

A 2-AG jelpálya molekuláris anatómiai vizsgálata glutamáterg szinapszisokban

Doktori tézisek

Katona-Urbán Gabriella

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Freund Tamás, MTA rendes tagja,
kutatóprofesszor

Hivatalos bírálók: Dr. Alpár Alán, MTA doktora,
habilitált egyetemi docens
Dr. Rácz Bence, PhD,
habilitált egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Csillag András, biológiai tudományok
doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kittel Ágnes, MTA doktora,
tudományos tanácsadó
Dr. Kocsis Katalin, PhD,
egyetemi adjunktus

Budapest
2016

Bevezetés

Az anterográd jelátviteli útvonalaktól eltérően a kémiai szinapszisok visszacsatolás elvén alapuló szabályozásában szerepet játszó retrográd jelátviteli útvonalakról kevesebb részletes tudás áll rendelkezésünkre. Az elmúlt másfél évtizedben kiderült, hogy létezik egy sokkal általánosabb élettani szerepet játszó retrográd jelátviteli útvonal is, az úgynevezett endokannabinoid jelpálya (Kreitzer és Regehr, 2001; Ohno-Shosaku et al., 2001; Wilson és Nicoll, 2001), amely a gerincvelőtől az agykéregig a kémiai szinapszisok túlnyomó többségében alapvető fontosságú szerepet tölt be az anterográd ingerületátvivő anyagok felszabadulásának aktivitás-függő szabályozásában (Castillo et al., 2012; Ohno-Shosaku és Kano, 2014). Mai tudásunk szerint a szinaptikus endokannabinoid jelpálya elsődlegesen negatív visszacsatolásként működik és ezzel kulcsszerepet játszik a kémiai szinapszisok rövid távú, hosszú távú vagy tónusos depressziójában (Castillo et al., 2012). Mai tudásunk szerint az endokannabinoidok élettani és kórélettani jelentősége nagyrészt ezen a működési elven alapszik.

Az endokannabinoid rendszer molekuláris és anatómia felépítése

Az endokannabinoid rendszer működésében résztvevő legfontosabb molekuláris alkotóelemek három nagyobb csoportját különböztetjük meg:

1. G-protein kapcsolt fehérjék csoportjába tartozó (klasszikusan CB₁ és CB₂) kannabinoid receptorok: A fitokannabinoid THC pszichoaktív hatásának és az endokannabinoidok fiziológiai hatásainak közvetítésében a központi idegrendszerben a CB₁ kannabinoid receptor játssza a legfontosabb szerepet rágcsálókban és emberben egyaránt (Ledent et al., 1999; Zimmer et al., 1999; Huestis et al., 2001; Monory et al., 2007, Kano et al., 2009). Mai tudásunk szerint ez a receptor fordul elő a legnagyobb mennyiségben a központi idegrendszerben. A CB₁ receptorok elsősorban G_{i/o}-kapcsoltak. Megjegyzendő, hogy a klasszikus kannabinoid receptorokon kívül több más olyan receptor is van, amelyeket egyes irodalmi adatok szerint a fitokannabinoidok vagy az endokannabinoidok aktiválni képesek.

2. Endokannabinoidok: Az anandamid és a 2-AG, a legalaposabban vizsgált molekulák ezeket klasszikus endokannabinoid molekuláknak nevezünk. Mindkettő lipidszármazék és mindkettő az idegsejtek sejtmembránjában található prekursor foszfolipidekből

keletkezik több enzimatis lépésben. Az elmúlt tíz év kutatási eredményei egyértelműen arra utalnak, hogy az ismert endokannabinoid molekulák közül a 2-AG viselkedik „klasszikus” szinaptikus endokannabinoidként. Farmakológiai, valamint genetikai bizonyítékok alapján a CB₁ kannabinoid receptor-mediálta retrográd endokannabinoid hatásért is nagy valószínűséggel ez a molekula felelős (Ohno-Shosaku és Kano, 2014). A dolgozatomban bemutatott munkában is ezen molekula által közvetített retrográd endokannabinoid jelpálya felépítésének pontosabb megismerése volt a cél.

