festést végeztünk. A nem-specifikus fehérjekötések kialakulásának gátlására 0.05 % Tween-20 –at tartalmazó, TRIS-sel pufferelt fiziológias sóoldatban emulgeált 5 %-os tejet (Bio-Rad, Hercules, CA, US) vagy BSA-t (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, US) használtunk. Az immuncitokémia elvégzése a gyártó ajánlása szerint történt. A primer antitestek (autofágia markerek: microtubule-associated protein 1 light chain 3 A/B [LC3A/B]—#4108; mTOR útvonal markerei: phospho-mTOR [Ser2448]—#2971; mTOR—#2972, phospho-S6 [Ser235/236]—#2211; ribosomal S6—#2317; phospho-AMP-activated protein kinase  $\alpha$  [AMPK $\alpha$ ; Thr172]—#2535; AMPK $\alpha$ —#5831) a Cell Signaling (Danvers, MA, US) cég termékei. Immunoreaktivitás vizsgálatra a megfelelő horseradish peroxidázzal konjugált szekunder antitestet (Cell Signaling, Danvers, MA, US) használtuk. A kemilumineszcens jel detektálását a Chemidoc XRS+ műszerrel végeztük (Bio-Rad, Hercules, CA, US). A foszforilált epitópokhoz kötődő antitestek eltávolítására Pierce Stripping puffert használtunk (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US).

Az áramlási citometriás vizsgálatokhoz minden egyes kondíció esetén  $5 \times 10^5$  BV-2 sejtet permeabilizáltunk PerFix-nc kit (Beckman Coulter) segítségével a gyártó ajánlásának megfelelően. A p-S6 expresszió meghatározása direkt jelölt, monoklonális p-S6 antitesttel (Cell Signaling #5316) történt. A vizsgálat Navios áramlási citométeren (Beckman Coulter) történt, míg az adatok kiértékeléséhez a Kaluza szoftvert (Beckman Coulter) használtuk.

#### **4.8. Statisztika**

Az adatok elemzéséhez Microsoft Excel és Sigmaplot programokat használtunk. A kapott eredmények statisztikai feldolgozása során egyszerű összehasonlításhoz kétmintás t-próbát, többszörös összehasonlításhoz variancia analízist (ANOVA, Holm-Sidak-féle post-hoc analízis, SIGMASTAT, Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) használtunk. Amennyiben máshogy nem jelzem, minden adatot átlag  $\pm$  standard hiba formában adok meg.

## 5. Eredmények

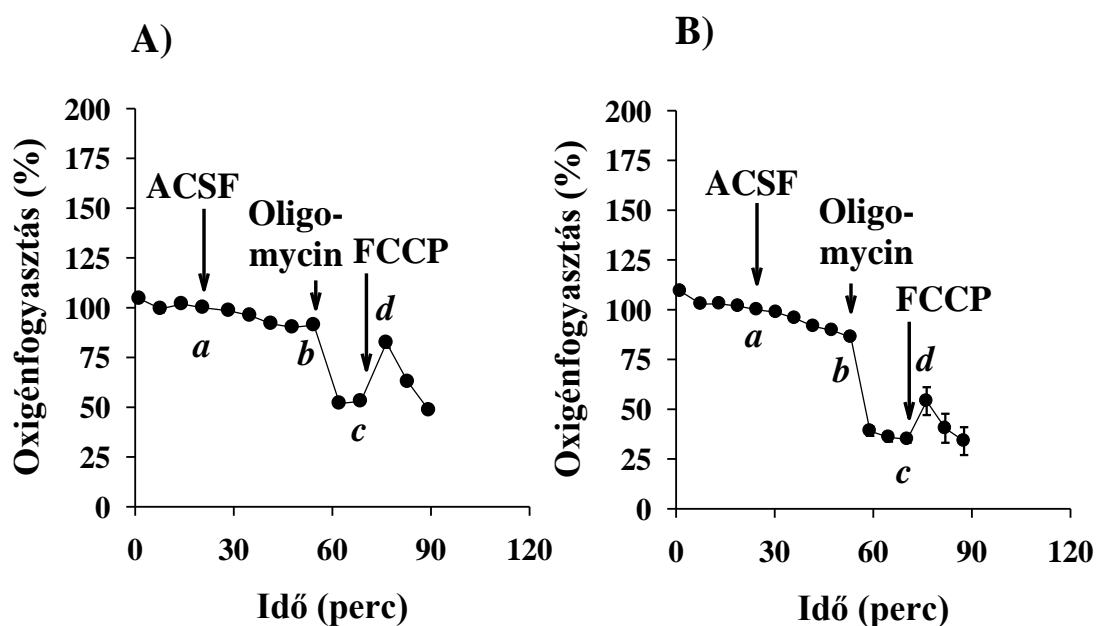
### 5.1 Mikroglia sejtek szubsztrát-preferencia vizsgálata

#### 5.1.1. Energia szubsztrátok hatása mikroglia sejtek oxigénfogyasztására és glikolízisére

A mitokondriális oxigénfogyasztás és a glikolitikus sebesség intakt sejteken történő egyidejű mérésével közvetlen információ nyerhető az energia szubsztrátok hasznosulásáról és az *in situ* mitokondriális funkciókról. Kísérleteinkben a cerebroszpinális folyadékban megtalálható energia metabolitok (glukóz, glutamin, laktát, piruvát, ketontestek) hatását vizsgáltuk primer mikroglia sejteken és a BV-2 mikroglia sejtvonalon a Seahorse XF Analyzer műszer segítségével.

Az 5. ábrán látható két görbe reprezentálja a mikroglia sejtek szubsztrátmentes ACSF-ben mért oxigénfogyasztását, egyben jelöli a respiratorikus paraméterek számításához felhasznált mérési pontokat. A mellékelt táblázatok összesítik a két sejt kultúrán, eltérő szubsztrátok jelenlétében mért respiratorikus adatokat (1. és 2. táblázat). A szubsztráthozzáadást megelőzően két órával a sejteken lévő tenyésztési médiumot csak fiziológiás sóösszetevőket tartalmazó mesterséges cerebroszpinális folyadékra (továbbiakban ACSF) cseréltük (éheztetés). A mérés első 30 percében, amely megfelelt az éheztetés utolsó fél órájának, a primer mikroglia sejtek oxigénfogyasztása  $89.76 \pm 1.08\%$ -ra, míg a BV-2 sejteké  $85.29 \pm 0.85\%$ -ra csökkent a szubsztrátmegvonás következményeként. Megállapítható, hogy a BV-2 sejtek érzékenyebbek az éheztetésre, amelyre utal a 30 percen belüli 15%-os oxigénfogyasztás-csökkenés. A mitokondriális funkciók vizsgálatára metabolikus inhibitorokat alkalmaztunk. Ilyen gátlószer az oligomycin, amellyel az ATP-szintáz és ezen keresztül a légzési lánc működését gátoltuk (1. táblázat, c sor). Az ATP szintézisére fordítódó oxigénfogyasztást a szubsztrát jelenlétében oligomycin hozzáadása előtt és után mért oxidációk különbségéből számoltuk a táblázatban látható formula segítségével (1. táblázat, b - c). A dinamikus vizsgálat során lehetőségünk volt a sejtek maximális respirációjának meghatározására. Erre a célra a mitokondriális szétkapcsolószernek nevezett FCCP-t, illetve DNP-t használtunk, amelyek a mitokondriális protongradiens megszüntetésén keresztül a légzési lánc és az ATP szintézis folyamatát egymástól függetlenné teszik, így a mitokondriális oxigénfogyasztás emelkedéséhez vezetnek. A szubsztrátmegvonás következményeként

az éhező sejtek oxigénfogyasztása FCCP-re csak kis mértékben emelkedett. Ilyen körülmények között a sejtek kizárólag endogén tartalék-tápanyagokat tudnak felhasználni oxidatív anyagcseréjük támogatására, elsősorban zsírsavakat és proteolízisen keresztül aminosavakat.



### 5. ábra

**Primer mikroglia sejtek (A) és BV-2 mikroglia sejtek (B) szubsztrát nélkül mért oxigénfogyasztását bemutató reprezentatív görbék**

Az ACSF-ben történő éheztetés körülményeinek pontos leírása a módszerek fejezetben található. Az ACSF médium, oligomycin ( $5 \mu\text{M}$ ) és FCCP ( $1,5 \mu\text{M}$ ) hozzáadását az ábrán nyilak jelölik. Az a, b, c és d betűk az 1/A, illetve 1/B táblázatban is jelölt respirációs paramétereket jelölik: a – sejtek alaplégzése, b – sejtek oxigénfogyasztása szubsztrát nélkül (kontroll sejtek esetén), c – oligomycin jelenlétében mért oxigénfogyasztás, d – FCCP jelenlétében mért maximális respiráció. Az eredmények 8 párhuzamos well oxigénfogyasztásának átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját mutatják.

## A) Primer mikroglia sejtek respirációs paraméterei

%	ACSF kontroll N=133	Glukóz N=34	Glutamin N=34	Piruvát N=40	Laktát N=41	BOHB N=38
<b>Alaplégzés szubsztrát nélkül ACSF-ben (a)</b>	100.00 ± 4.41	100.00 ± 8.88	100.00 ± 8.06	100.00 ± 7.62	100.00 ± 6.81	100.00 ± 7.05
<b>Oxigénfogyasztás szubsztráttal (b)</b>	89.76 ± 1.08	69.88 ± 4.38	115.39 ± 6.05	118.23 ± 5.65	105.32 ± 2.05	106.57 ± 2.50
<b>Respiráció oligomycin jelenlétében (c)</b>	53.92 ± 0.64	47.59 ± 3.60	59.74 ± 4.28	58.59 ± 4.14	55.48 ± 2.62	49.96 ± 3.19
<b>Maximális respiráció (d)</b>	83.29 ± 3.02	111.81 ± 5.35	148.62 ± 4.14	164.48 ± 5.91	133.37 ± 3.37	108.24 ± 5.21
<b>ATP szintézisére fordítódó respiráció (b-c)</b>	35.84 ± 1.31	22.29 ± 1.27	55.65 ± 2.62	59.64 ± 3.06	49.84 ± 1.67	56.61 ± 2.18
<b>Tartalék respirációs kapacitás (d-b)</b>	-6.47 ± 2.27	41.93 ± 3.00	33.23 ± 5.02	46.25 ± 3.03	28.05 ± 4.92	1.67 ± 7.14

**B) BV-2 mikroglia sejtek respirációs paraméterei**

%	ACSF kontroll N=116	Glukóz N=50	Glutamin N=76	Piruvát N=37	Laktát N=31	BOHB N=26
<b>Alaplégzés szubsztrát nélkül ACSF-ben (a)</b>	100.00 ± 4.46	100.00 ± 6.67	100.00 ± 5.59	100.00 ± 6.55	100.00 ± 6.94	100.00 ± 7.93
<b>Oxigénfogyasztás szubsztráttal (b)</b>	85.29 ± 0.85	61.41 ± 1.07	121.54 ± 3.78	91.78 ± 3.26	95.97 ± 3.10	98.86 ± 2.10
<b>Respiráció oligomycin jelenlétében (c)</b>	37.55 ± 0.75	37.51 ± 0.87	48.79 ± 1.42	40.00 ± 1.29	40.62 ± 1.76	44.38 ± 1.56
<b>Maximális respiráció (d)</b>	54.04 ± 2.45	80.44 ± 5.29	131.57 ± 5.19	95.15 ± 5.29	93.39 ± 5.69	81.86 ± 4.43
<b>ATP szintézisére fordítódó respiráció (b-c)</b>	47.73 ± 0.93	23.90 ± 0.85	72.75 ± 2.58	51.78 ± 2.51	55.36 ± 2.78	54.48 ± 1.86
<b>Tartalék respirációs kapacitás (d-b)</b>	-31.25 ± 2.10	19.03 ± 5.03	10.03 ± 3.18	3.37 ± 4.97	-2.58 ± 4.80	-17.00 ± 5.51

**1. táblázat**

**Primer mikroglia sejtek (1/A) és BV-2 mikroglia sejtek (1/B) alaplégzéshez viszonyított respirációs paraméter értékei (%-ban kifejezve) különböző energia szubsztrátok jelenlétében**

*A szubsztrátmentes ACSF médiumban felvett alaplégzések (a) a sejtek két órás éheztetését követően mért oxigénfogyasztását jelentik. További respirációs paraméterek: a szubsztrát jelenlétében mért oxigénfogyasztás (b), az ATP szintézisét gátló oligomycin jelenlétében mért maradék oxigénfogyasztás (c), mitokondriális szétkapcsolószert jelenlétében mért maximális oxigénfogyasztás (d), ATP szintézisére fordítódó oxigénfogyasztás (b-c) és a tartalék respirációs kapacitás (d-b). A táblázat oszlopai az egyes szubsztrát-kondíciókat jelölik, amelyek esetén az ACSF médiumhoz glukóz (10 mM), glutamin (2,5 mM), piruvát (5 mM), laktát (5 mM) vagy BOHB (5 mM) hozzáadása történt. Ezalól kivételt az ACSF*

*kontroll kondíció jelentett, ahol a szubsztrát helyett azzal megegyező mennyiségű ACSF médiumot adtunk a sejtekhez. A táblázatban megadott adatok az ACSF médiumban mért alaplégzéshez viszonyított %-os átlagértékeket  $\pm$  az átlag standard hibáját jelölik. A szürke háttérrel jelölt eredmények szignifikáns különbséget ( $P < 0.05$ ) mutatnak az ACSF kontroll értékekhez képest. A 100% respiráció  $94.98 \pm 2.58$  pmol/min/40,000 primer mikroglia sejt oxigénfogyasztásának, illetve  $160.82 \pm 4.05$  pmol/min/15,000 BV-2 mikroglia sejt oxigénfogyasztásának feleltethető meg. A táblázatban megadott eredmények kondícióként minimum 3 független kísérlet adatait tartalmazzák, amelyben N a vizsgált párhuzamos wellék számát jelöli.*



A)

**Primer mikroglia sejtek respirációs paraméterei**

<b>%</b>	<b>ACSF kontroll N=133</b>	<b>Glukóz N=34</b>	<b>Glutamin N=34</b>	<b>Piruvát N=40</b>	<b>Laktát N=41</b>	<b>BOHB N=38</b>
<b>Alaplégzés szubsztrát nélkül ACSF-ben (a)</b>	100.00 ± 4.41	100.00 ± 8.88	100.00 ± 8.06	100.00 ± 7.62	100.00 ± 6.81	100.00 ± 7.05
<b>Oxigénfogyasztás szubsztráttal (b)</b>	89.76 ± 1.08	-19.88	+25.63	+28.47	15.56	16.81
<b>Respiráció oligomycin jelenlétében (c)</b>	53.92 ± 0.64	-6.33	+5.82	+4.67	+1.56	-3.96
<b>Maximális respiráció (d)</b>	83.29 ± 3.02	+28.52	+65.33	+81.19	+50.07	+24.95
<b>Tartalék respirációs kapacitás (d-b)</b>	-6.47 ± 2.27	+48.40	+39.70	+52.72	34.52	+8.14

## B)

**BV-2 mikroglia sejtek respirációs paraméterei**

<b>%</b>	<b>ACSF kontroll N=116</b>	<b>Glukóz N=50</b>	<b>Glutamin N=76</b>	<b>Piruvát N=37</b>	<b>Laktát N=31</b>	<b>BOHB N=26</b>
<b>Alaplégzés szubsztrát nélkül ACSF-ben (a)</b>	100.00 ± 4.46	100.00 ± 6.67	100.00 ± 5.59	100.00 ± 6.55	100.00 ± 6.94	100.00 ± 7.93
<b>Oxigénfogyasztás szubsztráttal (b)</b>	85.29 ± 0.85	-23.88	+36.25	+6.49	+10.68	+13.57
<b>Respiráció oligomycin jelenlétében (c)</b>	37.55 ± 0.75	-0.04	+11.24	+2.45	+3.07	+6.83
<b>Maximális respiráció (d)</b>	54.04 ± 2.45	+26.4	+77.53	+41.11	+39.35	+27.82
<b>Tartalék respirációs kapacitás (d-b)</b>	-31.25 ± 2.10	+50.28	+41.28	+34.62	+28.67	+14.25

**2. táblázat**

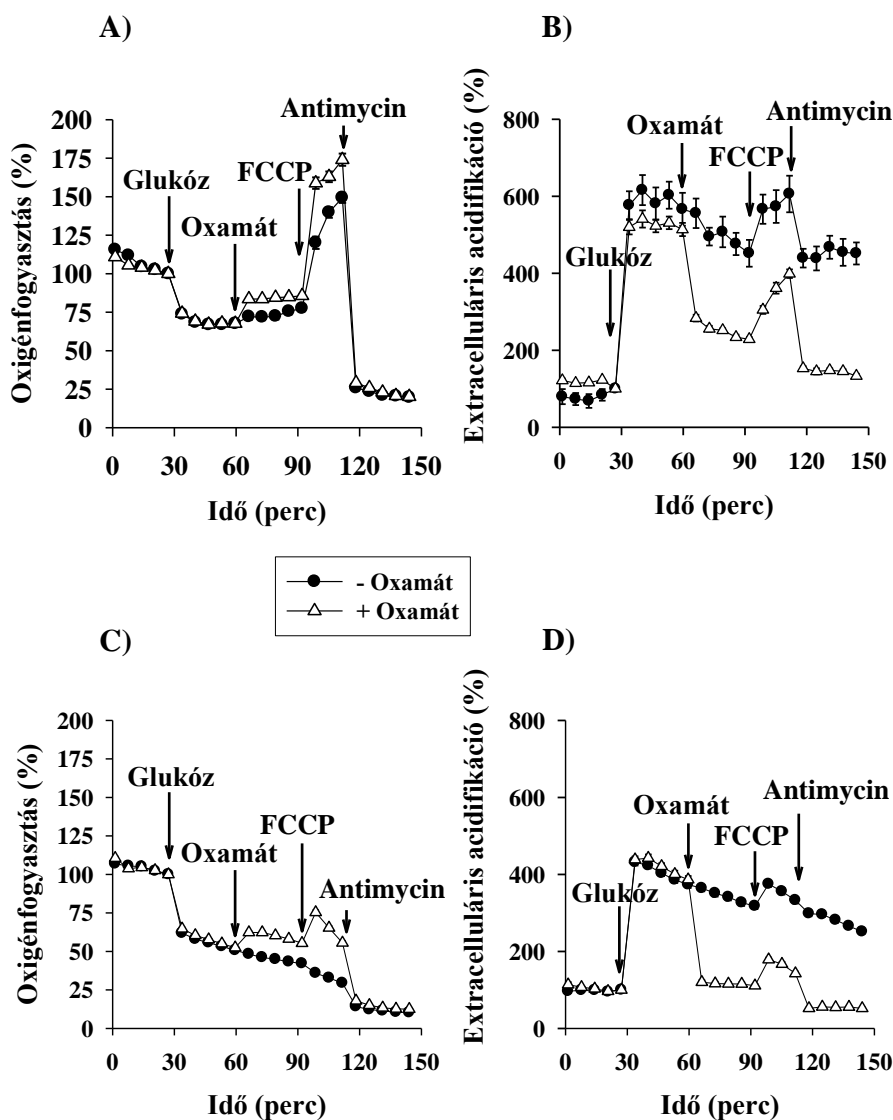
**Primer mikroglia sejtek (2/A) és BV-2 mikroglia sejtek (2/B) alaplégzéshez viszonyított respirációs paraméterei (%-ban kifejezve) különböző energia szubsztrátok jelenlétében (kalkulált értékek)**

*A 2. táblázat adatait az 1/A és 1/B táblázatokban összesített eredményekből számoltuk, amely során az 1. táblázat értékeiből kivontuk az ACSF kontroll értékeket.*

Kísérleteink során megvizsgáltuk a **glukóz**, mint az agy egyik legjelentősebb energiadonor vegyületének hatását a mikroglia sejtek metabolizmusára. 2 órás éheztetés után, glukóz hozzáadását követően a primer mikroglia sejtek alaplégzése  $69.88 \pm 4.38\%$ -ra, míg a BV-2 sejtek oxidációja  $61.41 \pm 1.07\%$ -ra csökkent. Az ATP szintézisre fordítódó oxigénfogyasztás mértéke szignifikánsan alacsonyabb volt glukóz jelenlétében, mint az ACSF-ben éhező kontroll sejteknél. FCCP hatására az oxidáció mind a primer, mind pedig a BV-2 sejtek esetében magasabb értéket ért el ( $111.81 \pm 5.35\%$  és  $80.44 \pm$

5.29%), mint a kontroll sejteknél ( $83.29 \pm 3.02\%$  és  $54.04 \pm 2.45\%$ ). Glukóz hozzáadására az oxigénfogyasztás csökkenésével párhuzamosan emelkedett a sejteken kívüli acidifikáció sebessége, amely intenzív glikolízisre utal (6. ábra).