3. Metabolikus enzimek: Biokémiai kísérletek alapján számos enzim ismert, amelyek potenciálisan részt vehetnek a 2-AG és az anandamid szintézisében és lebontásában. A legfontosabb szintézisútvonalat tekintve a 2-AG a membránalkotó foszfolipidből foszfolipáz C β (PLC β) enzim aktivációja által (Stella et al., 1997; Hashimoto et al., 2005) keletkezett DAG-ból (1,2-diacil-glicerin) keletkezik egy membránlokalizált, négy transzmembrán fehérjével rendelkező sn-1-specifikus diacil-glicerin lipáz (DGL) enzim segítségével. Ennek az enzimnek két izoformája fordul elő az agyban (DGL- α és DGL- β) de a génkiütött (KO) egerekkel végzett kísérletek feltárták, hogy a 2-AG szintéziséért az agyban elsősorban az α izoforma felelős (Gao et al., 2010; Tanimura et al. 2010, Yoshino et al., 2011). A 2-AG lebontásában leggyakrabban a hidrolízisnek lehet szerepe, melyben szerepet játszó enzimek közül az MGL (monoacil-glicerin lipáz) a legfontosabb és az agyban található 2-AG körülbelül 85%-ának hidrolízisét ez az enzim végzi (Blankman et al. 2007).

A szinaptikus endokannabinoid jelpálya működése

Amikor a doktori munkámban bemutatott kutatásokat elkezdtük még nem volt ismert, hogy melyik endokannabinoid molekula játssza a főszerepet a szinaptikus endokannabinoid jelpályában, mint hírvivő anyag és az is részben ismeretlen volt, hogy milyen enzimek szabályozhatják a szinaptikus endokannabinoidok szintjét. Azóta a szakterület fejlődése elvezetett egy általánosan elfogadott működési modellhez, amely részben integrálja az Eredmények fejezetben bemutatott kísérleti megfigyeléseinket is. Ezért a következőkben a kronológiai sorrendet némiképpen megtörve röviden ezt a modellt fogom bemutatni, hogy az olvasó számára minél naprakészebb legyen a dolgozat és minél jobban tükrözze mai tudásunkat.

A „klasszikus” szinaptikus endokannabinoid 2-AG-t a szinaptikus hírvivő szerepére az is alkalmassá teszi, hogy a CB₁ kannabinoid receptor elsődleges ligandja, amely a receptor aktivációja során teljes agonistaként viselkedik. A szintetizáló enzime, a DGL- α posztszinaptikusan fordul elő, molekuláris célpontja a CB₁ receptor, valamint lebontó enzime az MGL pedig preszinaptikusan az axonterminálisokon található (Katona et al., 1999; Dinh et al., 2002; Gulyás et al., 2004). Ez a szinaptikus molekuláris anatómiai szerveződés is összhangban van a 2-AG, mint retrográd szinaptikus jelmolekula modelljével, melyet farmakológiai kísérletek is alátámasztanak. Ezen megfontolásból az endokannabinoid rendszer szinaptikus működését a 2-AG jelpályára fókuszálva részletezem pár mondatban.

Mai tudásunk szerint, amely a kiterjedt elektrofiziológiai vizsgálatok eredményein alapul, koncepcionális szempontból két fő mechanizmus, az idegsejtek kellő mértékű depolarizációja és a plazmamembránban elhelyezkedő G_{q/11} típusú G-fehérjét tartalmazó G-fehérje kapcsolt metabotróp receptorok (ilyenek például az mGluR₁ és mGluR₅) aktivációja, valamint ezek kombinációja vezethet 2-AG felszabaduláshoz (Ohno-Shosaku és Kano, 2014). Kvantitatív neuroanatómiai vizsgálatok alapján, amelyek a 2-AG szintézis-útvonalának molekuláris alkotóelemeit vizsgálták, fény derült arra, hogy az mGluR₁/mGluR₅ receptorok, a G_{q/11} fehérjék és a PLC β enzim szubszinaptikus lokalizációja jellegzetes eloszlást mutat. Ezek a fehérjék intraszinaptikusan a serkentő szinapszisokra jellemző posztszinaptikus denzitás (PSD) területéről hiányoznak, ezzel szemben szelektív bedúsulásuk tapasztalható a PSD szélén az úgynevezett periszinaptikus zónában (Baude et al., 1993; Lujan et al., 1996; Tanaka et al., 2000; Uchigashima et al., 2007; Fukaya et al. 2008). Ezzel párhuzamosan pedig saját kísérleti eredményeink feltárták, hogy a DGL- α a serkentő szinapszisok szélén szintén egy periszinaptikus gyűrűben koncentrálódik (részletesen lásd később az Eredmények fejezetben), amelyet mások is megerősítettek (Yoshida et al., 2006). A 2-AG szintézisében részt vevő makromolekuláris komplex periszinaptikus összetartására a Homer állványzatfehérjék szolgálnak (Brakeman et al., 1997; Jung et al., 2007; Tang és Alger, 2015). A 2-AG szintézisében szerepet játszó fehérjekomplex a periszinaptikus masina (PSM) elnevezést kapta, hogy elkülöníthető legyen a funkcionálisan eltérő feladatú PSD fehérjekomplextől (Katona és Freund, 2008). A rendszer feladata, hogy lefordítsa az anterográd transzmisszió mértékét egy retrográd visszacsatolási jellé. A