A laktát-dehidrogenáz enzim nátrium-oxamáttal történő gátlása kis mértékben megemelte az oxidációt és a BV-2 sejteknél 100%-ban, míg a primer mikroglia sejteknél közel 50%-ban csökkentette a sejten kívüli acidifikációt. FCCP hozzáadása növelte az acidifikációt, ezen növekedés mértékével megegyező csökkenés volt tapasztalható a légzési lánc működését gátló antimycin adását követően (6. ábra).



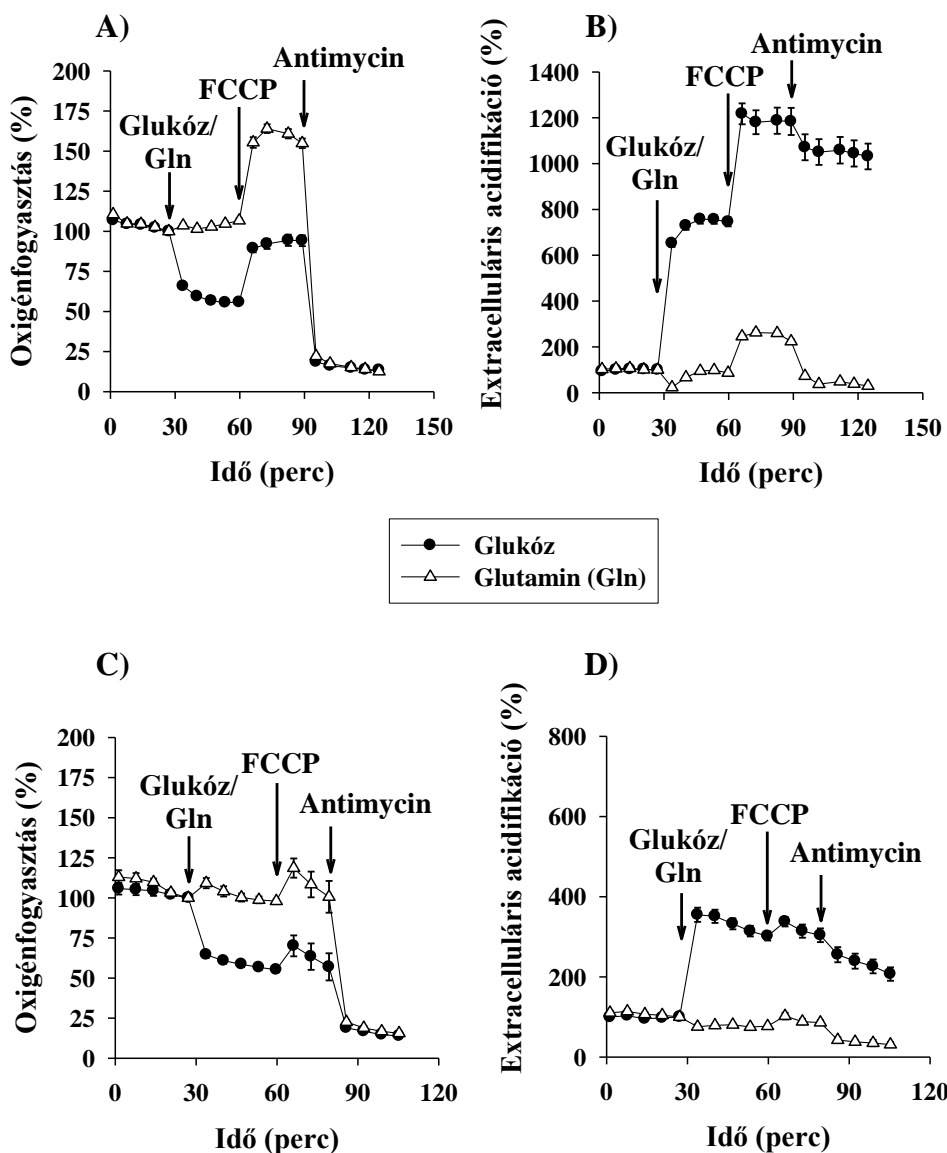
## 6. ábra

A laktát dehidrogenáz enzimet gátló oxamát hatása a primer – (A, B) és BV-2 (C, D) mikroglia sejtek glukóz jelenlétében mért oxigénfogyasztására és glikolízisére

A glukóz hozzáadása előtt a mikroglia sejteket 2 órán keresztül tápanyagmentes ACSF médiumban éhezettettük. A glukóz (10 mM), oxamát (10 mM), FCCCP (1,5  $\mu$ M) és antimycin (1  $\mu$ M) hozzáadását az ábrán nyilak jelölik. Az eredmények 3 független mérés (mérésenként 8-12 párhuzamos well) átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját mutatják.

A **glutamin** igen jelentős mennyiségben van jelen az agyban, koncentrációja a cerebrospinális folyadékban egy nagyságrenddel magasabb, mint más aminosavaké

(Albrecht és mtsai 2007, McGale és mtsai 1977). A plazmamembránon, majd a mitokondriális külső és belső membránon keresztüli transzportot követően a glutamin két lépésben  $\alpha$ -ketoglutaráttá alakul, ez utóbbi intermedier belép a citrátkörbe és a folyamat végül ATP szintézisét teszi lehetővé. Mikroglia sejtek mitokondriumában az ammóniumion felhalmozódása apoptózis indukcióját eredményezi, amennyiben a glutamin 7 mM-os koncentrációban van jelen a médiumban (Svoboda és Kerschbaum 2009). Kísérleteinkben a fiziológias körülményekhez közeli, 2.5 mM-os glutamin koncentrációt alkalmaztunk. A sejtek alaplégzését 2 órás éheztetést követően a glutamin megnövelte. Primer mikroglia sejtek esetén az oxigénfogyasztás  $115.39 \pm 6.05\%$ -ra, míg a BV-2 sejtek esetén  $121.54 \pm 3.78\%$ -ra emelkedett (1. és 2. táblázat). Az ATP-szintáz gátlása után fennmaradó oxigénfogyasztás ( $48.79 \pm 1.42\%$ ), az ún. „leak respiration”, szignifikánsan magasabb volt glutamin jelenlétében, mint a szubsztrátot nem tartalmazó, ACSF-ben inkubált kontroll sejtek esetén ( $37.55 \pm 0.75\%$ ). Ez feltehetően a mitokondriális belső membránon keresztüli transzportfolyamatok következménye. Az éhező kontroll sejtekkel összehasonlítva az FCCP hozzáadásával kiváltott maximális oxidáció szignifikánsan magasabb volt glutamin jelenlétében mind a primer-, mind a BV-2 mikroglia sejtek esetén ( $148.62 \pm 4.14\%$  és  $131.57 \pm 5.19\%$ ). A tartalék respirációs kapacitásban ugyancsak szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető glutamin jelenlétében mind a primer ( $33.23 \pm 5.02\%$ ), mind a BV-2 mikroglia sejtek esetén ( $10.03 \pm 3.18\%$ ). A mitokondriális légzési lánc gátlására a III. komplex gátlószerét használtuk, amelynek hatására az oxidáció és az acidifikáció lecsökkent. A sejten kívüli pH emelkedése a glutamin jelenlétében mérhető oxidatív dekarboxilezési folyamatok indirekt gátlásának a következménye (7. ábra).



### 7. ábra

**Glukóz és glutamin hatása szubsztrátmegvonást követően a primer – (A, B) és BV-2 (C,D) mikroglia sejtek oxigénfogyasztására és glikolízisére**

*A szubsztrát hozzáadását megelőzően a mikroglia sejteket 2 órán keresztül tápanyagmentes ACSF médiumban éhezettük. Az ábrán a glukóz (10 mM), glutamin (2,5 mM), FCCP (1,5  $\mu$ M) és antimycin (1  $\mu$ M) hozzáadását nyilak jelölik. A mérési görbék 3 független kísérlet eredményének átlagát (kísérletenként 8-12 párhuzamos well)  $\pm$  az átlag standard hibáját mutatják.*

A **piruvát** energiadonor vegyületként szolgálhat a központi idegrendszerben asztrociták és neuronok számára (Peng és mtsai 1994), azonban mikroglia sejtek piruvát felhasználására az irodalomban nem találunk példát. Kísérleteinkben a piruvát BV-2 sejtek alaplégzését a kontroll éhező sejtekhez képest kis mértékben ( $91.78 \pm 3.26\%$ ), míg a primer sejtekét jelentősen ( $118.23 \pm 5.65\%$ ) megemelte (1. és 2. táblázat). Az FCCP hozzáadásával nyert maximális respiráció a szubsztrátok közül piruvát jelenlétében volt a legmagasabb primer sejtek esetén ( $164.48 \pm 5.91$ ), míg a glutamin után a második legmagasabb BV-2 sejtek esetén ( $95.15 \pm 5.29$ ). A primer mikroglia sejtek tartalék respirációja ugyancsak piruvát esetén volt a legmagasabb ( $46.3 \pm 3.0\%$ ).

A **laktát** jelentős oxidatív szubsztrát neuronok és oligodendrociták számára (Magistretti és Allaman 2015, Rinholm és Bergersen 2014), azonban mikroglia sejtek energia metabolizmusára kifejtett hatása mindmáig ismeretlen. Kísérleteinkben a laktát a primer mikroglia sejtek alaplégzését  $105.32 \pm 2.05\%$ -ra, míg a BV-2 sejtek respirációját  $95.97 \pm 3.10\%$ -ra emelte a tápanyagmentes ACSF médiumban tartott sejtek légzéséhez képest ( $89.76 \pm 1.08\%$  és  $85.29 \pm 0.85\%$ ) (1. és 2. táblázat). Ennek az oxidációnak közel 50%-a fordítódik ATP szintézisre. Laktát jelenlétében szignifikáns emelkedés volt tapasztalható a maximális respirációban mind a primer, mind pedig a BV-2 sejtekben ( $133.37 \pm 3.37\%$  és  $93.39 \pm 5.69\%$ )

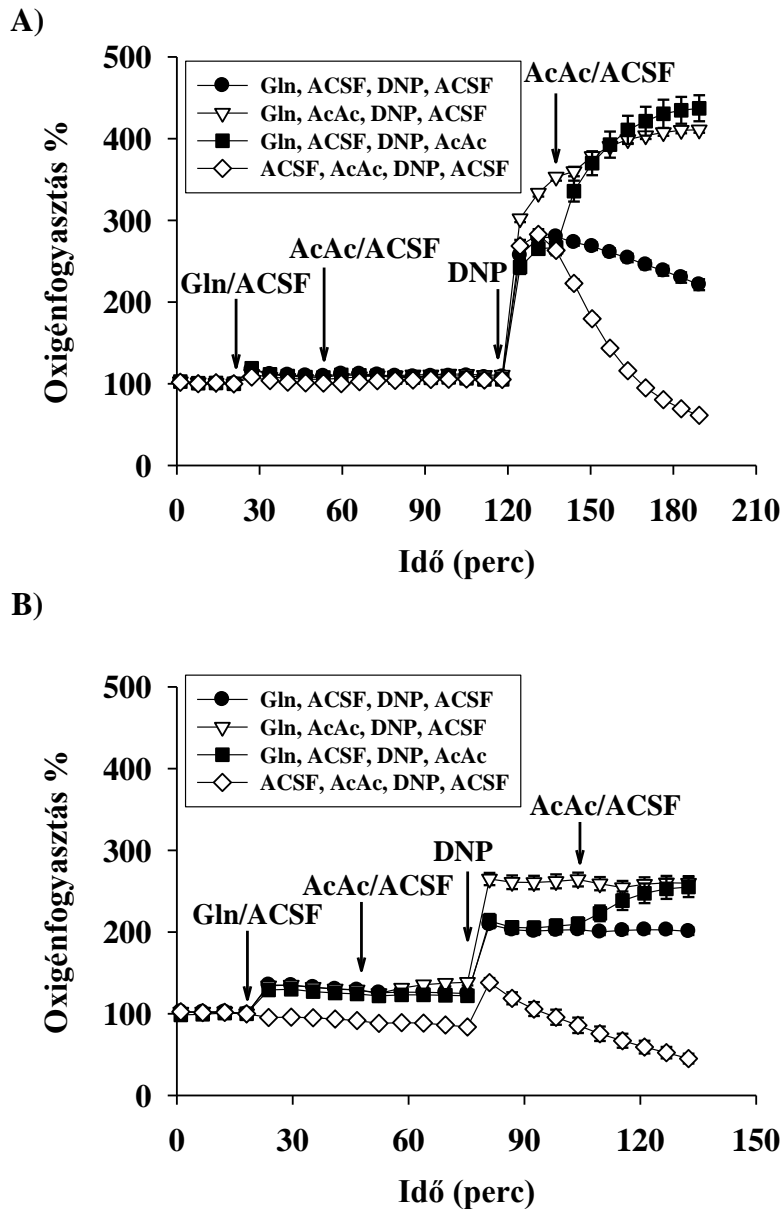
A **ketontestek** alternatív energiaforrásként szolgálhatnak energia-deficit állapotban lévő sejtek számára (Izumi és mtsai 1998, Owen és mtsai 1967), azonban hasznosulásuk a mikroglia sejtekben mindmáig ismeretlen. A BOHB metabolizmusának első lépésében acetoacetát keletkezik, amely utóbbi továbbalakulásához szukcinil-KoA szükséges. Az acetoacetátot szukcinil-KoA jelenlétében a szukcinil-KoA/ $\beta$ -ketoacil-KoA-transzferáz enzim acetoacetyl-KoA-vá alakítja, amely két Ac-KoA formájában belép a citrát-körbe és az oxidatív foszforiláción keresztül energiatermelésre fordítódik. Kísérleteinkben a ketontestek közül  $\beta$ -hidroxibutirátot (továbbiakban BOHB) és acetoacetátot használtunk mikroglia sejtek oxidatív anyagcseréjének támogatására. Az alaplégzést mindkét ketontest képes volt kis mértékben emelni. Az oligomycin-szenzitív oxigénfogyasztás primer sejt kultúrán BOHB jelenlétében volt a legmagasabb ( $56.61 \pm 2.18\%$ ). A maximális légzés is szignifikánsan magasabb volt az éhező kontroll sejtekhez képest (1. és 2. táblázat).

### ***5.1.2. Energia szubsztrát-kombinációk hatása mikroglia sejtek oxigénfogyasztására***

#### **5.1.2.1. Acetocetát / BOHB és glutamin hatása a mikroglia sejtek anyagcseréjére**

Megvizsgáltuk a ketontestek hatását a glutamin jelenlétében mérhető oxigénfogyasztásra. Ahhoz, hogy a ketontestek hasznosuljanak a mikroglia sejtek anyagcseréje során, megfelelő citrát-köri aktivitásra van szükség. A glutamin anaplerotikus úton feltölti a citrát-ciklust és ezúton segíti a ketontestek katabolizmusát. Kísérleteinkben az acetoacetát 60%-kal fokozta primer sejtek, valamint 20%-kal a BV-2 mikroglia sejtek esetén glutamin és szétkapcsolószer jelenlétében mérhető maximális oxigénfogyasztást (8. ábra). Hasonló eredményeket kaptunk BOHB szubsztrát esetén is.





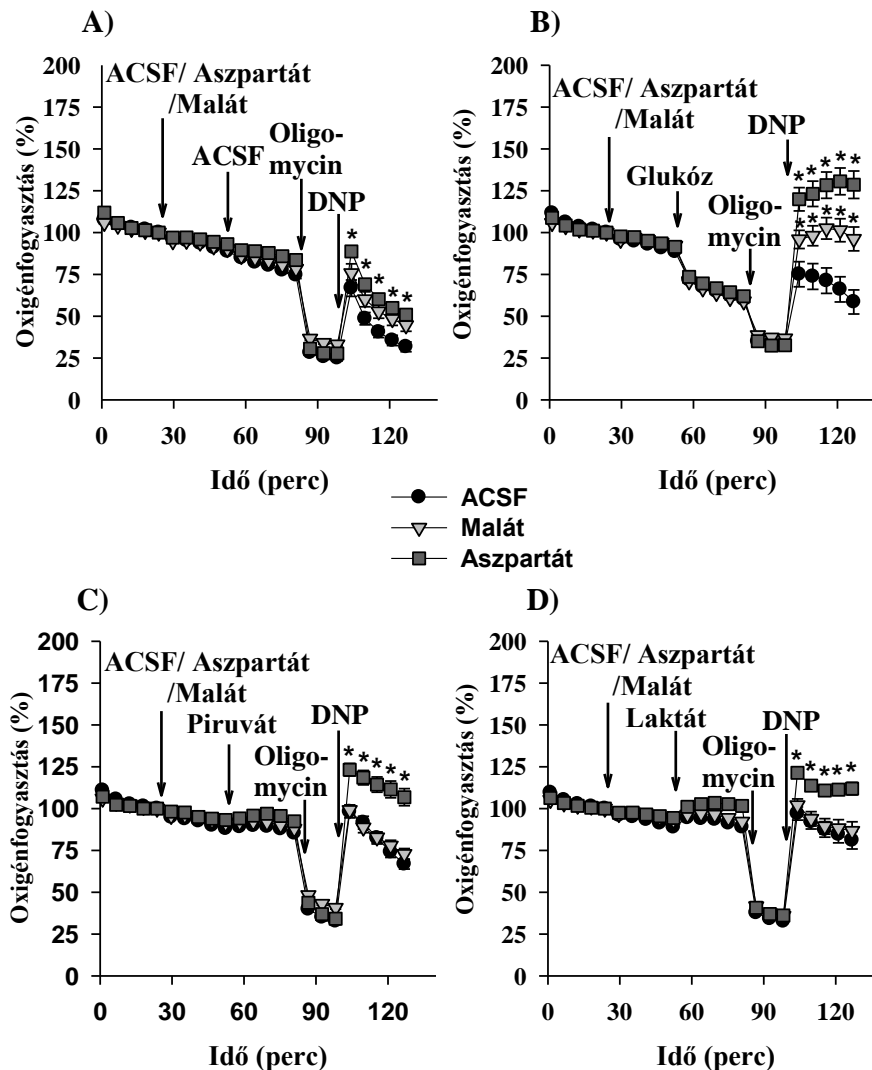
### 8. ábra

#### Acetoacetát hatása a primer – (A) és BV-2 (B) mikroglia sejtek glutamin jelenlétében mért oxigénfogyasztására

A primer - és BV-2 mikroglia sejteket a glutamin hozzáadását megelőzően 2 órán keresztül szubsztrátmentes ACSF médiumban inkubáltuk a módszerek fejezetben leírtak alapján. A nyilak az ábrán az ACSF médium, glutamin (Gln - 2,5 mM), acetoacetát (AcAc – 5 mM) és DNP (100  $\mu$ M) hozzáadását jelölik. A mérési pontok 8-12 párhuzamos well átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját mutatják.

### **5.1.2.2. Malát/aszpartát hatása a glukóz/piruvát/laktát jelenlétében mérhető oxigénfogyasztásra**

A ketontestek és a glutamin kombinációjával kapott eredmények jól tükrözik az anaplerotikus folyamatok fontosságát éhező sejtekben. Így további kísérletekben vizsgáltuk a malát és aszpartát hatását a katabolizmus során Ac-KoA-t eredményező szubsztrátok jelenlétében mérhető oxigénfogyasztásra. Aszpartáttal szignifikáns növekedést tapasztaltunk a maximális respirációban mind glukóz, piruvát és laktát esetén. A malátot kizárólag glukózzal kombinálva kaptunk szignifikáns emelkedést a szétkapcsolószert jelenlétében mérhető maximális légzésben (9. ábra).