preszinaptikus sejt túlzott aktivitása esetén a PSM területén található metabotróp glutamát receptorok aktivációja beindítja a 2-AG termelődését és így a retrográd szinaptikus válasz képes lecsendesíteni a preszinaptikus sejt működését (szinaptikus biztosíték modell). A posztszinaptikusan felszabaduló 2-AG a preszinaptikus CB₁ receptorokhoz kötődve általában olyan molekuláris folyamatokat indít el, amelyek a szinaptikus átvitel depresszióját okozzák. Egy szinapszis elcsendesítése időbeliségét tekintve lehet rövid vagy hosszú távú és a szinaptikus plaszticitásnak ezek a formái egyaránt előfordulhatnak serkentő és gátló szinapszisok esetében (összefoglalásként lásd Castillo et al., 2012). Ezek egymástól abban különböznek, hogy az aktiváció hatására milyen másodlagos jelátviteli kaszkádok indulnak be. A rövid távú hatásnál, amikor a receptorok csak rövid ideig aktiválódnak, valószínűleg a CB₁ receptor aktivációja a G-fehérje βγ alegységének közvetítésével gátolja a feszültség-függő kalcium csatornák működését és így a kalcium ionok beáramlását az idegvégződésbe (Mackie és Hille, 1992; Herlitze et al., 1996). A receptor tartós aktivációja (G fehérjék α_{i/o} alegységén keresztül) az adenilát-cikláz gátlását is eredményezheti és ezzel a preszinaptikus cAMP szint csökkenéséhez vezet, ami pedig a hosszú távú szinaptikus depresszióban alapvető jelentőségű (Chevalyere et al., 2007).

Az általam vizsgált két agyterület közül az egyik a hippokampusz, mely a szinaptikus plaszticitás vizsgálatának szempontjából kulcsfontosságú terület és a tanulási folyamatok vizsgálatában is kiemelkedő szerepe van, illetve a VTA (ventrális tegmentális área), ahol az agyi jutalmazórendszerben és motivációs folyamatokban kulcsszerepet játszó dopamintermelő sejtek helyezkednek el.

Célkitűzések

A szinaptikus endokannabinoid rendszer általános működési elvének megértéséhez részletes ismeretek szükségesek a jelpálya molekuláris alkotóelemeinek pontos celluláris és szubcelluláris eloszlásáról. Ezért kutatómunkám során első fő célul tűztük ki, hogy:

- I. Feltárjuk a 2-AG egyik szintetizáló enzimének a DGL- α -nak és a 2-AG molekuláris célpontjának a CB₁ kannabinoid receptornak precíz celluláris és szubcelluláris lokalizációját a hippocampusz principális sejtjeiben.

Vizsgálataink során a következő specifikus kérdésekre kerestük a választ:

1. Megtalálható-e a hippocampális glutamáterg sejt típusokban a DGL- α mRNS és az enzimfehérje?
2. Azokban a principális sejtjeiben, amelyekben megtalálható a DGL- α enzim, vajon milyen az enzimfehérje szubcelluláris lokalizációja, milyen szinapsztikus típusokban található meg?
3. Milyen típusú glutamáterg sejtjeiben található meg a CB₁ receptor és mi a precíz szubcelluláris lokalizációja?
4. A DGL- α enzim és a CB₁ receptor megtalálható-e egymás közelében, a 2-AG jelpálya két alkotóeleme kolokalizál-e egy adott serkentő szinapszisban?

Régóta ismert volt, hogy az endokannabinoidok a szinaptikus plaszticitás sok formájában, mint például a hosszú távú szinaptikus depresszió alapvető szerepet játszanak a központi idegrendszer legtöbb vizsgált sejt típusában. Meglepő módon néhány korábbi tanulmány azt sugallta, hogy a hippocampális interneuronokra érkező serkentő szinapszisokban nincsen endokannabinoid-LTD. Ezért kutatómunkám során második fő célként tűztük ki annak vizsgálatát, hogy:

- II. A hippocampális interneuronokra érkező serkentő szinapszisokban vajon megtalálhatóak-e az endokannabinoid szignálrendszer elemei, amelyek molekuláris platformot jelenthetnek endokannabinoid-LTD jelenségéhez a GABAerg interneuronok afferens glutamáterg szinapszisaiban?