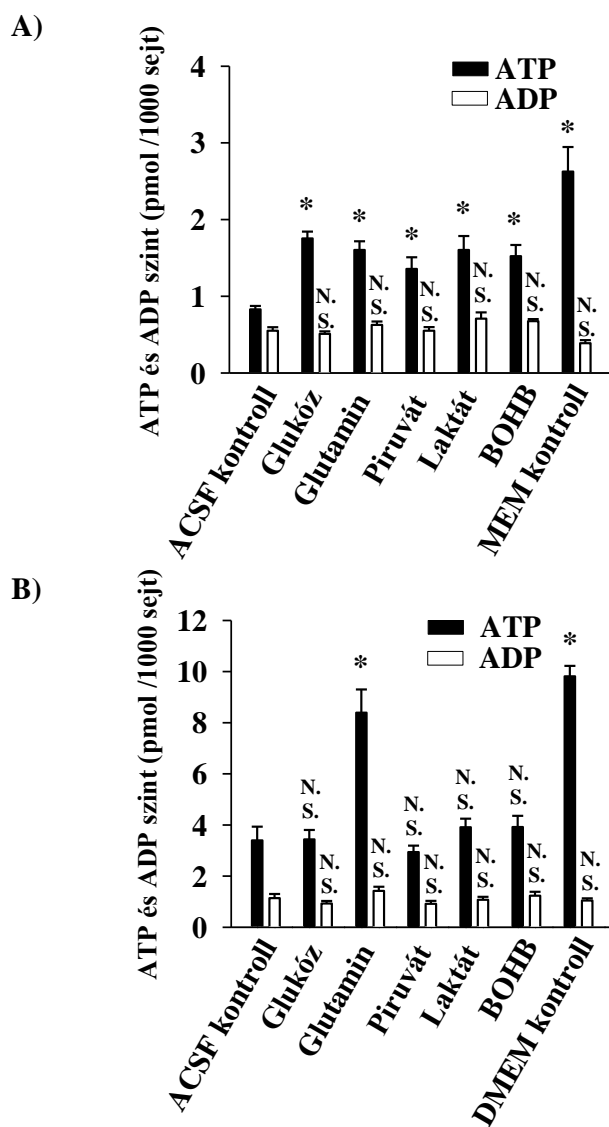
### 9. ábra

Aszpartát és malát hatásának vizsgálata BV-2 sejtek oxigénfogyasztására szubsztrátmentes ACSF médiumban (A), glukóz (B), piruvát (C) és laktát (D) jelenlétében

A BV-2 mikroglia sejtek éheztetése a módszerek részben leírtak alapján történt. Az ACSF médium, aszpartát (5 mM), malát (5 mM), glukóz (10 mM), piruvát (5 mM), laktát (5 mM), oligomycin (5  $\mu$ M) és DNP (100  $\mu$ M) hozzáadását az ábrán nyilak jelölik. Az eredmények 3 független kísérlet (mérésenként 12-15 párhuzamos well) átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját mutatják. A\* szignifikáns különbséget jelöl az ACSF kontrollhoz képest ( $p < 0.05$ ).

### ***5.1.3. Energia szubsztrátok hatása mikroglia sejtek intracelluláris ATP és ADP szintjére***

A mikroglia sejtek kétórás ACSF médiumban történő éheztetését követően vizsgáltuk a szubsztrátok intracelluláris ATP és ADP szintekre kifejtett hatását. A primer és BV-2 mikroglia sejteket az éheztetést követően további két órán keresztül inkubáltuk valamely szubsztráttal kiegészített ACSF-ben. Kontrollként a sejteket 4 órán keresztül inkubáltuk ACSF médiumban, amely mind a primer, mind pedig a BV-2 mikroglia sejtek ATP szintjében szignifikáns csökkenést eredményezett, míg az intracelluláris ADP szint változatlan maradt (10. ábra). A vizsgált szubsztrátok jelenlétében a primer mikroglia sejtek ATP szintjében szignifikáns eltérést tapasztaltunk az éhező kontroll sejtekhez képest. A BV-2 mikroglia sejtek jóval érzékenyebbek voltak az éheztetésre, a glutamin volt az egyedüli szubsztrát, amely jelenlétében a mikroglia sejtek ATP szintjében eltérést tapasztaltunk a szubsztrátot nem tartalmazó ACSF médiumban inkubált sejtekhez képest. Glutamin, mint egyedüli szubsztrát mellett a BV-2 sejtek képesek voltak a tenyészmédiumban tartott sejteknek megfelelő ATP szintet fenntartani. Glukóz, piruvát, laktát és ketontest jelenlétében azonban a BV-2 sejtek ATP szintje az éhező sejtek ATP szintjével volt megegyező.



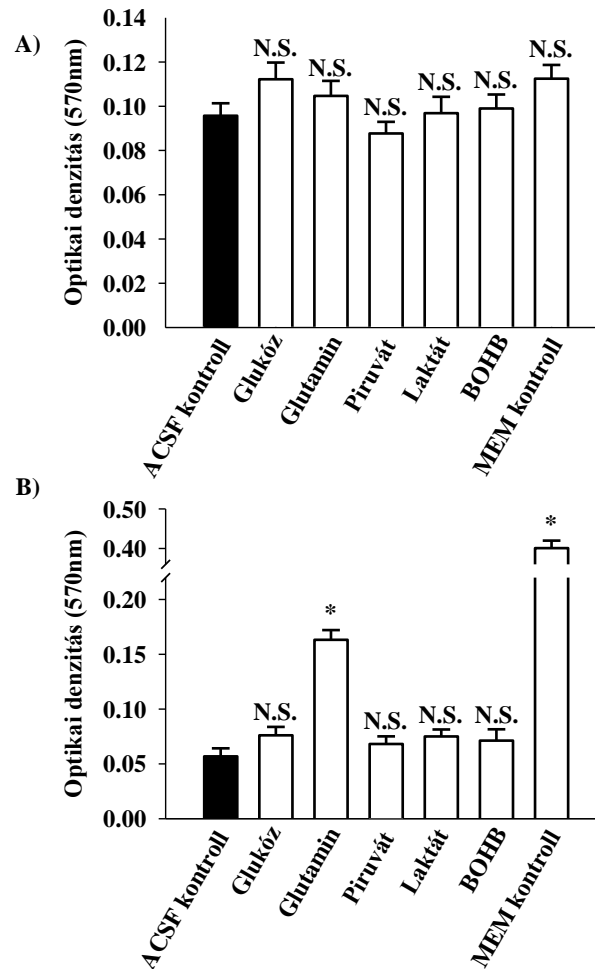
10. ábra

**Energia szubsztrátok hatása a primer – (A) és BV-2 (B) mikroglia sejtek éheztetést követő intracelluláris ATP és ADP szintjére**

Az éheztetés pontos körülményeit, valamint a kiültetett sejtszámot a módszerek fejezet tartalmazza. Az eredmények 1000 db sejtre számított, anyagmennyiségben [pmol] megadott adatokat jelölnek. Az ACSF kontroll sejteket szubsztrátmentes ACSF-ben inkubáltuk, míg a MEM/DMEM kontroll sejteket a mérés alatt tenyészmédiumban tartottuk. Az ábra 3 független kísérletből származó eredmények átlagát (mérésenként 6-8 párhuzamos well)  $\pm$  az átlag standard hibáját mutatja. A \* szignifikáns különbséget jelöl az ACSF kontrollhoz képest ( $p < 0.001$ ), míg az N.S. rövidítés nem szignifikáns hatást mutat.

#### ***5.1.4. Energia szubsztrátok hatása mikroglia sejtek viabilitására***

Feltételezhető, hogy az energia szubsztrátok átmeneti megvonása jelentős hatással van a sejtek viabilitására. Sejtek életképességének mérésére alkalmas a módszerekben részletezett MTT teszt, amely információt nyújt az intracelluláris redukált koenzimek mennyiségéről, így a sejt viabilitásával összefüggésbe hozható redukációs kapacitásáról. A szubsztrátot nem, csak fiziológias sóösszetevőket tartalmazó ACSF-ben tartott sejtek viabilitásában szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a tenyészmédiumban tartott sejtekhez képest (11. ábra). A szubsztrátok hatását vizsgálva az intracelluláris ATP szintek változásához hasonló eredményeket kaptunk a primer és BV-2 mikroglia sejtek életképességében. A primer sejtek kevésbé szenzitív módon reagáltak a szubsztrátmegvonásra, míg a BV-2 sejtekben az éhezés jelentős viabilitás csökkenést eredményezett. Glutamin jelenlétében azonban a BV-2 sejtek viabilitása szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint az ACSF-ben éhező sejtek esetén.



### 11. ábra

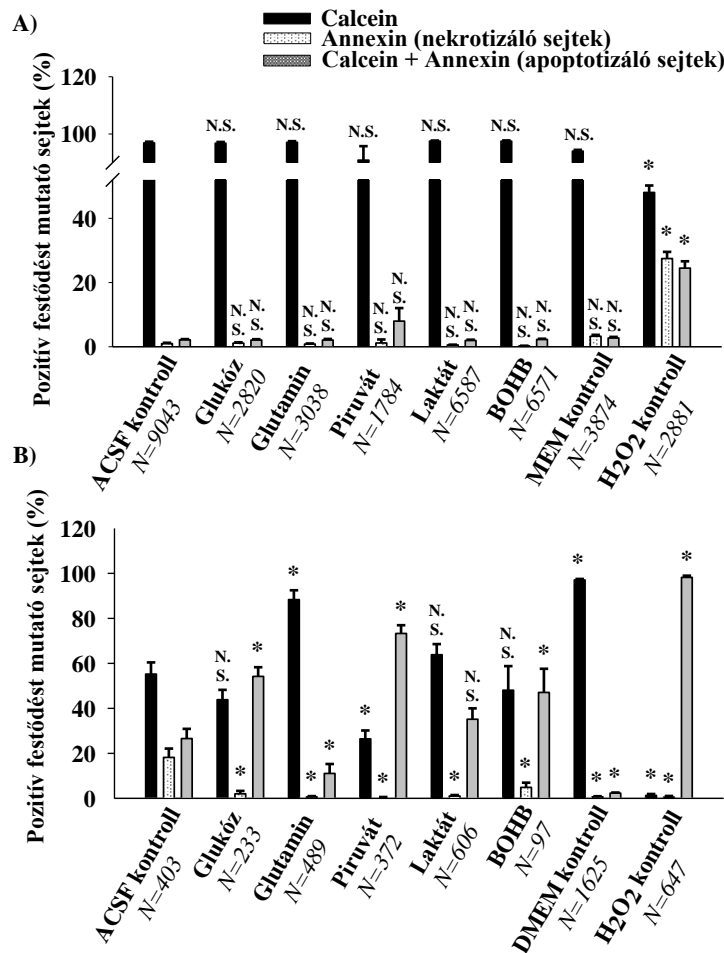
#### Energia szubsztrátok hatása a primer – (A) és BV-2 (B) mikroglia sejtek éheztetést követő viabilitására

A sejt viabilitásáról információt nyújtó MTT redukciós kapacitás meghatározása és a mikroglia sejtek éheztetése a módszerekben leírt módon történt. Kontrollnak a mérés végéig tápanyagmentes ACSF-ben inkubált sejtek (ACSF kontroll) és a mérés végéig tenyészmédiumban tartott sejtek (DMEM/MEM kontroll) szolgáltak. Az eredmények 3 független kísérlet átlagát (mérésenként 18-24 párhuzamos well)  $\pm$  az átlag standard hibáját mutatják. A\* szignifikáns különbséget jelöl az ACSF kontrollhoz képest ( $p < 0.001$ ), míg az N.S. rövidítés nem szignifikáns hatást mutat.

### ***5.1.5. Energia szubsztrátok hatásának vizsgálata a mikroglia sejtek apoptózisára és nekrozisára***

Energiadonor vegyületek hiányában a sejtekben apoptotikus, illetve nekrotikus folyamatok mennek végbe. Kísérleteinkben az apoptózis és nekrozis indukcióját az Annexin V-352 Cy3.18 és a calcein-acetoxi-metilészter fluoreszcens kettős festéssel követtük nyomon. Pozitív kontrollt a sejtek 400  $\mu$ M hidrogén-peroxiddal történő kezelése jelentett, amely a primer sejtek 25-25%-ában indukált apoptózist, illetve nekrozist, míg a BV-2 sejtek közel 100%-ában apoptózist (12. ábra). Az éheztetés és a szubsztráthatás következményeit tekintve az ATP és viabilitás vizsgálatokkal összhangban álló eredményeket kaptunk. Az energiadonor szubsztrátok négy órán keresztüli megvonása a primer mikroglia sejtek 1-5%-ában eredményezte apoptózis/nekrozis megjelenését, míg a sejtek 95-99%-a intakt plazmamembránra utaló calcein festődést mutatott. A BV-2 mikroglia sejtek azonban jóval érzékenyebben reagáltak a szubsztrátmegvonásra, az ACSF-ben történő éheztetés apoptotikus és nekrotikus folyamatok indukálásához vezetett. A szubsztrátok közül kiemelkedő hatást mutatott a glutamin. Glutamin jelenlétében a BV-2 sejtek közel 90%-a mutatott calcein pozitivitást, míg a sejtek alig 10%-ában jelent meg apoptózis, amely szignifikáns eltérés az éhező sejteknél detektált 25%-os apoptotikus hányadhoz képest. Glukóz, piruvát, laktát és ketontest jelenlétében a BV-2 sejtek csak calcein festődést mutató hányada nem emelkedett a kontroll éhező sejtekéhez képest.





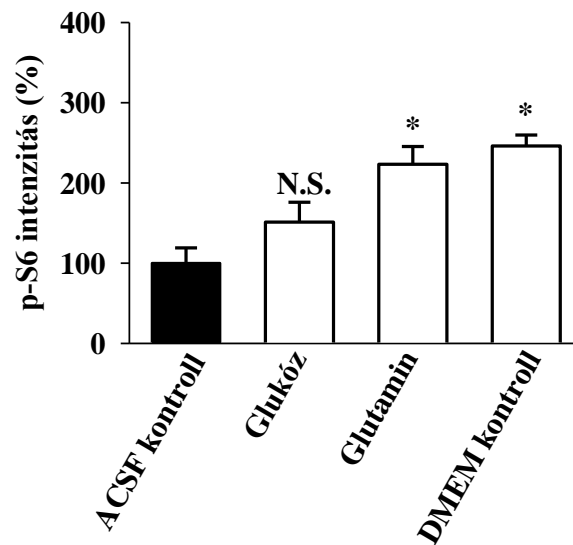
## 12. ábra

### Energia szubsztrátok hatása a primer – (A) és BV-2 (B) mikroglia sejtek apoptózisára és nekrozisára

Az y tengelyen feltüntetett értékek az annexin/calcein pozitív fluoreszcens festődést mutató sejtek %-os arányát jelölik. 100%-nak megfelelő egy adott szubsztrát kondíció esetén az összes detektált sejt száma. A mikroglia sejtek éheztesítésének körülményeit a módszerek részben leírtak tartalmazzák. Kontrollnak a mérés végéig tápanyagmentes ACSF-ben inkubált sejtek (ACSF kontroll) és a mérés végéig tenyészmédiumban tartott sejtek (DMEM/MEM kontroll) szolgáltak. N jelöli a detektált sejtek számát. Az eredmények 3 független kísérlet átlagát (mérésenként 18-24 párhuzamos well)  $\pm$  az átlag standard hibáját mutatják. A\* szignifikáns különbséget jelöl az ACSF kontrollhoz képest ( $p < 0.001$ ), míg az N.S. rövidítés nem szignifikáns hatást mutat.

### ***5.1.6. Energia szubsztrátok hatása az mTOR és AMPK fehérjék foszforilációjára, valamint a p-S6 fehérje szintjére***

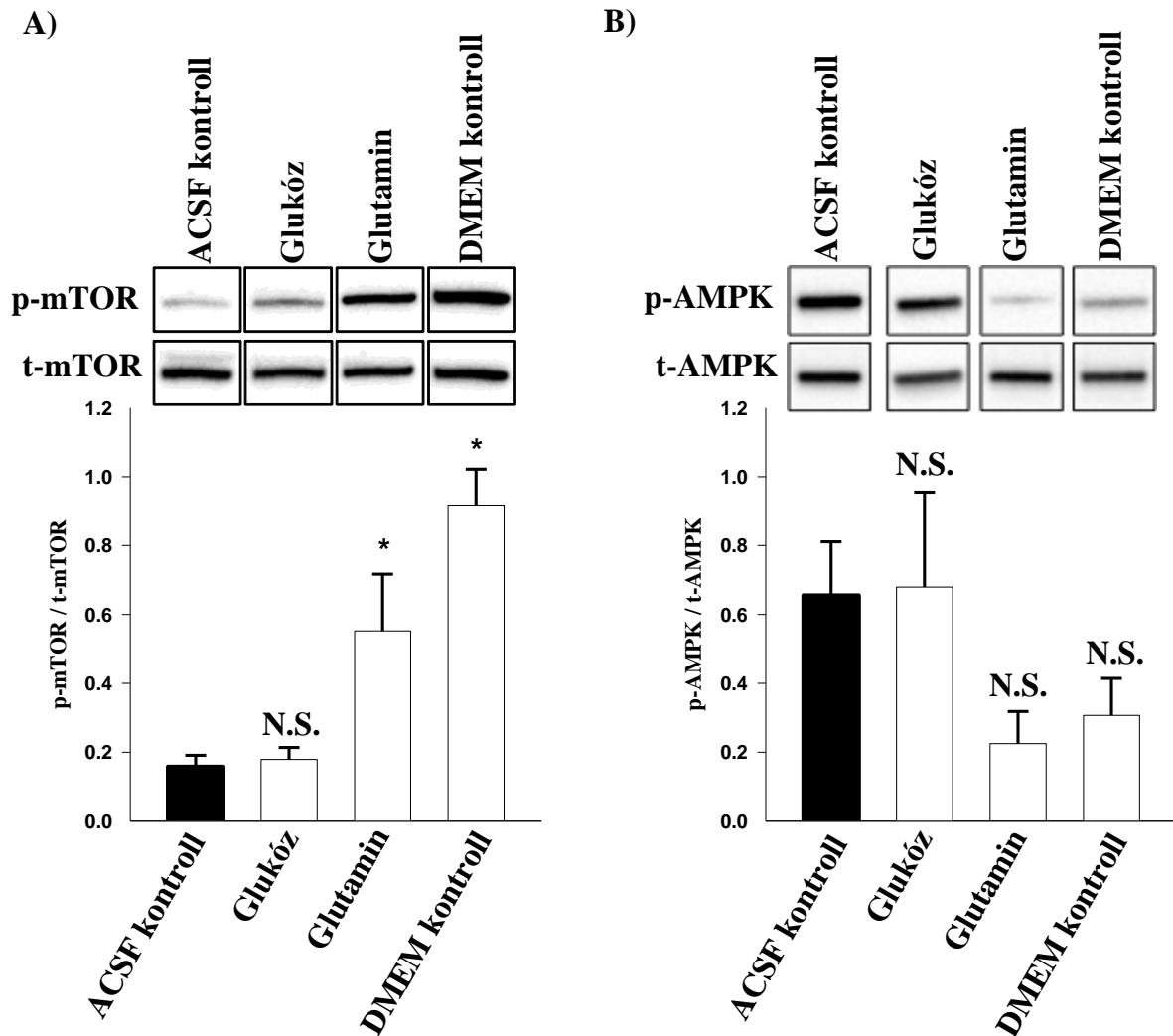
A citoplazmatikus mTOR fehérje C1 komplexe, valamint az AMPK fehérje jelentős szerepet tölt be a sejt anabolikus és proliferációs folyamatainak szabályozásában (Morita és mtsai 2015). Irodalmi adatok bizonyítják, hogy aminosavak hiánya az mTOR C1 komplex gátlásához vezetnek (Bar-Peled és mtsai 2012, Sancak és mtsai 2008). Újabb érdekesség továbbá, hogy a lizoszómális SLC38A9 transzporter aminosavak (glutamin és arginin) molekuláris szenzoraként funkcionál és szabályozza (aktiválja vagy gátolja) az mTOR fehérjét foszforiláló mTOR kinázt (Rebsamen és mtsai 2015, Wang és mtsai 2015). Az mTOR útvonal fehérjéinek vizsgálatára Western-blot kísérleteket végeztünk, amely során az oxidációs vizsgálatok alapján a BV-2 mikroglia sejtek számára legfontosabb oxidatív szubsztrát (glutamin) és glikolítikus szubsztrát (glukóz) hatását vizsgáltuk az éheztetett kontroll (ACSF kontroll) és tenyészmédiumban tartott kontroll sejtekhez képest. A kísérletek során meghatároztuk az mTOR fehérje foszforilált (p-mTOR) formájának mennyiségét a foszforilált és nem foszforilált fehérjék összmennyiségéhez képest (t-mTOR). Az mTOR C1 komplex foszforilációt követően az S6 kinázon keresztül szabályozza a sejt fehérjeszintézisét, ezért FACS vizsgálatokat végeztünk a foszforilált S6 fehérje (p-S6) mennyiségének meghatározására. Az ACSF kontroll sejtek esetén mind a p-S6 mennyisége, mind pedig a p-mTOR/t-mTOR arány alacsonyabb, mint a DMEM-ben tartott sejtek esetén, mindez utal az éheztetés következtében kialakuló csökkent fehérjeszintézisre (13. és 14. ábra). A p-S6 fehérje mennyisége ugyan szignifikánsan magasabb érték, mint az ACSF kontroll sejtekben, azonban nem éri el a DMEM-ben tartott sejtekét. A foszforilált AMPK/teljes AMPK fehérjearányban (pAMPK/tAMPK) nem látható szignifikáns különbség a szubsztrátok és az ACSF kontroll között, a p-AMPK/t-AMPK azonban alacsonyabb glutamin esetén, mint az éheztetett sejtekben (14. ábra).