Vizsgálataink során a következő specifikus kérdésekre kerestük a választ:

5. A hippocampusz GABAerg gátlósejtjeiben a DGL- α -t kódoló gén be van-e kapcsolva avagy ezek az interneuronok termelik-e a DGL- α mRNS-t?
6. A parvalbumint és szomatosztatint tartalmazó interneurontípusokban megfigyelhető-e a DGL- α enzimfehérje jelenléte?
7. A fent említett neurokémiai markerekkel jelölhető interneurontípusokban milyen a DGL- α enzim szubcelluláris lokalizációja?

A ventrális tegmentális área (VTA) az agyi jutalmazó- és motivációs rendszerek egyik központi területe és közismert, hogy a VTA dopaminerg neuronjainak fokozott működése fontos szerepet játszik a különböző függőségek kialakulásában. A kannabisz önmagában is függőséget okoz és az endokannabinoid rendszer szükséges a függőséget okozó drogok addikciót kiváltó hatásához. Ezért kutatómunkám során harmadik fő célul tűztük ki, hogy:

- III. Felderítsük az endokannabinoid jelpálya molekuláris és anatómiai szerveződését a VTA területén és teszteljük a hipotézis, hogy a szinaptikus 2-AG jelpálya hippocampuszban feltárt szerkezete általánosan kiterjeszthető a központi idegrendszer más agyterületeire is

Vizsgálataink során az alábbi specifikus kérdésekre kerestük a választ:

8. Termelik-e a VTA területén található neuronok a DGL- α gén mRNS-ét?
9. Megtalálható-e a dopaminerg sejtekben a 2-AG-t termelő DGL- α enzimfehérje?
10. Milyen a DGL- α enzim pontos szubcelluláris lokalizációs eloszlási mintázata különös tekintettel a dopamintermelő sejtekre?
11. Megtalálható-e a CB₁ kannabinoid receptor is a VTA területén?
12. Milyen a CB₁ receptor szubcelluláris eloszlása a VTA különböző típusú GABAerg és glutamáterg szinapszisaiban?
13. A DGL- α enzim és a CB₁ receptor kolokalizál-e a szinapszisokban?

Módszerek

A doktori disszertációban bemutatott kísérleteinket az MTA KOKI Állatkísérleti Etikai Bizottsága és a Budapest Fővárosi Állat-és Élelmiszerügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás állatkísérleti engedélyével az „Állatok védelméről és kíméletéről” szóló 1998. évi XXVIII. törvény (243/1998) 32.§ alapján végeztük. A kísérleteket a 3R (replacement, reduction, refinement) alapelvek szellemében terveztük.

1. Szövetelőkészítés anatómiai kísérletekhez

Kísérleteinket vad típusú C57BL/6H, C57BL/6J valamint CD1 vad típusú és CBl génkiütött (KO, Ledent et al. 1999) egereken végeztük. Az állatokat az in situ hibridizációs és immunhisztokémiai anatómiai vizsgálatokhoz pentobarbitalt tartalmazó Equithesin keverékaltató intraperitoneális beadásával altattuk, perfundáltuk, majd a fixált szövetekből készített 40 illetve 50 µm vastagságú metszeteket használtuk. Az in situ hibridizációra szánt metszetek esetében dietil-pirokarbonáttal (DEPC-cel) kezelt puffert használtunk és a metszés RNáz mentes körülmények között történt.

2. Szövetelőkészítés molekuláris biológiai kísérletekhez

Az in situ hibridizációhoz szükséges riboprobákat egér (C56BL/6H) hippokampális kéregből készített teljes cDNS mintákból nyertük. Az izofluránnal altatott állatokat dekapitáltuk, majd a megfelelő agyterület szárazjég feletti gyors izolálását követően a fixálatlan szövetekből jégen történő ultrahangos homogenizálás után teljes RNS mintákat izoláltunk, majd ezekből teljes cDNS mintákat írtunk át.

3. In situ hibridizáció

Az in situ hibridizációs próbák előállítása a következő módon történt. A DGL- α enzim kódoló régiója alapján a két, egymással nem átfedő szekvenciájú DNS szakasz átírása teljes cDNS mintából csupaszvégű terméket előállító Pfu enzimmal végzett PCR-segítségével történt, amelyhez a próbákat a Primer3 szoftverrel terveztük meg (Rozen and Skaletsky, 2000). A kapott ampikonok a pBluescript II SK⁻ vector SmaI helyére lettek beillesztve. Ezután a kapott plazmidokat baktériumokba transzformáltuk és a megfelelő szelektív, amplifikációs és szekvenálási lépések után kinyertük a nekünk kellő szekvenciát tartalmazó plazmidokat. A megfelelő restrikciós endonukleázzal

linearizáltuk a plazmidot, majd a hibridizációs próbát RNS polimerázokkal (T3 és T7) in vitro transzkripcióval írtuk át az adott cDNS szakaszról. Az in situ hibridizációs kísérletekben a DGL-alfa kódoló szekvenciája ellen készített ribopróbákat digoxigeninnel jelöltük. Az in situ hibridizációhoz felhasznált metszetek vastagsága 40 μm volt. A szabadon úszó metszeteket először DEPC-es PB-vel (pH=7,4) alaposan átmostuk. Az interneuronokban található alacsony mennyiségű DGL- α enzim kimutatásának érdekében a metszeteket posztfixáltuk 4 órán keresztül, DEPC-es vízzel készült 4% PFA-t (paraformaldehidet) tartalmazó PB pufferben. A metszeteket ezután 3 x 20 percig mostuk a penetráció elősegítését szolgáló 0,1 %-os Tween-20-t tartalmazó foszfát pufferben (PBT) (pH=7,4), majd következett a hibridizációs lépés. A ribopróbákat tartalmazó hibridizációs oldatban az agymetszeteket állandó hőmérsékletet és keverést biztosító hibridizációs szövetkamrában inkubáltuk egy éjszakán át 65°C-on. Azonban ahhoz, hogy a hippocampus interneuronjaiban is ki tudjuk mutatni az alacsonyabb mennyiségű DGL- α enzim jelenlétét, optimalizációs kísérletek után kiderült, hogy a ribopróba hibridizációt alacsonyabb hőmérsékleten (60°C-on) és hosszabb inkubációs idővel (24 óra) szükséges elvégezni. A hibridizációs lépés után a nem-specifikusan kötődött ribopróbákat lemostuk. Az alkalikus-foszfátáz enzimmal konjugált kecske anti-digoxigenin Fab fragment antitestet TBSTN-ben oldottuk fel, majd ebben az oldatban inkubáltuk a metszeteket egy éjszakán át 4°C-on. Másnap az inkubációt követő TBST mosási lépés után a reakciót 5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfát (BCIP) és nitrokék-tetrazóniumklorid (NBT) kromogének elegyével hívtuk elő. A hívási lépés átlagosan 4-6 órát vett igénybe, az interneuronok esetében pedig legalább 12 órát. A reakció leállítása és alapos 0,1 M-os (pH=7,4) PB-vel történt mosás után a metszeteket tárgylemezre helyeztük és a kombinált in situ hibridizációs-immunhisztokémiai kísérletek kivételével minden további esetben Vectashield fedőanyagba beágyazva fedőlemezzel fedtük le. A kombinált festési eljárás esetében a nem-vizes bázisú Vectamount fedőanyagot használtunk az immunfestéshez használt színes csapadékok kimosódásának elkerülésére. Az elkészült in situ hibridizációs reakciók kiértékelését ZEISS Axioplan 2 mikroszkóppal végeztük, a hippocampus és a VTA metszetekről Olympus DP70 digitális kamerával készítettünk fénymikroszkópos képeket.

4. Immunhisztokémia

Immunhisztokémiai kísérleteinkben 50 µm vastag előagyi metszeteket használtunk. Az antitestek penetrációjának esélyét tömény szacharóz oldatban (30%) való mosás, majd négyszer ismételt folyékony nitrogén feletti gyorsfagyasztás és gyors felolvasztás változtatott lépéseivel növeltük meg, amely olyan apró töréseket eredményez a plazmamembránban, amelyek elegendően nagyok ahhoz, hogy az antitestek IgG molekulái átférjenek rajta, de a kémiai detergensnek használatához képest jobb ultrastruktúrális megőrzöttséget eredményez.

Immunhisztokémiai kísérleteinket három alapvető módszerrel: egyszeres peroxidáz alapú immunjelöléssel, egyszeres immunarany jelöléssel, illetve kombinált, kétszeres peroxidáz-immunarany jelöléssel végeztük az adott célfehérjével kapcsolatos anatómiai kérdéseink függvényében. A peroxidáz enzim alapú immunjelölés esetében először blokkoltuk az endogén szöveti peroxidáz aktivitást a metszetekhez adott 1%-os H₂O₂ oldattal 10 percig. A metszeteket 5%-os normál kecske szérummal (NGS) blokkoltuk 1 órán keresztül, majd a megfelelő elsődleges antitestekkel inkubáltuk 4°C-on 48 órán keresztül. Az antitestek specifikusságára az immunjelölés hiányából lehet következtetni a CB₁ KO egerek hippocampusában, DGL-α antitestek esetében a két független epitóp ellen termeltetett antitest teljesen ugyanazt az immunjelölési mintázatot adta. Az elsődleges antitesttel való inkubáció és az alapos mosások utáni következő lépésben másodlagos ellenanyagokkal inkubáltuk a metszeteket. Az immunfestés céljától és előhívási módjától függően biotinilált szekundereket (Vector Laboratories, Burlingame, USA) vagy arany-konjugált szekundereket használtunk (Aurion, Wageningen, Hollandia). A kombinált immunarany-immunperoxidáz reakciónál pedig a két különböző fajban készült primer antitesteket egyszerre inkubáltuk a metszeten, majd a másodlagos antitestektől kezdve szétváltak a két reakció lépései, előbb az immunarany eljárás következett, majd alapos mosási lépések után az immunperoxidáz immunfestést hívtuk elő.