### 13. ábra

#### Glukóz és glutamin hatása BV-2 mikroglia sejtek p-S6 fehérjeszintjére

Az ábrán fluoreszcens anti p-S6 festést követő áramlási citometriás mérés (módszerek részben leírtak szerint) eredményei láthatók. Az oszlopdiagram 3 független kísérlet mérési eredményeinek átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját mutatják %-ban kifejezve, amelyben a 100% az ACSF kontrollnak felel meg. A \* szignifikáns különbséget jelöl az ACSF kontrollhoz képest ( $p < 0.002$ ), míg az N.S. rövidítés nem szignifikáns hatást mutat.



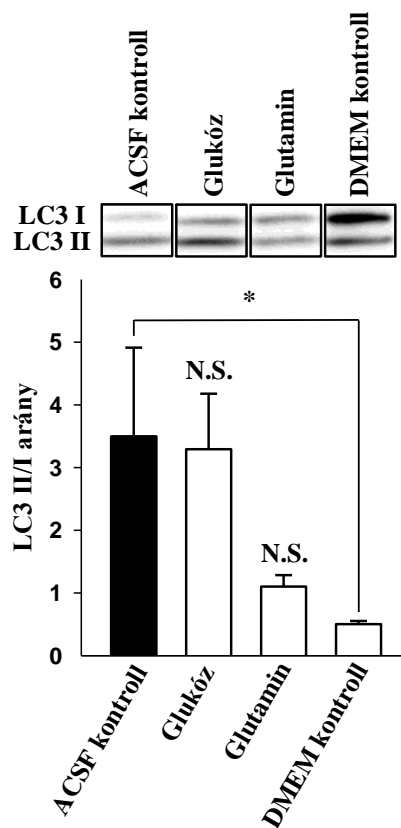
14. ábra

### Glukóz és glutamin hatása az mTOR (A) és AMPK (B) fehérjék foszforilációjára BV-2 mikrogliá sejtekben

Az mTOR és AMPK fehérjék foszforilációjának vizsgálata Western-blot mérésekkel történt a módszerek fejezetben leírtak szerint. A foszforilált mTOR (p-mTOR) és AMPK (p-AMPK) teljes fehérjemennyiséghez ( t-mTOR és t-AMPK) viszonyított mennyiség arányának meghatározása denzitometriás vizsgálat alapján történt. Az ábrán bemutatott eredmények legalább 3 független kísérlet átlagértékeit  $\pm$  az átlag standard hibáját mutatják. A \* szignifikáns különbséget jelöl az ACSF kontrollhoz képest ( $p < 0.001$ ), míg az N.S. rövidítés nem szignifikáns hatást mutat.

### 5.1.7. Autofágia vizsgálata mikroglia sejtekben

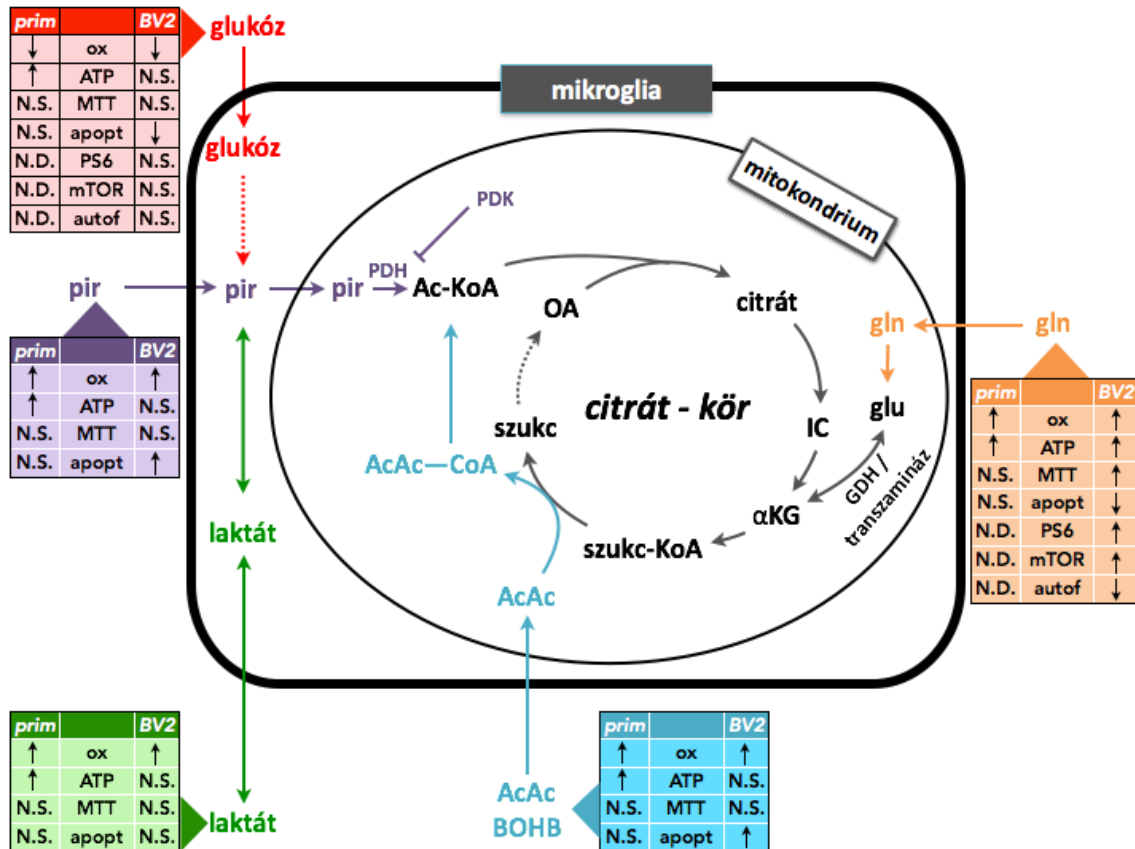
A sejtek fiziológiás/patológiás folyamatai közül az éhezés, különösen az aminosavak hiánya az autofágia egyik legjelentősebb kiváltó oka. Az autofágia vizsgálatára leggyakrabban használt markerek az LC3 II és LC3 I fehérjék. BV-2 sejtek szubsztrátmentes ACSF-ben történő inkubációja során az LC3 II és LC3 I fehérjék aránya szignifikánsan megemelkedett, amely intenzív autofágiára utal (15. ábra). Sem glukóz, sem glutamin jelenlétében nem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést az autofágia aktivitásában az éhező kontroll sejtekhez képest, azonban glutamin nem szignifikáns módon, de csökkentette az önmérsztési folyamatokat BV-2 sejtekben.



15. ábra

#### Energia szubsztrátok hatása BV-2 mikroglia sejtek autofágia aktivitására

LC3 II/I fehérjearány meghatározása a módszerekben leírt módon Western-blot analízissel történt. Az ábrán bemutatott eredmények 3 független kísérlet átlagértékeit  $\pm$  az átlag standard hibáját mutatják. A\* szignifikáns különbséget mutat az ACSF kontrollhoz képest ( $p=0.012$ ), míg az N.S. rövidítés nem szignifikáns hatást jelöl.



16. ábra

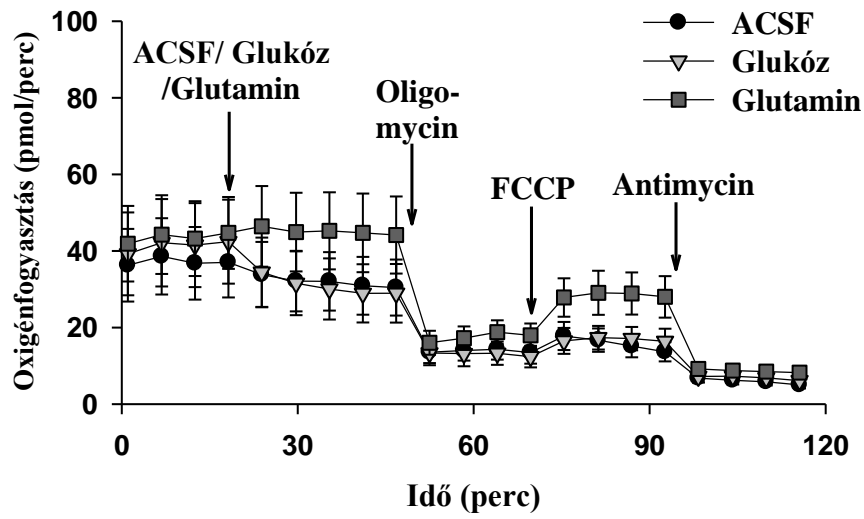
### Mikroglia sejtek bioenergetikai vizsgálata – primer és BV-2 sejteken kapott eredmények összefoglaló ábrája

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

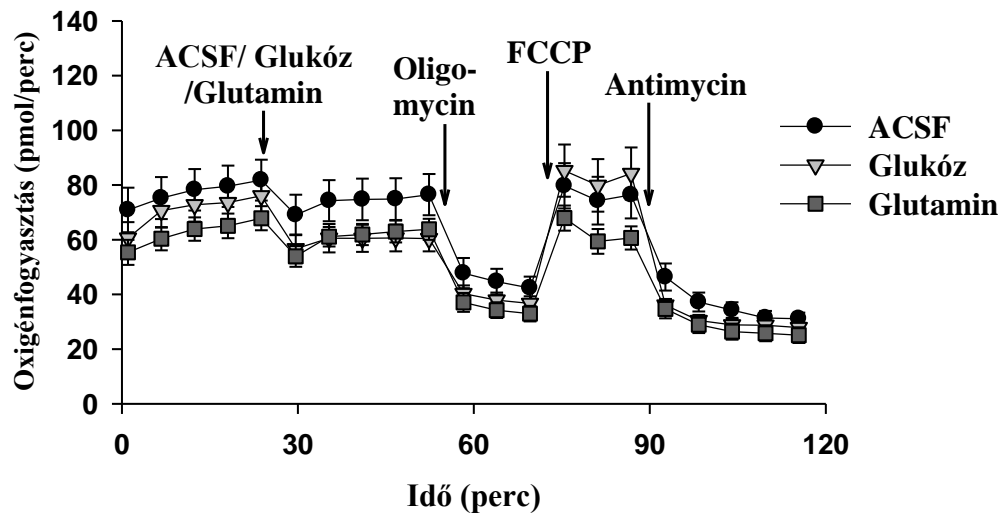
## 5.2 Neuronális őssejtek, neuronok és asztroglia sejtek szubsztrát-hasznosításának összehasonlító vizsgálata

A neuronális differenciáció metabolikus aspektusainak vizsgálatára *in vitro* kísérleteket végeztünk nem indukált NE-4C neuronális őssejteken, illetve retinsavval indukált NE-4C progenitor sejteken. Az összehasonlító vizsgálat részeként embrionális (E15-16) egér előagyból izolált primer neuronális sejt kultúrán is végeztünk kísérleteket. A sejtek oxigénfogyasztásának vizsgálatát a központi idegrendszerben fiziológias körülmények között előforduló két leggyakoribb energia metabolit, a glukóz és a glutamin jelenlétében végeztük a módszerek részben leírtak alapján. A szubsztráthozzáadást megelőzően a sejtek két órán keresztül csak fiziológias sóösszetevőket tartalmazó ACSF médiumban éheztek. A neuronális őssejtek, neuronok és asztroglia sejtek mitokondriumainak intakt működéséről a mikroglia sejteknél megismert módon információ nyerhető a mitokondriális légzési lánc és oxidatív foszforiláció gátlószereinek, szétkapcsolószereinek használatával, valamint az így nyert respiratorikus paraméterek vizsgálatával. A korábbi publikációkkal (Folmes és mtsai 2012, Xun és mtsai 2012, Zadori és mtsai 2011) összefüggésben áll a kapott eredmény (17. ábra), amely szerint a három vizsgált sejtípus közül a nem indukált NE-4C őssejtek ACSF médiumban mért alaplégzése a legalacsonyabb ( $48,17 \pm 3,02$  pmol/perc/15 000 sejt;  $n=28$ ), az NE-4C őssejtekből differenciálódott neuronok oxigénfogyasztása magasabb ( $101,49 \pm 10,1$  pmol/perc;  $n=23$ ), míg a primer neuronális tenyészetben mért oxigénfogyasztás mintegy négyszerese volt az őssejteknél mért értékeknek ( $204,67 \pm 9,79$  pmol/perc;  $n=46$ ). Fontos azonban megjegyezni, hogy a sejtek alaplégzésében mért különbségek direkt összehasonlításánál figyelembe kell venni a differenciálódás miatti nehezen kontrollálható sejtszámot. Az éhező sejtek alaplégzését a glukóz legnagyobb mértékben a neuronális őssejtekben csökkentette. Az ATP- szintázt gátló oligomycin az oxigénfogyasztást csökkentette, a csökkenés mértéke azonban jelentősen nagyobb volt a differenciált sejtek esetén, mint a nem differenciált sejtekben. A mitokondriális szétkapcsolószert a protonmotoros erő megszüntetésén keresztül a mitokondriális oxidációt fokozta, majd a sejtekhez ezután adott antimycin az oxigénfogyasztást minimálisra csökkentette. Ezek az eredmények a mitokondriális integritásra, aktív mitokondriális funkcióra utalnak (17. ábra).

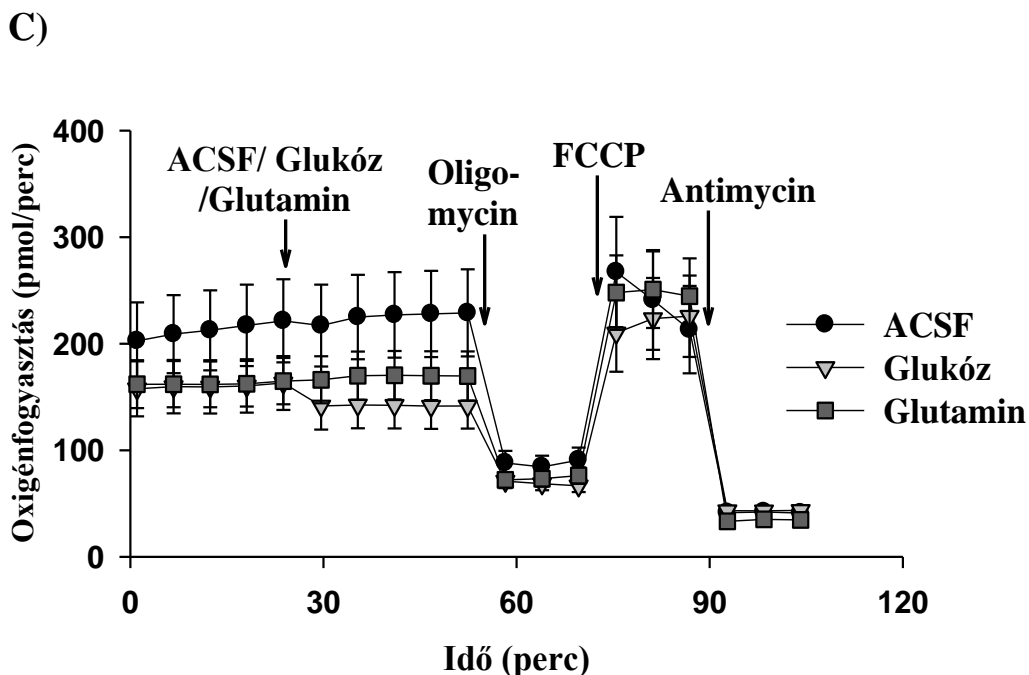
A)



B)





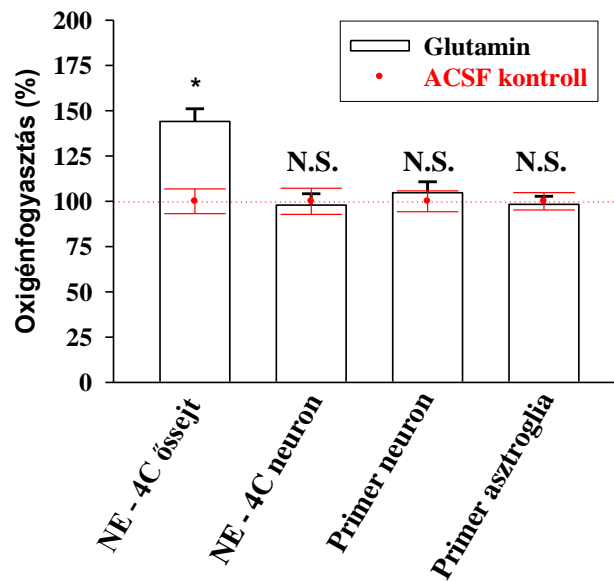


17. ábra

Glukóz és glutamin NE-4C neuronális őssejtek (A), NE-4C neuronok (B) és primer neuronális sejtek (C) oxigénfogyasztására gyakorolt hatását bemutató reprezentatív ábrák

Az NE-4C neuronális őssejtek, illetve NE-4C neuronok és primer neuronok éheztetése a mikroglia sejtekkel megegyezően, a módszerek részben leírtak alapján történt. Az ACSF médium, glukóz (10 mM), glutamin (2,5 mM), oligomycin (5  $\mu$ M), FCCP (1,5  $\mu$ M) és antimycin (1  $\mu$ M) hozzáadását az ábrán nyilak jelölik. Az eredmények sejtípusonként és kondíciónként  $n \geq 7$  sejtenyészet pmol/percben megadott oxigénfogyasztásának átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját mutatják.

A fiziológias körülmények között rendelkezésre álló szubsztrátok közül a glutamin hatásának összehasonlító vizsgálatát is elvégeztük a különböző sejt kultúrákon, kísérletekeinket ez esetben kiterjesztettük primer asztroglia sejtekre is. A vizsgált négy sejtípus közül a szubsztrátot nem tartalmazó ACSF médiumban éhező sejtek alaplégzéséhez viszonyítva szignifikáns eltérés látható a NE-4C neuronális őssejtek esetén glutamin hozzáadásra (18. ábra).



### 18. ábra

**Glutamin éheztetett NE-4C neuronális őssejtek, NE-4C neuronok, primer neuronális sejtek és primer asztroglia sejtek oxigénfogyasztására gyakorolt hatásának összehasonlító vizsgálata**

Az NE-4C neuronális őssejtek, NE-4C neuronok, primer neuronok és primer asztroglia sejtek éheztetése a módszerek részben leírtak alapján történt. Az ábrán pirossal jelölt eredmények (100%-nak megfelelő oxigénfogyasztás értékek) a szubsztrátmentes ACSF médiumban éheztetett kontroll sejtek oxigénfogyasztásának átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját mutatják. A feketével jelölt eredmények az ACSF kontrollhoz képest százalékban megadott, glutamin jelenlétében mért oxigénfogyasztások átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját mutatják. A \* szignifikáns különbséget mutat az ACSF kontrollhoz képest ( $p < 0.001$ ), míg az N.S. rövidítés nem szignifikáns hatást jelöl. Az ábrán bemutatott adatok sejttípusonként és kondícióként  $n \geq 23$  sejtenyészet összesített eredményét mutatják.