5. Elektronmikroszkópia

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokra szánt immunperoxidáz és immunarany eljárással készített hippocampus és VTA metszeteket felszálló alkoholsorban történő dehidráció után epoxi műgyantába (Durcupan, ACM, Fluka, Svájc) ágyasztuk be. Beágyazás után

fénymikroszkópban kiválasztottuk az elektronmikroszkóppal később általunk vizsgálni kívánt célterületeket és azokat egy ultramikrotómos metszésre optimalizált alakú Durcupan-blokkba átágyasztuk. Az átágyazott metszetekből Leica Reichert ultramikrotómmal 60 nm vékony sorozatmetszeteket készítettünk. Az elektronmikroszkópos analízisre alkalmas ultravékony metszeteinket Formvar hártával borított rézgridekre vettük fel, ólom-citráttal kontrasztoltuk és végül a mintákat egy Hitachi 7100 elektronmikroszkópban (Tokyo, Japan) kielemeztük.

6. DGL- α enzim eloszlásának kvantitatív analízise

Ahhoz, hogy megállapítsuk a DGL- α enzim szinapszisokhoz viszonyított sejten belüli elhelyezkedését a piramissejtek tuskéiben, mennyiségi analízist végeztünk három állatból származó, összesen 300 immunarany-jelölt dendrittüske vizsgálata alapján a hippocampus CA1 régiójának stratum radiatum rétegében. Először lemértük a dendrittüskékben található és a DGL- α enzim pozícióját jelző aranszemcsék távolságát az adott tuskére érkező serkentő szinapszis posztszinaptikus denzitásának széléhez viszonyítva. Az ezüst-intenzifikált aranszemcsék mérete változó, ezért a szemcse közepének a távolságát a szinapszis szélétől (0. pozíció) mértük a plazmamembrán mentén haladva, majd a kapott távolságtérteket 60 nm-es egységekre bontva ábrázoltuk. A három állatból származó mintákból mért adatokat Kruskal-Wallis nem-parametrikus statisztikai eljárással hasonlítottuk össze és az adatokat a tapasztalati szórással (standard deviation, SD) együtt ábrázoltuk. Mivel a három állatból származó minták szignifikánsan nem különböztek egymástól, ezért az adatokat összevontuk és úgy ábrázoltuk, hogy az adott egységben levő aranszemcsék százalékát az összes aranszemcséhez viszonyítottuk. Ahhoz, hogy megállapítsuk a DGL- α enzim szinapszishoz viszonyított sejten belüli elhelyezkedését a GABAerg interneuronokban a tuskétlen dendritágakra, illetve a hosszúkás filopodiális tuskékre érkező aszimmetrikus szinapszisok esetében mennyiségi analízist végeztünk a kettős jelölt metszeten a fent leírt módon. Az immunarany jelet a parvalbumin-tartalmú interneuronok esetében a CA1 régió stratum radiatum rétegében, az mGluR1a-tartalmú interneuronok esetében pedig a CA1 régió stratum oriens rétegében kerestük. Az analízishez az elektronmikroszkópos felvételek 50,000 X-es nagyításban készültek. A távolságmérések elemzésére az Analysis és Statistica szoftvereket használtuk (Olympus, Tokyo, Japán).