## 6. Megbeszélés

### 6.1. Mikroglia sejtek metabolikus vizsgálata

A mikroglia sejtek a központi idegrendszerben előforduló sejtípusok rendkívül dinamikus sejtpopulációját képezik, mind helyzetváltoztató, mind pedig helyváltoztató mozgásra képesek. Nyugvó állapotban nyúlványok létrehozásával, aktív motilitással folyamatosan mintát vesznek, monitorozzák környezetüket (Davalos és mtsai 2005, Nimmerjahn és mtsai 2005). A mikroglia sejtek megoszlása a központi idegrendszeren belül rendkívül heterogén (Lawson és mtsai 1990), képesek a sejttestük teljes transzlokációjára (Stence és mtsai 2001). Ezek a sejtek fiziológias körülmények között is képesek migrációra, amely során az agy számtalan régiójában részt vehetnek az agyi homeosztázis fenntartásában (Kettenmann és mtsai 2011). Mindezen morfológiai változással járó folyamatok azonban energiát igényelnek. Az agy különböző régiójában megforduló mikroglia sejtek mikrokozonyezetében megtalálható oxidatív és glikolítikus szubsztrátok egyértelműen meghatározzák ezen sejtek energiatermelő folyamatait. Nem lehet meglepő az a feltételezés, amely szerint a mikroglia sejtek metabolikus szempontból a központi idegrendszerben előforduló sejtípusok rendkívül változatos és adaptív populációját képezik. Zhang és munkatársainak eredményei rámutatnak a mikroglia transzkriptom sokszínűségére, ezen belül is a mikroglia sejtekben megtalálható szubsztrát transzporterekre (Zhang és mtsai 2014). Az irodalomban azonban csak néhány olyan publikációt találunk, amelyek a mikroglia sejtek energia metabolizmusának direkt vizsgálatával foglalkoznak. (Cherry és mtsai 2014, Orihuela és mtsai 2015, Voloboueva és mtsai 2013). Ezek a vizsgálatok elsősorban a mikroglia sejtek aktivációt követő metabolikus válaszait írják le. Míg aktivációt megelőzően elsősorban az oxidatív, addig aktivációt követően főleg a glikolítikus útvonalat használják energiaigényük fedezésére. A mikroglia sejtek szubsztrátspecifitása és ezen energia metabolitok hasznosulása fiziológias körülmények között a mikroglia sejtekben azonban tisztázásra szorul.

A mikroglia sejtek szubsztrátspecifitásának vizsgálatára *in vitro* kísérleteket végeztünk primer mikroglia sejt kultúrán és BV-2 mikroglia sejteken. ACSF médiumban, energia szubsztrátok hiányában a mikroglia sejtek alaplégzése és maximális oxigénfogyasztása csökkent (1. és 2. táblázat), továbbá a sejtek intracelluláris ATP szintjében is csökkenést

tapasztaltunk, amely súlyos energiahiányra utal ilyen körülmények között. A primer mikroglia sejtekben, ellentétben a BV-2 mikroglia sejtekkel az éheztetés nem eredményezte a sejtek viabilitásának a csökkenését, illetve nem indukált szignifikáns mértékű apoptózist. A BV-2 sejtek csökkent mTOR és p-S6 foszforilációt mutattak éheztetést követően, amely a fehérjeszintézis redukciójára utal (Morita és mtsai 2015). Az intenzív autofágiát mutató emelkedett LC3 II/I arány az ACSF médiumban inkubált BV-2 mikroglia sejtekben az önmérsztési folyamatok kezdetére utal (Kabeya és mtsai 2000). Következtetésképpen elmondható, hogy a primer mikroglia sejtek kevésbé érzékenyek a szubsztrátmegvonásra, mint a BV-2 mikroglia sejtek.

A sejtekben történő szubsztrát-hasznosítás vizsgálata során a mikroglia sejteket oxidatív vagy glikolitikus szubsztráttal kiegészített ACSF médiumban tartottuk. A kiválasztott energia metabolitok a cerebrospinális folyadékban fiziológias körülmények között előforduló szubsztrátok voltak (Albrecht és mtsai 2007, Leen és mtsai 2012, Zhang és Natowicz 2013). Az 1. táblázatban megadott oxigénfogyasztás értékek a hozzáadott szubsztrát jelenlétében mért adatokat jelentik. Fontos azonban megjegyezni, hogy a vizsgált körülmények között a mikroglia sejtek még éheztetés esetén is oxidálnak endogén szubsztrátokat, amelyek így hozzájárulnak az exogén szubsztrátok jelenlétében mért oxigénfogyasztáshoz. Így ahhoz, hogy megkapjuk a hozzáadott szubsztrátok hatását az oxigénfogyasztásra, a hozzáadott szubsztrát jelenlétében mért oxigénfogyasztás és az ACSF médiumban inkubált sejtek oxigénfogyasztásának különbségét vettük (2. táblázat). Kísérleteinkben a glukóz csökkentette mind a primer, mind pedig a BV-2 mikroglia sejtek oxigénfogyasztását. A mikroglia sejtek oxigénfogyasztásának csökkenése oligomycin hozzáadására glukóz jelenlétében azonban csekély oxidatív foszforiláció jelenlétére is utal. Az ACSF médiumban tartott mikroglia sejtek extracelluláris acidifikációját a glukóz hozzáadása emelte, amely a sejtek intenzív glikolízisét mutatja. A Crabtree-effektusnak is nevezett jelenséget, miszerint éhezést követően glukóz adása a mitokondriális oxidációt visszaszorítja és a glikolízis sebességét növeli, korábban tumorsejteknel is megfigyelték (Crabtree 1929, Warburg 1956). Mikroglia sejtekben a jelenség azonban nem ismert, ezért kísérleteket végeztünk a glukóz jelenlétében létrejövő akut, oxidációt csökkentő hatás hátterének a vizsgálatára. Az oxidáció csökkenésére magyarázatot adhat a piruvát dehidrogenáz enzimkomplex alacsony aktivitása. Az 1. és 2. táblázat eredményei arra utalnak, hogy a PDH teljes gátlása nem állhat fenn, hiszen a mitokondriális

szétkapcsolószert a primer mikroglia sejtek oxidációját fokozta, amely csak magas PDH enzimaktivitás mellett elképzelhető. Mindemellett a laktát dehidrogenáz enzim gátlása a glukóz jelenlétében mért alacsony mitokondriális oxigénfogyasztást fokozta, a glikolízis mértékét pedig csökkentette (6. ábra). Következésképpen elmondható, hogy a glikolízisből származó ATP a PDH enzimet részben inaktív állapotban tarthatja, míg a mitokondriális szétkapcsolószert jelenléte, illetve a piruvát koncentrációjának a fokozása oxamáttal ezt az inaktivációt megszünteti. Ezek az eredmények rámutatnak a mikroglia sejtek laktáttermelő képességére is. Felvetődik továbbá a mikroglia sejtek és neuronok közötti metabolikus kooperáció lehetősége, amely során a mikroglia sejt által termelt laktátot a neuron energiaigényének fedezésére fordítja.

Ellentétben a BV-2 mikroglia sejteknél megfigyelttel, a primer mikroglia sejtek éheztetést követő intracelluláris ATP szint csökkenését a glukózból keletkező ATP részben kompenzálta. BV-2 sejtekben az ACSF-ben éheztetett sejtekhez képest sem a sejtviabilitás növekedése, sem az apoptotikus sejtek számának a csökkenése, sem pedig a p-mTOR/t-mTOR arányának a növekedése nem következett be glukóz hatására. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a BV-2 mikroglia sejtekben a glukóz nem volt képes visszafordítani az éheztetés következményeként létrejövő katabolikus folyamatokat.

**Piruvát** szubsztrát jelenlétében a glukóz hatásának diszkrétálásánál leírt PDH inaktiváció nem lépett fel, hiszen glukóz hiányában nem történik glikolítikus ATP termelés, amely részben inaktiválná a PDH enzimet. Primer mikroglia sejtekben a piruvát mitokondriális transzportjára, citrát-körbe történő bekapcsolódására és oxidációjára utal a sejtek ACSF-ben mért alaplégzésének a megemelkedése, továbbá az intracelluláris ATP szint növekedése piruvát szubsztrát hatására. A BV-2 mikroglia sejtek esetén azonban a piruvát nem volt képes az éheztetés során fellépő intracelluláris ATP szint és sejtviabilitás csökkenést, valamint apoptózis indukciót gátolni.

A **laktát** a központi idegrendszer egyik bizonyítottan fontos energia metabolitja. Az asztrocita sejtek laktáttermelő képességét, valamint a neuronok laktát hasznosítását számtalan eredmény bizonyítja (Belanger és mtsai 2011, Magistretti és Allaman 2015, Magistretti és Allaman 2018), azonban a mikroglia sejtek laktát-metabolizáló képességére nem találunk példát az irodalomban. Kísérleteinkben a primer mikroglia sejtek és a BV-2 sejtek alaplégzését és maximális légzését a laktát fokozta. Szubsztrát koncentrációtól

függően a mikroglia sejt tehát nemcsak laktát termelésére, hanem a laktát oxidációjára is képes, amely adódhat a LDH enzim reverzibilis működéséből, illetve a különböző LDH izoenzimek együttes jelenlétéből. Annak ellenére, hogy a BV-2 mikroglia sejtek képesek a laktát hatékony oxidációjára, az ACSF-ben 4 órán keresztül éheztetett sejtekben megfigyelhető intracelluláris ATP szint és viabilitás csökkenés jelentkezik laktát jelenlétében is. Mindez arra utal, hogy a laktát az éheztetést követően csak az energiaigény átmeneti fedezésére elég ezekben a sejtekben. Érdekes összehasonlítani a laktát és piruvát oxidációra kifejtett hatását. Primer mikroglia sejtekben mind az alaplégzést, mind pedig a maximális légzést a laktátnál nagyobb mértékben fokozta a piruvát. Erre magyarázatot adhat az, hogy a piruvát mitokondriális transzportot követően közvetlen szubsztrátként szolgál a PDH enzim számára, míg a laktát átalakulása piruváttá sebességmeghatározó lehet. A citoszolikus NADH oxidáció csekély, így a LDH által katalizált reakcióban keletkező NADH elektronjai úgynevezett ingák (malát-aszpartát inga és glicerofoszfát-inga) útján jutnak el a mitokondriális elektrontranszport láncba és eredményezik az ATP szintézisét. Éhezés következtében azonban az ingát működtető szubsztrátok alacsony koncentrációja miatt ezen ingák funkcionálisan inaktív állapotba kerülnek.

A **glutamin** számos sejt típus energiaforrásként szolgál. Elengedhetetlen metabolit tumorsejtek számára (Seyfried és mtsai 2015), de immunsejteknek (limfocitáknak, makrofágoknak és neutrofil granulocitáknak) is fontos tápanyaga lehet (Newsholme 2001). A glutamin központi idegrendszeren belüli magas koncentrációja (McGale és mtsai 1977) lehetővé teszi, hogy energiaforrásként szolgáljon az agy különböző sejt típusai számára, amelyek ezáltal résztvevőivé válnak a glutamát-glutamin ciklusnak. Találunk példát az irodalomban arra vonatkozóan, hogy a mikroglia sejtek glutamin transzportereket expesszálnak (Zhang és mtsai 2014), azonban direkt kísérleti adat nincs a mikroglia sejtek glutamin metabolizáló képességéről. Kísérleteink bizonyítják, hogy a primer - és BV-2 mikroglia sejtek egyaránt jól hasznosítják a glutamint. Egyedüli szubsztrátként is képes a glutamin az ACSF-ben éhező kontroll sejtekhez képest az alaplégzés és a maximális oxigénfogyasztás növelésére, az ATP termelés, sejtviabilitás, mTOR aktivitás és fehérjeszintézis fokozására, valamint az apoptózis és autofágia visszaszorítására. Külön kiemelendő, hogy BV-2 sejtek esetén a szubsztrát hasznosíthatóságát leginkább jellemző paraméter, a maximális oxigénfogyasztás

glutamin esetében volt a legmagasabb. BV-2 mikroglia sejtekben ez volt az egyedüli szubsztrát, amely képes volt az intracelluláris ATP szint, sejtviabilitás és mTOR aktivitás fenntartására. Bár az LC3 II/I és az p-AMPK/t-AMPK arányban szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk az ACSF médiumban 4 órán keresztül éheztetett kontroll BV-2 sejtekhez képest, a más sejtípusoknál leírt tendenciózus változás (Wong és mtsai 2013) azonban itt is jól megfigyelhető: i) a p-mTOR/t-mTOR aránnyal ellenkező irányban változik az LC3 II/I arány, míg ii) a p-mTOR/t-mTOR aránnyal megegyező irányban változik a p-AMPK/t-AMPK arány. A glutamin így a mikroglia sejtekben az éheztetés következtében kialakuló katabolikus folyamatokat visszafordította. Következésképpen tehát elmondható, hogy a mikroglia sejtek a glutamát-glutamin ciklus aktív résztvevői lehetnek, amely funkciójuk során nemcsak a glutamát extracelluláris szintjének a szabályozásában (Persson és mtsai 2006), hanem a glutamin lokális koncentrációjának regulációjában is egyaránt szerepet játszhatnak (19. ábra). Kísérleteink tervezésénél felmerült a glutamát, mint energia szubsztrát vizsgálata is. A mikroglia sejtek azonban a glutamát receptorok széles skáláját expresszálják, így nehezen elkülöníthető a metabolikus és a receptor aktivációja során bekövetkező változás.

Éheztetett körülmények között a  **$\beta$ -hidroxibutirátot** képesek mind a primer, mind pedig a BV-2 mikroglia sejtek hasznosítani.  $\beta$ -hidroxibutirát jelenlétében a mikroglia sejtek alaplégzése és maximális légzése is megemelkedett, azonban a szubsztrátok közül ez volt a legcsekélyebb hatás. A ketontestek éheztetett mikroglia sejtek metabolizmusára kifejtett hatásának vizsgálatára **acetoacetáttal** is végeztünk kísérleteket. Glutamin jelenléte nélkül az acetoacetát jelentős mértékben nem fokozta az alaplégzést, a maximális respirációt is csak átmenetileg emelte meg az ACSF médiumban éhező kontroll sejtekhez képest. Glutamin jelenlétében azonban az acetoacetát tartósan fokozta mind a primer mind pedig a BV-2 sejtek oxigénfogyasztását. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a ketontestek oxidációjának éheztetett körülmények között határt szab a szukcinil-KoA alacsony mennyisége. Ez jól tükröződik a szétkapcsolószert jelenlétében mért acetoacetát oxidáció csökkenésében. Amennyiben glutamint is tartalmaz az ACSF médium acetoacetát mellett, a glutamin metabolizmusa során, időegység alatt keletkező szukcinil-KoA mennyisége elegendő ahhoz, hogy a ketontest oxidációja megtörténjen. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy éheztetett körülmények között a citrát-köri intermedierek deplációja következik be, amely során a ketontestek oxidációja gátolt.

Azonban a megfelelő szubsztrát-kombinációk alkalmazásával a citrát-ciklus intermedierek mennyisége és a ciklus sebessége helyreállítható.

A glutamin-ketontest szubsztrát-kombináción kívül más energia metabolitok együttes hatását is megvizsgáltuk BV-2 sejteken. Az ACSF médium aszpartáttal történő kiegészítése fokozta a sejtek glukóz, piruvát és laktát jelenlétében mért oxidációját. Ezen eredmények alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a BV-2 sejtek nagyfokú transzaminálási kapacitással rendelkeznek, amely lehetővé teszi aszpartátból (és malátból) az Ac-KoA akceptor oxálacetát képződését. Fontos azonban megjegyezni, hogy bár mind az aszpartát, mind pedig a malát fokozta a glukóz jelenlétében mért maximális respirációt, a glukóz Crabtree-effektushoz hasonlítható akut hatását egyik szubsztrát sem volt képes megváltoztatni.





## 6.2. Anyagcsere folyamatok vizsgálata a neuronális differenciáció során

Az embrionális idegi őssejtek és differenciált neuronok *in vitro* összehasonlító vizsgálatának a célja a differenciált és nem differenciált idegsejtek, korábban leírt, eltérő oxigénigényének (Folmes és mtsai 2012, Schneider és mtsai 2011, Xun és mtsai 2012, Zadori és mtsai 2011, Zhang és mtsai 2012) háttérben álló metabolikus folyamatok feltérképezése. Feltételezésünk volt, hogy az oxigénigény változása a differenciáció során az energia metabolitok hasznosításában bekövetkező átalakulás eredménye. Jelen munkában primer neuronális tenyésztettel hasonlítottuk össze az NE-4C embrionális idegi őssejtek differenciációja során létrejövő NE-4C neuronok metabolizmusát. A differenciáció eredményeként az őssejtekből differenciáltatott sejtek metabolikus szempontból hasonlóan viselkedtek a primer neuronokhoz (Jady és mtsai 2016). Az idegi őssejtek jelentősen kevesebb oxigént fogyasztottak és kevesebb ATP-t termeltek, mint a differenciált neuronok. Az eredmények arra utalnak, hogy az NE-4C őssejtek a megfelelő mennyiségű energiát képesek glikolitikus úton előállítani, amely segíti a sejteket a 2 órás éhezés során a túlélésben. Exogén hozzáadott szubsztrát jelenlétében az őssejtek ATP termelése jelentősen megnőtt, amely a sejtek gyors adaptációjára utal. Ezzel szemben azonban az NE-4C differenciáltatott neuronok, primer neuronok, illetve primer asztroglia sejtek kevésbé érzékenyen reagáltak az ACSF-ben történő éheztetésre, oxidatív foszforilációjukat magas szinten tartották a szubsztrátmegvonás során. Ebből a megfigyelésből arra következtethetünk, hogy szubsztrátmegvonás esetén a differenciáltabb sejtek energiaszintjüket képesek az őssejtekénél magasabb értéken tartani feltehetőleg endogén szubsztrátoknak és támogató folyamatoknak köszönhetően. Meglepő módon primer asztrociták és neuronok glutamin és más szubsztrátok hozzáadására sem válaszoltak az oxigénfogyasztás azonnali fokozásával.

A piruvát dehidrogenáz kináz 4-es formájának (PDK4) fokozott expresszióját írták le éheztetett körülmények között (Wu és mtsai 2000). A PDK4 magas expressziója jellemző primer és NE-4C differenciált neuronokban, míg őssejtekben alig mutatható ki a kináz jelenléte (Jady és mtsai 2016). A PDK4 transzkripció szintű upregulációja azonban nem feltétlen jelenti a PDH inaktivációját. PDH és PDK4 fehérjeszintek és enzimaktivitási eredmények nélkül csak hipotézisekre lehet támaszkodni. A PDK4 fokozott expressziója

a glikolízis és a citromsav-ciklus szétkapcsolását eredményezi és feltehetőleg ez áll az aerob glikolízis hátterében (Vander Heiden és mtsai 2009).

Az összes vizsgált sejt kultúra esetén glukóz jelenlétében a sejtek aerob glikolízist folytattak, a glukóz csökkentette az oxigénfogyasztást és ezzel párhuzamosan csökkent az extracelluláris savasodás mértéke (Jady és mtsai 2016). A glikolízis intenzitásának mértéke csökkent a differenciáció előrehaladásával. Felmerül a kérdés, hogy mi lesz a sorsa a neuronban a glukóznak. Erre magyarázatként szolgálhat a pentóz-foszfát ciklus, amely során a neuronban glukózból nukleotid prekursorok képződnek. Ezek a nukleotidok intermedierként szolgálhatnak a posztmitotikus DNS-javító folyamatokhoz a neuronokon belül. A pentóz-foszfát ciklus további jelentősége a NADPH termelésében áll, amely az idegsejtet érő oxidatív stressz elleni védekezésben fontos glutathion szintézisét teszi lehetővé (Bouzier-Sore és Bolanos 2015).

### **6.3. A módszer kritikája**

A BV-2 mikroglia és az NE-4C őssejtes modellek hátránya, hogy mindkét sejtvonal p53 deficiens egerekből származik, hiszen az immortalizálás a funkcionális p53 fehérje génjének kiütését eredményezi. A tumor szupresszor p53 fehérje, amellyel, hogy a sejt ciklust, DNS javító folyamatokat és az apoptózist szabályozza (Levine és mtsai 1991), hatással lehet a sejt energia metabolismusát szabályozó molekuláris mechanizmusokra is (Berkers és mtsai 2013). A p53 deficiens egér ellenére normális fejlődésen megy keresztül, tumoros elváltozások csak az öreg populációkban fordulnak elő (Donehower és mtsai 1992). A p53 fehérje metabolismust módosító hatásai miatt a vizsgálatokba primer tenyészeteket vontunk be, primer mikroglia, neuronális és asztrogliá sejt kultúrát, amellyel így elkerülhető a p53 fehérje hiányából adódó téves következtetések levonása.

## 7. Következtetések

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a mikroglia sejtek metabolikus sokszínűséget mutatnak. A cerebroszpinális folyadékban rendelkezésre álló szubsztrátok széles skáláját képesek energiatermelésükre fordítani, így glukózt, laktátot, ketontesteket, illetve aminosavakat is. A vizsgált energia metabolitok közül a glutamin jelenti a leghatékonyabb szubsztrátot. A mikroglia sejtek dinamikus struktúrája, hely- és helyzetváltoztató képessége, valamint verzatilis metabolizmusa lehetővé teszi, hogy az agy különböző régióiban, eltérő metabolikus mikrokozmoszban képesek legyenek energiaigényük fedezésére és ezáltal szerteágazó funkcióik ellátására. Kísérleteink eredményei alapján feltételezhetjük, hogy a mikroglia sejtek saját anyagcseréjük támogatásán kívül a környező sejtek energia metabolizmusához is hozzájárulnak. A glukóz hasznosulása során megfigyelt intenzív laktáttermeléssel járó aerob glikolízis és glutamin/glutamát felhasználás felveti a mikroglia sejt részvételének lehetőségét az idegsejt-asztroglia-oligodendroglia metabolikus kooperációban.

Az NE-4C embrionális idegi őssejteken, differenciált NE-4C neuronokon és primer idegsejt tenyészetben végzett kísérletek eredményei alapján megállapítható, hogy a differenciált és nem differenciált sejtek anyagcseréje különböző. A differenciáció során az idegi őssejtek a glikolitikus energiatermelésből fokozatosan átváltanak a glukóz oxidatív úton történő hasznosítására. Megállapítottuk továbbá, hogy a nem differenciált NE-4C őssejtek a glutamint képesek energiatermelésre fordítani, ezen keresztül a glutamin hozzájárulhat az őssejtek proliferációjához.

## 8. Összefoglalás

Kísérleteinkben a fejlődő és kifejlett központi idegrendszeri sejtek anyagcsere sajátosságait vizsgáltuk *in vitro* sejtenyészeten. A felnőtt agy gliasejtjei közül elsősorban a dinamikus sejtstruktúrát mutató mikroglia sejteken végeztünk bioenergetikai vizsgálatokat. Az agy elsődleges immunvédelmét biztosító fagociták eloszlása az agy különböző régiói között rendkívül heterogén és folyamatos változáson megy keresztül a mikroglia sejtek kemotaktikus szignálok hatására bekövetkező migrációja miatt. Vizsgálatainkban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy melyek azok a szubsztrátok, amelyeket a mikroglia sejtek a különböző metabolikus mikrokozonyezetekben energiatermelésre képesek felhasználni.

Primer - és BV-2 mikroglia sejteket szubsztrátmentes médiumban éhezettünk, majd mértük a sejtek oxigénfogyasztását, intracelluláris ATP és ADP szintjét, viabilitását, az extracelluláris médium pH csökkenését, az mTOR útvonal fehérjéinek foszforiláltsági hányadát, az apoptózist és nekrozist mutató sejtek számát, illetve az autofágia aktivitást különböző szubsztrátok (glukóz, glutamin, piruvát, laktát, ketontestek) jelenlétében.

Az oxidatív szubsztrátok mellett a sejtek alaplégzése és tartalék respiratorikus kapacitása fokozódott, míg glukóz jelenlétében a mitokondriális oxidáció csökkent és a glikolitikus aktivitás nőtt. A ketontestek hasznosulása az éhezetés következményeként kialakuló alacsony citrát-köri aktivitás miatt csekély volt, azonban anaplerotikus folyamatok a ketontestek oxidációját jelentősen fokozzák. A BV-2 sejtek MTT viabilitása, ATP/ADP aránya glutamin jelenlétében volt a legmagasabb a szubsztrátot nem tartalmazó ACSF médiumban tartott sejtekhez képest, míg az autofágia intenzitását jellemző LC3 II/I arány glutamin jelenlétében volt a legalacsonyabb.

A primer és BV-2 mikroglia sejteken végzett kísérletek eredményei az irodalomban elsőként mutatnak rá a mikroglia sejtek metabolikus sokszínűségére, a cerebrospinális folyadékban rendelkezésre álló szubsztrátok széles skáláját képesek ezek a sejtek energiaigényük fedezésére felhasználni. Megállapítottuk továbbá, hogy glukóz jelenlétében a sejtek intenzív glikolízisre képesek, míg az oxidatív szubsztrátok közül a glutamin bizonyult a leghatékonyabb tápanyagnak. Mindez lehetővé teszi a mikroglia sejt aktív részvételét az idegsejtek és glia sejtek közötti metabolikus kooperációban.

A fejlődő agy anyagcsere sajátosságainak vizsgálata során az idegi őssejtek differenciációjának metabolikus aspektusaira voltunk kíváncsiak. Így egér embrióból származó NE-4C idegi őssejteket differenciáltattunk neuronná, összehasonlításképp a metabolikus vizsgálatokat elvégeztük primer neuron kultúrán is. Kísérleteink során a cerebroszpinális folyadékban magas koncentrációt elérő két szubsztrát, a glukóz és a glutamin hatását vizsgáltuk éhezettett sejtek metabolizmusára és vizsgáltuk a sejtek mitokondriális és glikolitikus funkcióit. Míg a glukóz a nem differenciált sejtek esetén glikolitikus úton hasznosul, addig a differenciációt követően elsősorban a glukóz oxidatív anyagcseréje kerül előtérbe. A glutamin hasznosulásában is jelentős különbséget tapasztaltunk, amely során a glutamin az NE-4C őssejtek oxidációját fokozta, míg a differenciált NE-4C neuronok és primer neuronok alaplégzését nem fokozta. Megállapítottuk, hogy az idegi őssejtek differenciációja anyagcseréjük változásában is megnyilvánul és ezek a metabolikus átalakulások biztosítják a megfelelő mennyiségű energiát és intermediereket az idegi fejlődéshez.

## 9. Summary

In the present study the energy metabolism of cells in the developing and mature brain was investigated throughout *in vitro* experiments. Among glial cells of the brain bioenergetic properties of the dynamically active microglia was in the focus of this research. Acting as a primary immune defense of the central nervous system, microglial populations show heterogenous and dynamic distribution in the brain due to their migration. The purpose of this research was to explore, what are the potential substrates for microglial cells that can support their energy metabolism under various microenvironmental conditions.

Starvation was induced in primary- and BV-2 microglial cells, than oxygen consumption, intracellular ATP and ADP levels, cell viability, changes in the extracellular pH, phosphorylation of the mTOR pathway proteins, the number of apoptotic and necrotic cells and autophagic activity were detected in the presence of the following energy metabolites: glucose, glutamine, pyruvate, lactate and ketone bodies.

Basal oxygen consumption rates and reserve respiratory capacity were increased in the presence of oxidative substrates, while a decrease in mitochondrial oxidation and an enhanced glycolytic activity were observed upon the addition of glucose. As a result of starvation, utilization of ketone bodies was limited due to the low rate of citric acid cycle. However, anaplerotic processes increased the oxidation of ketone bodies. MTT viability and ATP/ADP ratio were the highest in BV-2 microglia, while LC3 II/I showing autophagic activity was the lowest, when ACSF was supplemented with glutamin. To our knowledge these data provide the first account of microglial metabolic plasticity and show that microglia can utilize a wide range of substrates available in the CSF. It was also concluded that in the presence of glucose a high rate of glycolysis occurs and that besides glucose, glutamin is the most preferred energy substrate for microglial cells. Our finding that microglia have a versatile metabolic machinery indicates that these cells contribute to the metabolic cooperation of glial cells and neurons.

In order to investigate the metabolic changes in the developing brain, *in vitro* experiments were performed with NE-4C neural stem cells (derived from embryonic mice) and NE-4C differentiated neurons. For a better comparison primary neuronal cultures and primary astrocytes were also involved in the study. Starvation was induced in the cells, cellular

media were supplemented with the two main energy substrates glucose and glutamine that are present in the brain in high concentrations. Mitochondrial oxygen consumption and glycolytic activity were measured and compared among the four cell cultures. In non-differentiated cells glycolytic flux is active, while in differentiated cells the oxidation of glucose is the more effective pathway for energy production. A difference was also observed between stem cells and differentiated cells in the utilization of glutamine. Stem cells displayed high oxidation of glutamine, however, differentiated cells did not show any change in oxygen consumption upon the addition of glutamine. It is concluded that neural stem cells undergo metabolic changes during differentiation that provide them the appropriate amount of energy and intermediates for neural development.



## **10. Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom mindenekelőtt témavezetőmnek, Tretter Lászlónak, aki már TDK munkám kezdetétől támogatta minden kísérleti ötletemet és szakmai útjaim megvalósítását. Mindig nyitva állt az ajtó számomra, hogy megbeszéljük a mitokondriális funkciók vizsgálati lehetőségeit és elmélyedjünk a központi idegrendszeri sejtek metabolizmusának sokszínűségében. Köszönetemet fejezem ki másik témavezetőmnek, Ádám Veronikának, aki PhD munkámat munkacsoportvezetőként lehetővé tette és támogatta.

Szeretnék köszönetet mondani Komlódi Tímeának, Horváth Gergőnek, Kovács Tündének, Mikulás Krisztinának és Tóth Krisztinának, akikkel élmény volt a kutatócsoportban egymás munkáját támogatva dolgozni. Köszönöm továbbá Zölde Katalinnak, Takács Katalinnak és Várnagy Andreának a kísérletek megvalósításában nyújtott segítséget.

Külön köszönetemet fejezem ki Környei Zsuzsának, Madarász Emíliának, Dénes Ádámnak és Fekete Rebekának, hogy megmutatták a sejtbiológia szépségét és értékes segítséget adtak az eredmények megvalósításához és kiértékeléséhez.

Végül de nem utolsó sorban köszönöm feleségemnek, bátyámnak és szüleimnek a folyamatos támogatást és megértést, amely végigkísért PhD tanulmányaim során.

## 11. Irodalomjegyzék

Abi-Saab WM, Maggs DG, Jones T, Jacob R, Srihari V, Thompson J, Kerr D, Leone P, Krystal JH, Spencer DD, During MJ, Sherwin RS. 2002. Striking differences in glucose and lactate levels between brain extracellular fluid and plasma in conscious human subjects: effects of hyperglycemia and hypoglycemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:271-9.

Abiega O, Beccari S, Diaz-Aparicio I, Nadjar A, Laye S, Leyrolle Q, Gomez-Nicola D, Domercq M, Perez-Samartin A, Sanchez-Zafra V, Paris I, Valero J, Savage JC, Hui CW, Tremblay ME, Deudero JJ, Brewster AL, Anderson AE, Zaldumbide L, Galbarriatu L, Marinas A, Vivanco M, Matute C, Maletic-Savatic M, Encinas JM, Sierra A. 2016. Neuronal Hyperactivity Disturbs ATP Microgradients, Impairs Microglial Motility, and Reduces Phagocytic Receptor Expression Triggering Apoptosis/Microglial Phagocytosis Uncoupling. *PLoS Biol* 14:e1002466.

Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM. 2011. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci* 14:1142-9.

Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. 2007. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10:1538-43.

Albrecht J, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. 2007. Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. *Front Biosci* 12:332-43.

Alle H, Roth A, Geiger JR. 2009. Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers. *Science* 325:1405-8.

Ames A, 3rd. 2000. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Brain Res Rev* 34:42-68.

Antonucci F, Turola E, Riganti L, Caleo M, Gabrielli M, Perrotta C, Novellino L, Clementi E, Giussani P, Viani P, Matteoli M, Verderio C. 2012. Microvesicles released

from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism. *EMBO J* 31:1231-40.

Aoki C, Kaneko T, Starr A, Pickel VM. 1991. Identification of mitochondrial and non-mitochondrial glutaminase within select neurons and glia of rat forebrain by electron microscopic immunocytochemistry. *J Neurosci Res* 28:531-48.

Askew K, Li K, Olmos-Alonso A, Garcia-Moreno F, Liang Y, Richardson P, Tipton T, Chapman MA, Riecken K, Beccari S, Sierra A, Molnar Z, Cragg MS, Garaschuk O, Perry VH, Gomez-Nicola D. 2017. Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Rep* 18:391-405.

Astrup J, Sorensen PM, Sorensen HR. 1981. Oxygen and glucose consumption related to Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> transport in canine brain. *Stroke* 12:726-30.

Attwell D, Gibb A. 2005. Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* 6:841-9.

Attwell D, Laughlin SB. 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1133-45.

Auestad N, Korsak RA, Morrow JW, Edmond J. 1991. Fatty acid oxidation and ketogenesis by astrocytes in primary culture. *J Neurochem* 56:1376-86.

Baalman K, Marin MA, Ho TS, Godoy M, Cherian L, Robertson C, Rasband MN. 2015. Axon initial segment-associated microglia. *J Neurosci* 35:2283-92.

Bacci A, Sancini G, Verderio C, Armano S, Pravettoni E, Fesce R, Franceschetti S, Matteoli M. 2002. Block of glutamate-glutamine cycle between astrocytes and neurons inhibits epileptiform activity in hippocampus. *J Neurophysiol* 88:2302-10.

Bar-Peled L, Schweitzer LD, Zoncu R, Sabatini DM. 2012. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell* 150:1196-208.

Barros LF, Deitmer JW. 2010. Glucose and lactate supply to the synapse. *Brain Res Rev* 63:149-59.

Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ. 2011. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14:724-38.

Beleznay Z, Zachowski A, Devaux PF, Navazo MP, Ott P. 1993. ATP-dependent aminophospholipid translocation in erythrocyte vesicles: stoichiometry of transport. *Biochemistry* 32:3146-52.

Benjamin AM, Quastel JH. 1975. Metabolism of amino acids and ammonia in rat brain cortex slices in vitro: a possible role of ammonia in brain function. *J Neurochem* 25:197-206.

Benoist JF, Alberti C, Leclercq S, Rigal O, Jean-Louis R, Ogier de Baulny H, Porquet D, Biou D. 2003. Cerebrospinal fluid lactate and pyruvate concentrations and their ratio in children: age-related reference intervals. *Clin Chem* 49:487-94.

Berkers CR, Maddocks OD, Cheung EC, Mor I, Vousden KH. 2013. Metabolic regulation by p53 family members. *Cell Metab* 18:617-33.

Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A. 2007. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55:233-8.

Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti PJ. 1996. Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1079-89.

Bittner CX, Valdebenito R, Ruminot I, Loaiza A, Larenas V, Sotelo-Hitschfeld T, Moldenhauer H, San Martin A, Gutierrez R, Zambrano M, Barros LF. 2011. Fast and reversible stimulation of astrocytic glycolysis by K<sup>+</sup> and a delayed and persistent effect of glutamate. *J Neurosci* 31:4709-13.

Bixel MG, Hamprecht B. 1995. Generation of ketone bodies from leucine by cultured astroglial cells. *J Neurochem* 65:2450-61.

Bolanos JP. 2016. Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *J Neurochem* 139 Suppl 2:115-125.

Boungneres PF, Lemmel C, Ferre P, Bier DM. 1986. Ketone body transport in the human neonate and infant. *J Clin Invest* 77:42-8.

Boumezbeur F, Petersen KF, Cline GW, Mason GF, Behar KL, Shulman GI, Rothman DL. 2010. The contribution of blood lactate to brain energy metabolism in humans measured by dynamic <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosci* 30:13983-91.

Bouzier-Sore AK, Bolanos JP. 2015. Uncertainties in pentose-phosphate pathway flux assessment underestimate its contribution to neuronal glucose consumption: relevance for neurodegeneration and aging. *Front Aging Neurosci* 7:89.

Bouzier-Sore AK, Pellerin L. 2013. Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Front Cell Neurosci* 7:179.

Bouzier-Sore AK, Serres S, Canioni P, Merle M. 2003a. Lactate involvement in neuron-glia metabolic interaction: (<sup>13</sup>C)-NMR spectroscopy contribution. *Biochimie* 85:841-8.

Bouzier-Sore AK, Voisin P, Canioni P, Magistretti PJ, Pellerin L. 2003b. Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1298-306.

Bozyczko-Coyne D, McKenna BW, Connors TJ, Neff NT. 1993. A rapid fluorometric assay to measure neuronal survival in vitro. *J Neurosci Methods* 50:205-16.

Braitenberg V, Schüz A. 1998. *Cortex: statistics and geometry of neuronal connectivity*. Berlin: Springer.

Broer A, Albers A, Setiawan I, Edwards RH, Chaudhry FA, Lang F, Wagner CA, Broer S. 2002. Regulation of the glutamine transporter SN1 by extracellular pH and intracellular sodium ions. *J Physiol* 539:3-14.

Broer A, Brookes N, Ganapathy V, Dimmer KS, Wagner CA, Lang F, Broer S. 1999. The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux. *J Neurochem* 73:2184-94.

Broer A, Deitmer JW, Broer S. 2004. Astroglial glutamine transport by system N is upregulated by glutamate. *Glia* 48:298-310.

Broer S, Brookes N. 2001. Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J Neurochem* 77:705-19.

Broer S, Rahman B, Pellegrini G, Pellerin L, Martin JL, Verleysdonk S, Hamprecht B, Magistretti PJ. 1997. Comparison of lactate transport in astroglial cells and monocarboxylate transporter 1 (MCT 1) expressing *Xenopus laevis* oocytes. Expression of two different monocarboxylate transporters in astroglial cells and neurons. *J Biol Chem* 272:30096-102.

Brown AM, Wender R, Ransom BR. 2001. Metabolic substrates other than glucose support axon function in central white matter. *J Neurosci Res* 66:839-43.

Cahill GF, Jr., Owen OE. 1967. Some observations on carbohydrate metabolism in man. In: Dickens F, Randle PJ, Whelan WJ, editors. *Carbohydrate Metabolism and its Disorders*. New York: Academic Press Inc. p 497-522.

Candelario KM, Shuttleworth CW, Cunningham LA. 2013. Neural stem/progenitor cells display a low requirement for oxidative metabolism independent of hypoxia inducible factor-1alpha expression. *J Neurochem* 125:420-9.

Carlier MF, Pantaloni D, Evans JA, Lambooy PK, Korn ED, Webb MR. 1988. The hydrolysis of ATP that accompanies actin polymerization is essentially irreversible. *FEBS Lett* 235:211-4.

Casano AM, Peri F. 2015. Microglia: multitasking specialists of the brain. *Dev Cell* 32:469-77.

Chang KJ, Redmond SA, Chan JR. 2016. Remodeling myelination: implications for mechanisms of neural plasticity. *Nat Neurosci* 19:190-7.

Chaudhry FA, Reimer RJ, Krizaj D, Barber D, Storm-Mathisen J, Copenhagen DR, Edwards RH. 1999. Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell* 99:769-80.

Chen T, Koga K, Li XY, Zhuo M. 2010. Spinal microglial motility is independent of neuronal activity and plasticity in adult mice. *Mol Pain* 6:19.

Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. 2014. Are "resting" microglia more "m2"? *Front Immunol* 5:594.

Choi HB, Gordon GR, Zhou N, Tai C, Rungta RL, Martinez J, Milner TA, Ryu JK, McLarnon JG, Tresguerres M, Levin LR, Buck J, MacVicar BA. 2012. Metabolic communication between astrocytes and neurons via bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase. *Neuron* 75:1094-104.