Eredmények

1. Az endokannabinoid rendszer vizsgálata a hippocampusz serkentő sejtjeiben

Az idegrendszerben a 2-AG a legnagyobb mennyiségben előforduló endokannabinoid. A kutatási programunk kezdetekor a sok potenciális jelölt között a DGL- α szerin-hidroláz is felmerült, mint az egyik lehetséges 2-AG szintetizáló enzim (Bisogno et al., 2003). Ezért első lépésként kíváncsiak voltunk, hogy vajon a DGL- α enzimet kódoló *dagla* gén az idegrendszerben milyen sejtokban van bekapcsolva. A DGL- α expressziójának megállapítására szabadon úszó hippocampusz metszeteken in situ hibridizációs technikát alkalmaztunk. A legerősebb DGL- α expresszió a hippocampuszban volt megfigyelhető. A piramis sejtek sejttestjei a CA1 és CA3 régióban mindig erőteljesebb színreakciót mutattak a gyrus dentatus szemcsesejtjeinél. A hilusban is megfigyelhető volt néhány gyengébben jelölt sejt, amelyek feltételezéseink szerint mohasejtek lehetnek, mivel a GABAerg interneuronok és a gliasejtek más rétegekben és régiókban ebben az első kísérletben nem bizonyultak DGL- α pozitívnak. Itt kell azonban megjegyezni azt, hogy az in situ hibridizációs jel erősségét nagyon sokféle tényező befolyásolja például a hibridizációs hőmérséklet, illetve a hibridizáció időtartama. A kísérletek során úgy választottuk meg a fent említett paramétereket, hogy a háttérjelölődés mértéke minél kisebb legyen, ami viszont lecsökkentette a jelölés érzékenységét.

A következő kísérletekben célul tűztük ki, hogy feltárjuk a DGL- α enzimfehérje pontos szubcelluláris eloszlását a hippocampusz principális sejtjeiben. Mivel ekkor még nem állt rendelkezésre DGL- α knockout egér az immunfestések validálására, ezért két, független epitópok ellen termeltetett antitesttel (ab-INT és ab-L26) végeztük az immunfestést, az immunreakciót pedig DAB csapadékkal tettük láthatóvá. A két antitesttel kapott immunjelölés mintázata nagyon hasonló volt és kis nagyításon a hippocampusz rétegzett szerkezetének megfelelő mintázatot adott. Ez a mintázat tükrözi a glutamáterg rostok eloszlását és összhangban van az in situ hibridizációs eredményekkel. Nagyobb nagyításban a DGL- α -immunreaktivitást jól láthatóan a dendritek közötti neuropilben, mint jellegzetes szemcsés immunjelet lehetett megfigyelni. Ez a különleges kompartmentalizált immunfestési mintázat, amely makroszkóposan követte a glutamáterg pályák lefutását arra utalt, hogy a DGL- α feltehetően szelektíven koncentrálódik a serkentő szinapszisok környékén. Mivel a

kísérletek idején már ismert volt, hogy a DGL- α a 2-AG endokannabinoidot szintetizálhatja, ugyanakkor vita volt arról, hogy az endokannabinoidok közvetlen retrográd szinaptikus hírvivők vagy pedig közvetett módon az idegvégződésekben autokrin módon szabályozzák a neurotranszmitter felszabadulást, ezért következő célunk az volt, hogy megállapítsuk a DGL- α pontos sejten belüli lokalizációját elektronmikroszkópos analízis segítségével. A DGL- α pozícióját jelző DAB csapadék kizárólag a principális sejtek dendrittüskéiben volt megtalálható a hippocampusz CA1 stratum oriens rétegéből vett mintákban. A DGL- α enzimet tartalmazó tüskéken DGL- α immunnegatív aszimmetrikus szinapszist formáló axonterminálisok végződtek. Ez a megfigyelés arra utalt, hogy a DGL- α lehet a szinaptikus endokannabinoid kiindulási pontja és az általa termelt 2-AG retrográd úton éri el a preszinaptikus CB₁ receptorokat.

A dendrittüskék kis méretük ellenére meglepően összetett szerkezetűek. A tüskefejen belül a mikrodomének különböznek molekuláris felépítésükben és funkcionális jelentőségükben például a szinaptikus átvitelben és plaszticitásban játszott szerepükben (összefoglalásként lásd Rác és Weinberg, 2013). Annak megállapítására, hogy az enzim az adott dendrittüskén belül pontosan hol helyezkedik el, beágyazás előtti immunarany technikát alkalmaztunk. Az arany szemcsék a tüskefejen mindig belülről kapcsolódtak a plazmamembránhoz összhangban azzal, hogy a DGL- α enzim egy transzmembrán fehérje és C-terminális része, amelyen az antitestek epitópjai találhatóak mindig intracellulárisan, a plazmamembránon belül helyezkedik el. A DGL- α enzim szubcelluláris elhelyezkedésének kvantitatív jellemzésére megmértük a dendrittüskékben található arany szemcsék távolságát az adott tüskére érkező serkentő szinapszistól, pontosabban a posztzinaptikus denzitás szélétől a CA1 stratum radiatum területéről véletlenszerűen választott mintákban. Az arany szemcsék legnagyobb sűrűségben a szinapszis szélétől számított első 60 nm-es egységben voltak megtalálhatóak, mennyiségük a szinapszis szélétől távolodva egyre fokozatosan csökkent. Ez a periszinaptikus eloszlási mintázat tökéletesen megegyezik az mGluR₅ szubcelluláris eloszlási mintázatával (Lujan et al. 1996, 1997), és arra utal, hogy a retrográd szinaptikus endokannabinoid jelpálya megindításáért felelős, a 2-AG szintézisében kulcsszerepet játszó molekuláris alkotóelemek a szinapszis körül lévő periszinaptikus gyűrűben fordulnak elő egy makromolekuláris komplex részeként.