Chorna NE, Santos-Soto IJ, Carballeira NM, Morales JL, de la Nuez J, Catala-Valentin A, Chorny AP, Vazquez-Montes A, De Ortiz SP. 2013. Fatty acid synthase as a factor required for exercise-induced cognitive enhancement and dentate gyrus cellular proliferation. *PLoS One* 8:e77845.

Chuquet J, Quilichini P, Nimchinsky EA, Buzsaki G. 2010. Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. *J Neurosci* 30:15298-303.

Cotter DG, d'Avignon DA, Wentz AE, Weber ML, Crawford PA. 2011. Obligate role for ketone body oxidation in neonatal metabolic homeostasis. *J Biol Chem* 286:6902-10.

Crabtree HG. 1929. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J* 23:536-45.

Cremer JE, Cunningham VJ, Pardridge WM, Braun LD, Oldendorf WH. 1979. Kinetics of blood-brain barrier transport of pyruvate, lactate and glucose in suckling, weanling and adult rats. *J Neurochem* 33:439-45.

Cubelos B, Gonzalez-Gonzalez IM, Gimenez C, Zafra F. 2005. Amino acid transporter SNAT5 localizes to glial cells in the rat brain. *Glia* 49:230-44.

Dalsgaard MK. 2006. Fuelling cerebral activity in exercising man. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:731-50.

Danbolt NC, Furness DN, Zhou Y. 2016. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. *Neurochem Int* 98:29-45.

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8:752-8.

Deitmer JW, Broer A, Broer S. 2003. Glutamine efflux from astrocytes is mediated by multiple pathways. *J Neurochem* 87:127-35.

Dejong CH, Deutz NE, Soeters PB. 1993. Cerebral cortex ammonia and glutamine metabolism in two rat models of chronic liver insufficiency-induced hyperammonemia: influence of pair-feeding. *J Neurochem* 60:1047-57.

DeVivo DC, Leckie MP, Agrawal HC. 1975. D-beta-Hydroxybutyrate: a major precursor of amino acids in developing rat brain. *J Neurochem* 25:161-70.

Dickens F. 1936. Metabolism of normal and tumour tissue: The respiratory quotient of brain cortex. *Biochem J* 30:661-4.

Diskin C, Palsson-McDermott EM. 2018. Metabolic Modulation in Macrophage Effector Function. *Front Immunol* 9:270.

Dolivo M, Larrabee MG. 1958. Metabolism of glucose and oxygen in a mammalian sympathetic ganglion at reduced temperature and varied pH. *J Neurochem* 3:72-88.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, Bradley A. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356:215-21.

Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B. 1999. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci* 19:562-9.



Duarte JM, Gruetter R. 2013. Glutamatergic and GABAergic energy metabolism measured in the rat brain by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy at 14.1 T. *J Neurochem* 126:579-90.

Duelli R, Kuschinsky W. 2001. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News Physiol Sci* 16:71-6.

Edgar JM, McLaughlin M, Werner HB, McCulloch MC, Barrie JA, Brown A, Faichney AB, Snaidero N, Nave KA, Griffiths IR. 2009. Early ultrastructural defects of axons and axon-glia junctions in mice lacking expression of *Cnp1*. *Glia* 57:1815-24.

Edmond J. 1992. Energy metabolism in developing brain cells. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl:S118-29.

Edmond J, Robbins RA, Bergstrom JD, Cole RA, de Vellis J. 1987. Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *J Neurosci Res* 18:551-61.

Engl E, Attwell D. 2015. Non-signalling energy use in the brain. *J Physiol* 593:3417-29.

Engl E, Jolivet R, Hall CN, Attwell D. 2017. Non-signalling energy use in the developing rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 37:951-966.

Eyo UB, Gu N, De S, Dong H, Richardson JR, Wu LJ. 2015. Modulation of microglial process convergence toward neuronal dendrites by extracellular calcium. *J Neurosci* 35:2417-22.

Eyo UB, Murugan M, Wu LJ. 2017. Microglia-Neuron Communication in Epilepsy. *Glia* 65:5-18.

Eyo UB, Peng J, Swiatkowski P, Mukherjee A, Bispo A, Wu LJ. 2014. Neuronal hyperactivity recruits microglial processes via neuronal NMDA receptors and microglial P2Y<sub>12</sub> receptors after status epilepticus. *J Neurosci* 34:10528-40.

Folmes CD, Dzeja PP, Nelson TJ, Terzic A. 2012. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell* 11:596-606.

Fourgeaud L, Traves PG, Tufail Y, Leal-Bailey H, Lew ED, Burrola PG, Callaway P, Zagorska A, Rothlin CV, Nimmerjahn A, Lemke G. 2016. TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology. *Nature* 532:240-244.

Funfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Mobius W, Diaz F, Meijer D, Suter U, Hamprecht B, Sereda MW, Moraes CT, Frahm J, Goebbels S, Nave KA. 2012. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485:517-21.

Gao V, Suzuki A, Magistretti PJ, Lengacher S, Pollonini G, Steinman MQ, Alberini CM. 2016. Astrocytic beta2-adrenergic receptors mediate hippocampal long-term memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:8526-31.

Garseth M, Sonnewald U, White LR, Rod M, Zwart JA, Nygaard O, Aasly J. 2000. Proton magnetic resonance spectroscopy of cerebrospinal fluid in neurodegenerative disease: indication of glial energy impairment in Huntington chorea, but not Parkinson disease. *J Neurosci Res* 60:779-82.

Gerencser AA, Neilson A, Choi SW, Edman U, Yadava N, Oh RJ, Ferrick DA, Nicholls DG, Brand MD. 2009. Quantitative microplate-based respirometry with correction for oxygen diffusion. *Anal Chem* 81:6868-78.

Gerhart DZ, Enerson BE, Zhdankina OY, Leino RL, Drewes LR. 1997. Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats. *Am J Physiol* 273:E207-13.

Gerhart DZ, LeVasseur RJ, Broderius MA, Drewes LR. 1989. Glucose transporter localization in brain using light and electron immunocytochemistry. *J Neurosci Res* 22:464-72.

Ghosh S, Castillo E, Frias ES, Swanson RA. 2017. Bioenergetic regulation of microglia. *Glia*.

Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. 2010. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 11:87-99.

Gimeno-Bayon J, Lopez-Lopez A, Rodriguez MJ, Mahy N. 2014. Glucose pathways adaptation supports acquisition of activated microglia phenotype. *J Neurosci Res* 92:723-31.

Gjedde A, Magistretti P. 2011. In: Winn HR, editor. *Youmans Neurological Surgery*. Philadelphia: Elsevier Saunders. p 123-146.

Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA. 1998. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280:1610-3.

Halestrap AP. 2013. Monocarboxylic acid transport. *Compr Physiol* 3:1611-43.

Halestrap AP, Price NT. 1999. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343 Pt 2:281-99.

Halestrap AP, Wilson MC. 2012. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life* 64:109-19.

Hallermann S, de Kock CP, Stuart GJ, Kole MH. 2012. State and location dependence of action potential metabolic cost in cortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 15:1007-14.

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

Harris JJ, Attwell D. 2012. The energetics of CNS white matter. *J Neurosci* 32:356-71.

Hassel B, Sonnewald U, Fonnum F. 1995. Glial-neuronal interactions as studied by cerebral metabolism of [2-<sup>13</sup>C]acetate and [1-<sup>13</sup>C]glucose: an ex vivo <sup>13</sup>C NMR spectroscopic study. *J Neurochem* 64:2773-82.

Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernandez E, Maestre C, Moncada S, Bolanos JP. 2009. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol* 11:747-52.

Hertz L, Rothman DL. 2017. Glutamine-Glutamate Cycle Flux Is Similar in Cultured Astrocytes and Brain and Both Glutamate Production and Oxidation Are Mainly Catalyzed by Aspartate Aminotransferase. *Biology (Basel)* 6.

Hirrlinger J, Nave KA. 2014. Adapting brain metabolism to myelination and long-range signal transduction. *Glia* 62:1749-61.

Hof PR, Pascale E, Magistretti PJ. 1988. K<sup>+</sup> at concentrations reached in the extracellular space during neuronal activity promotes a Ca<sup>2+</sup>-dependent glycogen hydrolysis in mouse cerebral cortex. *J Neurosci* 8:1922-8.

Hooper C, Sainz-Fuertes R, Lynham S, Hye A, Killick R, Warley A, Bolondi C, Pocock J, Lovestone S. 2012. Wnt3a induces exosome secretion from primary cultured rat microglia. *BMC Neurosci* 13:144.

Howarth C, Gleeson P, Attwell D. 2012. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1222-32.

Iadecola C, Nedergaard M. 2007. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 10:1369-76.

Itoh Y, Esaki T, Shimoji K, Cook M, Law MJ, Kaufman E, Sokoloff L. 2003. Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4879-84.

Izumi Y, Ishii K, Katsuki H, Benz AM, Zorumski CF. 1998. beta-Hydroxybutyrate fuels synaptic function during development. Histological and physiological evidence in rat hippocampal slices. *J Clin Invest* 101:1121-32.

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

Jimenez-Blasco D, Santofimia-Castano P, Gonzalez A, Almeida A, Bolanos JP. 2015. Astrocyte NMDA receptors' activity sustains neuronal survival through a Cdk5-Nrf2 pathway. *Cell Death Differ* 22:1877-89.

Johnson MT, Mahmood S, Patel MS. 2003. Intermediary metabolism and energetics during murine early embryogenesis. *J Biol Chem* 278:31457-60.

Joshi DC, Zhang CL, Lin TM, Gusain A, Harris MG, Tree E, Yin Y, Wu C, Sheng ZH, Dempsey RJ, Fabry Z, Chiu SY. 2015. Deletion of mitochondrial anchoring protects dysmyelinating shiverer: implications for progressive MS. *J Neurosci* 35:5293-306.

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19:5720-8.

Karagiannis A, Sylantyev S, Hadjihambi A, Hosford PS, Kasparov S, Gourine AV. 2016. Hemichannel-mediated release of lactate. *J Cereb Blood Flow Metab* 36:1202-11.

Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD. 2006. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9:173-9.

Kettenmann H, Backus KH, Schachner M. 1984. Aspartate, glutamate and gamma-aminobutyric acid depolarize cultured astrocytes. *Neurosci Lett* 52:25-9.

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461-553.

Kety S. 1957. The general metabolism of the brain in vivo. In: Richter D, editor. *Metabolism of the nervous system*. London: Pergamon. p 221-237.

Kety SS, Schmidt CF. 1948. The Nitrous Oxide Method for the Quantitative Determination of Cerebral Blood Flow in Man: Theory, Procedure and Normal Values. *J Clin Invest* 27:476-83.

Klugmann M, Schwab MH, Puhlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, Nave KA. 1997. Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* 18:59-70.

Knobloch M, Braun SM, Zurkirchen L, von Schoultz C, Zamboni N, Arauzo-Bravo MJ, Kovacs WJ, Karalay O, Suter U, Machado RA, Roccio M, Lutolf MP, Semenkovich CF, Jessberger S. 2013. Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis. *Nature* 493:226-30.

Knobloch M, Jessberger S. 2017. Metabolism and neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 42:45-52.

Kornyei Z, Czirok A, Vicsek T, Madarasz E. 2000. Proliferative and migratory responses of astrocytes to in vitro injury. *J Neurosci Res* 61:421-9.

Krebs HA. 1964. The metabolic fate of amino acids. In: Muro HN, Allison JB, editors. *Mammalian Protein Metabolism*. New York: Academic Press Inc. p 1:125.

Krebs HA, Williamson DH, Bates MW, Page MA, Hawkins RA. 1971. The role of ketone bodies in caloric homeostasis.

Laake JH, Takumi Y, Eidet J, Torgner IA, Roberg B, Kvamme E, Ottersen OP. 1999. Postembedding immunogold labelling reveals subcellular localization and pathway-specific enrichment of phosphate activated glutaminase in rat cerebellum. *Neuroscience* 88:1137-51.

Lalo U, Palygin O, Rasooli-Nejad S, Andrew J, Haydon PG, Pankratov Y. 2014. Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex. *PLoS Biol* 12:e1001747.

Lange C, Turrero Garcia M, Decimo I, Bifari F, Eelen G, Quaegebeur A, Boon R, Zhao H, Boeckx B, Chang J, Wu C, Le Noble F, Lambrechts D, Dewerchin M, Kuo CJ, Huttner WB, Carmeliet P. 2016. Relief of hypoxia by angiogenesis promotes neural stem cell differentiation by targeting glycolysis. *EMBO J* 35:924-41.

Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, Nicksch E, Lee J, Braun PE, Griffiths IR, Nave KA. 2003. Disruption of *Cnp1* uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* 33:366-74.

Larrabee MG. 1995. Lactate metabolism and its effects on glucose metabolism in an excised neural tissue. *J Neurochem* 64:1734-41.

Laughlin SB, Sejnowski TJ. 2003. Communication in neuronal networks. *Science* 301:1870-4.

Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151-70.

Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. 1992. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48:405-15.

Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD. 2012. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487:443-8.

Leen WG, Willemsen MA, Wevers RA, Verbeek MM. 2012. Cerebrospinal fluid glucose and lactate: age-specific reference values and implications for clinical practice. *PLoS One* 7:e42745.

Lennie P. 2003. The cost of cortical computation. *Curr Biol* 13:493-7.

Lerchundi R, Fernandez-Moncada I, Contreras-Baeza Y, Sotelo-Hitschfeld T, Machler P, Wyss MT, Stobart J, Baeza-Lehnert F, Alegria K, Weber B, Barros LF. 2015. NH<sub>4</sub>(+) triggers the release of astrocytic lactate via mitochondrial pyruvate shunting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:11090-5.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. 1991. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351:453-6.

Li Y, Du XF, Liu CS, Wen ZL, Du JL. 2012. Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Dev Cell* 23:1189-202.

Liu L, MacKenzie KR, Putluri N, Maletic-Savatic M, Bellen HJ. 2017. The Glia-Neuron Lactate Shuttle and Elevated ROS Promote Lipid Synthesis in Neurons and Lipid Droplet Accumulation in Glia via APOE/D. *Cell Metab* 26:719-737 e6.

Loers G, Aboul-Enein F, Bartsch U, Lassmann H, Schachner M. 2004. Comparison of myelin, axon, lipid, and immunopathology in the central nervous system of differentially myelin-compromised mutant mice: a morphological and biochemical study. *Mol Cell Neurosci* 27:175-89.

Lopez-Fabuel I, Le Douce J, Logan A, James AM, Bonvento G, Murphy MP, Almeida A, Bolanos JP. 2016. Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:13063-13068.

Lovatt D, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A, He W, Lin JH, Han X, Takano T, Wang S, Sim FJ, Goldman SA, Nedergaard M. 2007. The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J Neurosci* 27:12255-66.

Lundin A, Hasenson M, Persson J, Pousette A. 1986. Estimation of biomass in growing cell lines by adenosine triphosphate assay. *Methods Enzymol* 133:27-42.

Lyck L, Santamaria ID, Pakkenberg B, Chemnitz J, Schroder HD, Finsen B, Gundersen HJ. 2009. An empirical analysis of the precision of estimating the numbers of neurons and glia in human neocortex using a fractionator-design with sub-sampling. *J Neurosci Methods* 182:143-56.

Mackenzie B, Schafer MK, Erickson JD, Hediger MA, Weihe E, Varoqui H. 2003. Functional properties and cellular distribution of the system A glutamine transporter SNAT1 support specialized roles in central neurons. *J Biol Chem* 278:23720-30.

Madarasz E, Kiss J, Bartok I. 1984. Cell production and morphological pattern formation in primary brain cell cultures. I. Pattern formation within the basal layer(s). *Brain Res* 304:339-49.

Magistretti PJ, Allaman I. 2015. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron* 86:883-901.

Magistretti PJ, Allaman I. 2018. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nat Rev Neurosci* 19:235-249.



Magistretti PJ, Morrison JH, Shoemaker WJ, Sapin V, Bloom FE. 1981. Vasoactive intestinal polypeptide induces glycogenolysis in mouse cortical slices: a possible regulatory mechanism for the local control of energy metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:6535-9.

Magistretti PJ, Pellerin L. 1996. Cellular bases of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging: evidence for a prominent role of astrocytes. *Cereb Cortex* 6:50-61.

Magistretti PJ, Pellerin L. 1999. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:1155-63.

Magri L, Cambiaghi M, Cominelli M, Alfaro-Cervello C, Cursi M, Pala M, Bulfone A, Garcia-Verdugo JM, Leocani L, Minicucci F, Poliani PL, Galli R. 2011. Sustained activation of mTOR pathway in embryonic neural stem cells leads to development of tuberous sclerosis complex-associated lesions. *Cell Stem Cell* 9:447-62.

Margolis RL. 1981. Role of GTP hydrolysis in microtubule treadmilling and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:1586-90.

Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41:535-47.

Matheson DF. 1970. Some quantitative aspects of myelination of the optic nerve in rat. *Brain Res* 24:257-69.

Mattson MP, Liu D. 2002. Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* 2:215-31.

Mc IH. 1953. Substances which support respiration and metabolic response to electrical impulses in human cerebral tissues. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 16:257-66.

McGale EH, Pye IF, Stonier C, Hutchinson EC, Aber GM. 1977. Studies of the inter-relationship between cerebrospinal fluid and plasma amino acid concentrations in normal individuals. *J Neurochem* 29:291-7.

Menendez JA, Lupu R. 2007. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 7:763-77.

Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, Durafourt BA, Bar-Or A, Antel JP, Moore CS. 2015. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain* 138:1138-59.

Minn A. 1982. Glutamine uptake by isolated rat brain mitochondria. *Neuroscience* 7:2859-65.

Mitchison T, Kirschner M. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312:237-42.

Morita M, Gravel SP, Hulea L, Larsson O, Pollak M, St-Pierre J, Topisirovic I. 2015. mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle* 14:473-80.

Morrison BM, Tsingalia A, Vidensky S, Lee Y, Jin L, Farah MH, Lengacher S, Magistretti PJ, Pellerin L, Rothstein JD. 2015. Deficiency in monocarboxylate transporter 1 (MCT1) in mice delays regeneration of peripheral nerves following sciatic nerve crush. *Exp Neurol* 263:325-38.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.

Nave KA. 2010. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468:244-52.

Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523-30.

Nehlig A. 2004. Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70:265-75.

Nehlig A, Wittendorp-Rechenmann E, Lam CD. 2004. Selective uptake of [<sup>14</sup>C]2-deoxyglucose by neurons and astrocytes: high-resolution microautoradiographic imaging

by cellular <sup>14</sup>C-trajectography combined with immunohistochemistry. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:1004-14.

Nemeth B, Doczi J, Csete D, Kacso G, Ravasz D, Adams D, Kiss G, Nagy AM, Horvath G, Tretter L, Mocsai A, Csepanyi-Komi R, Jordanov I, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. 2015. Abolition of mitochondrial substrate-level phosphorylation by itaconic acid produced by LPS-induced Irg1 expression in cells of murine macrophage lineage. *FASEB J*.

Newman LA, Korol DL, Gold PE. 2011. Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. *PLoS One* 6:e28427.

Newsholme P. 2001. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J Nutr* 131:2515S-22S; discussion 2523S-4S.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-8.

Nimmo GA, Tipton KF. 1979. The distribution of soluble and membrane-bound forms of glutaminase in pig brain. *J Neurochem* 33:1083-4.

Nitsch C, Schmude B, Haug P. 1983. Alterations in the content of amino acid neurotransmitters before the onset and during the course of methoxypyridoxine-induced seizures in individual rabbit brain regions. *J Neurochem* 40:1571-80.

Niven JE, Anderson JC, Laughlin SB. 2007. Fly photoreceptors demonstrate energy-information trade-offs in neural coding. *PLoS Biol* 5:e116.

Niven JE, Laughlin SB. 2008. Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. *J Exp Biol* 211:1792-804.

Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. 1979. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161:303-10.

Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JH, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojemann JG, Ransom BR, Goldman SA, Nedergaard M. 2009. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci* 29:3276-87.

Olalla L, Gutierrez A, Campos JA, Khan ZU, Alonso FJ, Segura JA, Marquez J, Aledo JC. 2002. Nuclear localization of L-type glutaminase in mammalian brain. *J Biol Chem* 277:38939-44.

Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. 2015. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*.

Owen OE, Morgan AP, Kemp HG, Sullivan JM, Herrera MG, Cahill GF, Jr. 1967. Brain metabolism during fasting. *J Clin Invest* 46:1589-95.

Page MA, Williamson DH. 1971. Activity of ketone-body utilization pathway in brain of suckling and adult rats. *Biochem J* 121:16P.

Paliouras GN, Hamilton LK, Aumont A, Joppe SE, Barnabe-Heider F, Fernandes KJ. 2012. Mammalian target of rapamycin signaling is a key regulator of the transit-amplifying progenitor pool in the adult and aging forebrain. *J Neurosci* 32:15012-26.

Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT. 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333:1456-8.

Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, 3rd, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB. 2013. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155:1596-609.

Pascual JM, Carceller F, Roda JM, Cerdan S. 1998. Glutamate, glutamine, and GABA as substrates for the neuronal and glial compartments after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 29:1048-56; discussion 1056-7.

Patel AB, de Graaf RA, Rothman DL, Behar KL. 2015. Effects of gamma-Aminobutyric acid transporter 1 inhibition by tiagabine on brain glutamate and gamma-Aminobutyric acid metabolism in the anesthetized rat *In vivo*. *J Neurosci Res* 93:1101-8.

Pellerin L, Magistretti PJ. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10625-9.

Pelvig DP, Pakkenberg H, Stark AK, Pakkenberg B. 2008. Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol Aging* 29:1754-62.

Peng L, Zhang X, Hertz L. 1994. High extracellular potassium concentrations stimulate oxidative metabolism in a glutamatergic neuronal culture and glycolysis in cultured astrocytes but have no stimulatory effect in a GABAergic neuronal culture. *Brain Res* 663:168-72.

Persson M, Sandberg M, Hansson E, Ronnback L. 2006. Microglial glutamate uptake is coupled to glutathione synthesis and glutamate release. *Eur J Neurosci* 24:1063-70.

Petersen MA, Dailey ME. 2004. Diverse microglial motility behaviors during clearance of dead cells in hippocampal slices. *Glia* 46:195-206.

Philips T, Rothstein JD. 2017. Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons. *J Clin Invest* 127:3271-3280.

Philp NJ, Yoon H, Grollman EF. 1998. Monocarboxylate transporter MCT1 is located in the apical membrane and MCT3 in the basal membrane of rat RPE. *Am J Physiol* 274:R1824-8.

Pierre K, Pellerin L, Debernardi R, Riederer BM, Magistretti PJ. 2000. Cell-specific localization of monocarboxylate transporters, MCT1 and MCT2, in the adult mouse brain revealed by double immunohistochemical labeling and confocal microscopy. *Neuroscience* 100:617-27.

Prinz M, Priller J. 2014. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* 15:300-12.

Purdon A, Rapoport S. 2007. Energy consumption by phospholipid metabolism in mammalian brain. In: Lajtha A, Gibson GE, Diener GA, editors. *Handbook of*

neurochemistry and molecular neurobiology: Brain energetics Integration of molecular and cellular processes. New York: Springer. p 402-427.

Rafiki A, Boulland JL, Halestrap AP, Ottersen OP, Bergersen L. 2003. Highly differential expression of the monocarboxylate transporters MCT2 and MCT4 in the developing rat brain. *Neuroscience* 122:677-88.

Rasband MN, Tayler J, Kaga Y, Yang Y, Lappe-Siefke C, Nave KA, Bansal R. 2005. CNP is required for maintenance of axon-glia interactions at nodes of Ranvier in the CNS. *Glia* 50:86-90.

Rebsamen M, Pochini L, Stasyk T, de Araujo ME, Galluccio M, Kandasamy RK, Snijder B, Fauster A, Rudashevskaya EL, Bruckner M, Scorzoni S, Filipek PA, Huber KV, Bigenzahn JW, Heinz LX, Kraft C, Bennett KL, Indiveri C, Huber LA, Superti-Furga G. 2015. SLC38A9 is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that controls mTORC1. *Nature* 519:477-81.

Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, Hol EM. 2016. The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Front Hum Neurosci* 10:566.

Reichel A, Begley DJ, Ermisch A. 1995. Changes in amino acid levels in rat plasma, cisternal cerebrospinal fluid, and brain tissue induced by intravenously infused arginine-vasopressin. *Peptides* 16:965-71.

Reinstrup P, Stahl N, Mellergard P, Uski T, Ungerstedt U, Nordstrom CH. 2000. Intracerebral microdialysis in clinical practice: baseline values for chemical markers during wakefulness, anesthesia, and neurosurgery. *Neurosurgery* 47:701-9; discussion 709-10.

Rinholm JE, Bergersen LH. 2014. White matter lactate--does it matter? *Neuroscience* 276:109-16.

Roberg B, Torgner IA, Kvamme E. 1995. The orientation of phosphate activated glutaminase in the inner mitochondrial membrane of synaptic and non-synaptic rat brain mitochondria. *Neurochem Int* 27:367-76.

Roberg B, Torgner IA, Kvamme E. 1999a. Glutamine transport in rat brain synaptic and non-synaptic mitochondria. *Neurochem Res* 24:383-90.

Roberg B, Torgner IA, Kvamme E. 1999b. Inhibition of glutamine transport in rat brain mitochondria by some amino acids and tricarboxylic acid cycle intermediates. *Neurochem Res* 24:809-14.

Rolfe DF, Brown GC. 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77:731-58.

Rose CR, Karus C. 2013. Two sides of the same coin: sodium homeostasis and signaling in astrocytes under physiological and pathophysiological conditions. *Glia* 61:1191-205.

Ruminot I, Gutierrez R, Pena-Munzenmayer G, Anazco C, Sotelo-Hitschfeld T, Lerchundi R, Niemeyer MI, Shull GE, Barros LF. 2011. NBCe1 mediates the acute stimulation of astrocytic glycolysis by extracellular K<sup>+</sup>. *J Neurosci* 31:14264-71.

Saab AS, Nave KA. 2016. Neuroscience: A mechanism for myelin injury. *Nature* 529:474-5.

Saab AS, Tzvetanova ID, Nave KA. 2013. The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. *Curr Opin Neurobiol* 23:1065-72.

Saab AS, Tzvetavona ID, Trevisiol A, Baltan S, Dibaj P, Kusch K, Mobius W, Goetze B, Jahn HM, Huang W, Steffens H, Schomburg ED, Perez-Samartin A, Perez-Cerda F, Bakhtiari D, Matute C, Lowel S, Griesinger C, Hirrlinger J, Kirchhoff F, Nave KA. 2016. Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. *Neuron* 91:119-32.

San Martin A, Arce-Molina R, Galaz A, Perez-Guerra G, Barros LF. 2017. Nanomolar nitric oxide concentrations quickly and reversibly modulate astrocytic energy metabolism. *J Biol Chem* 292:9432-9438.

San Martin A, Ceballo S, Ruminot I, Lerchundi R, Frommer WB, Barros LF. 2013. A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the Warburg effect in single cancer cells. *PLoS One* 8:e57712.

Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. 2008. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320:1496-501.

Saura J, Tusell JM, Serratos J. 2003. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 44:183-9.

Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. 2012. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74:691-705.

Schlett K, Madarasz E. 1997. Retinoic acid induced neural differentiation in a neuroectodermal cell line immortalized by p53 deficiency. *J Neurosci Res* 47:405-15.

Schneider L, Giordano S, Zelickson BR, M SJ, G AB, Ouyang X, Fineberg N, Darley-Usmar VM, Zhang J. 2011. Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 51:2007-17.

Schneider S, Gruart A, Grade S, Zhang Y, Kroger S, Kirchhoff F, Eichele G, Delgado Garcia JM, Dimou L. 2016. Decrease in newly generated oligodendrocytes leads to motor dysfunctions and changed myelin structures that can be rescued by transplanted cells. *Glia* 64:2201-2218.

Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS. 2013. Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:102.

Schousboe A, Hertz L, Svenneby G, Kvamme E. 1979. Phosphate activated glutaminase activity and glutamine uptake in primary cultures of astrocytes. *J Neurochem* 32:943-50.

Schurr A. 2014. Cerebral glycolysis: a century of persistent misunderstanding and misconception. *Front Neurosci* 8:360.

Schurr A, West CA, Rigor BM. 1988. Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science* 240:1326-8.



Seyfried TN, Flores R, Poff AM, D'Agostino DP, Mukherjee P. 2015. Metabolic therapy: a new paradigm for managing malignant brain cancer. *Cancer Lett* 356:289-300.

Shank RP, Bennett GS, Freytag SO, Campbell GL. 1985. Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. *Brain Res* 329:364-7.

Sibson NR, Dhankhar A, Mason GF, Rothman DL, Behar KL, Shulman RG. 1998. Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:316-21.

Sierra A, Beccari S, Diaz-Aparicio I, Encinas JM, Comeau S, Tremblay ME. 2014. Surveillance, phagocytosis, and inflammation: how never-resting microglia influence adult hippocampal neurogenesis. *Neural Plast* 2014:610343.

Simon MC, Keith B. 2008. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:285-96.

Simons M, Nave KA. 2015. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:a020479.

Smith D, Pernet A, Hallett WA, Bingham E, Marsden PK, Amiel SA. 2003. Lactate: a preferred fuel for human brain metabolism in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:658-64.

Smith QR. 2000. Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *J Nutr* 130:1016S-22S.

Smith QR, Momma S, Aoyagi M, Rapoport SI. 1987. Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *J Neurochem* 49:1651-8.

Snaidero N, Mobius W, Czopka T, Hekking LH, Mathisen C, Verkleij D, Goebbels S, Edgar J, Merkler D, Lyons DA, Nave KA, Simons M. 2014. Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell* 156:277-90.

Snaidero N, Simons M. 2017. The logistics of myelin biogenesis in the central nervous system. *Glia* 65:1021-1031.

Snaidero N, Velte C, Myllykoski M, Raasakka A, Ignatev A, Werner HB, Erwig MS, Mobius W, Kursula P, Nave KA, Simons M. 2017. Antagonistic Functions of MBP and CNP Establish Cytosolic Channels in CNS Myelin. *Cell Rep* 18:314-323.

Sokoloff L. 1960. The metabolism of the central nervous system in vivo. In: Field J, Magoun HW, Hall VE, editors. *Handbook of physiology-neurophysiology*. Washington, DC: American Physiological Society. p 1843–1864.

Sokoloff L. 1973. Metabolism of ketone bodies by the brain. *Annu Rev Med* 24:271-80.

Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M. 1977. The [<sup>14</sup>C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 28:897-916.

Sorg O, Magistretti PJ. 1991. Characterization of the glycogenolysis elicited by vasoactive intestinal peptide, noradrenaline and adenosine in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes. *Brain Res* 563:227-33.

Sorg O, Pellerin L, Stolz M, Beggah S, Magistretti PJ. 1995. Adenosine triphosphate and arachidonic acid stimulate glycogenolysis in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes. *Neurosci Lett* 188:109-12.

Sotelo-Hitschfeld T, Niemeyer MI, Machler P, Ruminot I, Lerchundi R, Wyss MT, Stobart J, Fernandez-Moncada I, Valdebenito R, Garrido-Gerter P, Contreras-Baeza Y, Schneider BL, Aebischer P, Lengacher S, San Martin A, Le Douce J, Bonvento G, Magistretti PJ, Sepulveda FV, Weber B, Barros LF. 2015. Channel-mediated lactate release by K(+)-stimulated astrocytes. *J Neurosci* 35:4168-78.

Steib A, Rendon A, Mark J, Borg J. 1986. Preferential glutamine uptake in rat brain synaptic mitochondria. *FEBS Lett* 207:63-8.

Stence N, Waite M, Dailey ME. 2001. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33:256-66.

Stiles PG, Lusk G. 1903. On the formation of dextrose in metabolism from the end-products of a pancreatic digest of meat. *Am J Physiol* 9:380.

Stobart JL, Anderson CM. 2013. Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Front Cell Neurosci* 7:38.

Stoll EA, Makin R, Sweet IR, Trevelyan AJ, Miwa S, Horner PJ, Turnbull DM. 2015. Neural Stem Cells in the Adult Subventricular Zone Oxidize Fatty Acids to Produce Energy and Support Neurogenic Activity. *Stem Cells* 33:2306-19.

Supplie LM, Duking T, Campbell G, Diaz F, Moraes CT, Gotz M, Hamprecht B, Boretius S, Mahad D, Nave KA. 2017. Respiration-Deficient Astrocytes Survive As Glycolytic Cells In Vivo. *J Neurosci* 37:4231-4242.

Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, Alberini CM. 2011. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144:810-23.

Svoboda N, Kerschbaum HH. 2009. L-Glutamine-induced apoptosis in microglia is mediated by mitochondrial dysfunction. *Eur J Neurosci* 30:196-206.

Szabo-Taylor K, Ryan B, Osteikoetxea X, Szabo TG, Sodar B, Holub M, Nemeth A, Paloczi K, Pallinger E, Winyard P, Buzas EI. 2015. Oxidative and other posttranslational modifications in extracellular vesicle biology. *Semin Cell Dev Biol* 40:8-16.

Tay TL, Mai D, Dautzenberg J, Fernandez-Klett F, Lin G, Sagar, Datta M, Drougard A, Stempfl T, Ardura-Fabregat A, Staszewski O, Margineanu A, Sporberr A, Steinmetz LM, Pospisilik JA, Jung S, Priller J, Grun D, Ronneberger O, Prinz M. 2017. A new fate mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia. *Nat Neurosci* 20:793-803.

Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, Nguyen HT, Fischer JD, Matsen ME, Wisse BE, Morton GJ,

Horvath TL, Baskin DG, Tschop MH, Schwartz MW. 2012. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* 122:153-62.

Tholey G, Roth-Schechter BF, Mandel P. 1981. Activity and isoenzyme pattern of lactate dehydrogenase in neurons and astroblasts cultured from brains of chick embryos. *J Neurochem* 36:77-81.

Tildon JT, Merrill S, Roeder LM. 1983. Differential substrate oxidation by dissociated brain cells and homogenates during development. *Biochem J* 216:21-5.

Tomassy GS, Berger DR, Chen HH, Kasthuri N, Hayworth KJ, Vercelli A, Seung HS, Lichtman JW, Arlotta P. 2014. Distinct profiles of myelin distribution along single axons of pyramidal neurons in the neocortex. *Science* 344:319-24.

Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK. 2010. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 8:e1000527.

Tsacopoulos M, Magistretti PJ. 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16:877-85.

Van Blerkom J. 2009. Mitochondria in early mammalian development. *Semin Cell Dev Biol* 20:354-64.

van den Berg CJ, Garfinkel D. 1971. A simulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. *Biochem J* 123:211-8.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324:1029-33.

Vannucci SJ. 1994. Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in rat brain. *J Neurochem* 62:240-6.

Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. 1997. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21:2-21.

Varoqui H, Zhu H, Yao D, Ming H, Erickson JD. 2000. Cloning and functional identification of a neuronal glutamine transporter. *J Biol Chem* 275:4049-54.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184:39-51.

Vilchez D, Ros S, Cifuentes D, Pujadas L, Valles J, Garcia-Fojeda B, Criado-Garcia O, Fernandez-Sanchez E, Medrano-Fernandez I, Dominguez J, Garcia-Rocha M, Soriano E, Rodriguez de Cordoba S, Guinovart JJ. 2007. Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat Neurosci* 10:1407-13.

Volkenhoff A, Weiler A, Letzel M, Stehling M, Klambt C, Schirmeier S. 2015. Glial Glycolysis Is Essential for Neuronal Survival in *Drosophila*. *Cell Metab* 22:437-47.

Voloboueva LA, Emery JF, Sun X, Giffard RG. 2013. Inflammatory response of microglial BV-2 cells includes a glycolytic shift and is modulated by mitochondrial glucose-regulated protein 75/mortalin. *FEBS Lett* 587:756-62.

Volterra A, Meldolesi J. 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-40.

Vorobjev IA, Rodionov VI, Maly IV, Borisy GG. 1999. Contribution of plus and minus end pathways to microtubule turnover. *J Cell Sci* 112 ( Pt 14):2277-89.

Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton JY, Magistretti PJ, Pellerin L. 2003. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37:275-86.

Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. 2009. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29:3974-80.

Wang S, Tsun ZY, Wolfson RL, Shen K, Wyant GA, Plovanich ME, Yuan ED, Jones TD, Chantranupong L, Comb W, Wang T, Bar-Peled L, Zoncu R, Straub C, Kim C, Park J, Sabatini BL, Sabatini DM. 2015. Metabolism. Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science* 347:188-94.

- Warburg O. 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124:269-70.
- Weber B, Barros LF. 2015. The Astrocyte: Powerhouse and Recycling Center. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7.
- Whittam R. 1962. The dependence of the respiration of brain cortex on active cation transport. *Biochem J* 82:205-12.
- Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. 2017. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol* 79:619-643.
- Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X. 2013. The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy* 9:124-37.
- Wu P, Blair PV, Sato J, Jaskiewicz J, Popov KM, Harris RA. 2000. Starvation increases the amount of pyruvate dehydrogenase kinase in several mammalian tissues. *Arch Biochem Biophys* 381:1-7.
- Xu GY, McAdoo DJ, Hughes MG, Robak G, de Castro R, Jr. 1998. Considerations in the determination by microdialysis of resting extracellular amino acid concentrations and release upon spinal cord injury. *Neuroscience* 86:1011-21.
- Xun Z, Lee DY, Lim J, Canaria CA, Barnebey A, Yanonne SM, McMurray CT. 2012. Retinoic acid-induced differentiation increases the rate of oxygen consumption and enhances the spare respiratory capacity of mitochondria in SH-SY5Y cells. *Mech Ageing Dev* 133:176-85.
- Yeh YY, Streuli VL, Zee P. 1977. Ketone bodies serve as important precursors of brain lipids in the developing rat. *Lipids* 12:957-64.
- Young KM, Psachoulia K, Tripathi RB, Dunn SJ, Cossell L, Attwell D, Tohyama K, Richardson WD. 2013. Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron* 77:873-85.
- Yu AC, Drejer J, Hertz L, Schousboe A. 1983. Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons. *J Neurochem* 41:1484-7.

Zadori A, Agoston VA, Demeter K, Hadinger N, Varady L, Kohidi T, Gobl A, Nagy Z, Madarasz E. 2011. Survival and differentiation of neuroectodermal cells with stem cell properties at different oxygen levels. *Exp Neurol* 227:136-48.

Zhang J, Nuebel E, Daley GQ, Koehler CM, Teitell MA. 2012. Metabolic regulation in pluripotent stem cells during reprogramming and self-renewal. *Cell Stem Cell* 11:589-95.

Zhang WM, Natowicz MR. 2013. Cerebrospinal fluid lactate and pyruvate concentrations and their ratio. *Clin Biochem* 46:694-7.

Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ. 2014. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci* 34:11929-47.

Zielke HR, Collins RM, Jr., Baab PJ, Huang Y, Zielke CL, Tildon JT. 1998. Compartmentation of [<sup>14</sup>C]glutamate and [<sup>14</sup>C]glutamine oxidative metabolism in the rat hippocampus as determined by microdialysis. *J Neurochem* 71:1315-20.

Zieminska E, Hilgier W, Waagepetersen HS, Hertz L, Sonnewald U, Schousboe A, Albrecht J. 2004. Analysis of glutamine accumulation in rat brain mitochondria in the presence of a glutamine uptake inhibitor, histidine, reveals glutamine pools with a distinct access to deamidation. *Neurochem Res* 29:2121-3.

Zilberter Y, Zilberter T, Bregestovski P. 2010. Neuronal activity in vitro and the in vivo reality: the role of energy homeostasis. *Trends Pharmacol Sci* 31:394-401.

Zimmer ER, Parent MJ, Souza DG, Leuzy A, Lecrux C, Kim HI, Gauthier S, Pellerin L, Hamel E, Rosa-Neto P. 2017. [(18)F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport. *Nat Neurosci* 20:393-395.

## 12. Saját publikációk jegyzéke

### **Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:**

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

**IF: 4.280**

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

**IF: 3.562**

### **Egyéb közlemények:**

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

**IF: 5.168**

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

**IF: 5.498**