Mivel a 2-AG legfőbb szintetizáló enzime a DGL- α , ezért logikus volt azt feltételezni, hogy az enzimet tartalmazó dendrittüskékre érkező serkentő szinapszisokban vagy ezek környékén megtalálható a CB₁ receptor is, mint a 2-AG fő receptora. Ezért a következő kísérleteinkben egy új poliklonális antitestet teszteltünk, amely alkalmas az alacsonyabb kópiaszámban előforduló CB₁ receptorok felismerésére (Fukudome et al., 2004). Első lépésben CB₁ KO egereken teszteltük az új antitest specificitását. A CB₁ pontos lokalizációjának megállapítására immunfestést végeztünk és az immunreakciót DAB csapadékkal tettük láthatóvá. Vad típusú egerekben egy karakterisztikus festési mintázatot tapasztaltunk, amelynek az eloszlása jól követte a serkentő pályák térbeli elrendeződését. A KO állatban hiányzott ez a rétegzett CB₁-immunreaktivitási mintázat, ami alátámasztja a CB₁ antitest specificitását. A legerősebb jelölés a gyrus dentatus belső molekuláris rétegében volt látható. Szintén erős CB₁-immunreaktivitást tapasztaltunk a hippocampusz CA1 és CA3 régiójának stratum radiatum és stratum oriens rétegeiben, ahol a nagy GABAerg rostok mellett a neuropilben sűrű szemcsés mintázat volt megfigyelhető. A serkentő pályák lefutását követő fénymikroszkópos mintázat felvetette a lehetőségét, hogy a CB₁ receptorok a glutamáterg idegvégződéseken is jelen vannak, ezért a hippocampuszmintákon elektromikroszkópos vizsgálatot is végeztünk. A gyrus dentatus molekuláris rétegének belső harmadából származó mintákon jól látható volt az aszimmetrikus szinapszist képző axonterminálisokban nagy mennyiségben felhalmozódó DAB csapadék. A CA3 és CA1 régiókban is sok glutamáterg és GABAerg idegvégződésen találtunk preszinaptikus CB₁ receptorokat.

2.. Az endokannabinoid rendszer vizsgálata a hippocampusz GABAerg sejtjeiben

Az előző fejezetben bemutatott kísérletekben az in situ hibridizációs kísérleteinkben nem tapasztaltunk olyan jelölési mintázatot, amely a DGL- α jelenlétére utalt volna hippocampális GABAerg interneuronokban. Ugyanakkor tisztában voltunk vele, hogy az mRNA jel hiánya a gátlósejtben a detekciós érzékenységünk limitációját is jelentheti és nem lehet kizárni, hogy a DGL- α enzim alacsonyabb mennyiségben ugyan, de az interneuronokban is megtalálható. Ez két szempontból lényeges kérdés. Egyrészt fontos tisztázni, hogy vajon a 2-AG jelpálya szelektíven a hippocampális neuronhálózatoknak csak bizonyos celluláris elemeiben játszik-e szerepet a szinaptikus plaszticitásban vagy pedig az általunk leírt molekuláris szerveződés egy általános tulajdonsága a glutamáterg szinapszisoknak? Másrészt az alacsonyabb mRNA szint utalhat arra is, hogy a

neuronhálózatok sejt típus-specifikus módon optimalizálják a 2-AG jelpálya indukciós küszöbét és hatékonyságát a jelmolekulák mennyiségének szabályozásával. Számos kísérleti paraméter, például a hibridizációs lépés hőmérsékletének csökkentése, az időtartamának növelése, az alkalmazott ribopróbák koncentrációjának emelése, a mosási lépések rövidítése és a színreakció idejének elnyújtása jelentősen javíthatja a *in situ* hibridizációs jelölés érzékenységét. Ezeknek a paramétereknek a megváltoztatásával sikerült kimutatnunk, hogy a hippokampuszban a GABAerg interneuronok is termelnek alacsony mennyiségben DGL- α enzimet. A reakciókörülmények specifikusságát tesztelő ellenőrző kísérletekben a negatív kontroll próbával nem tapasztaltunk háttérjelölődést.

A következő kísérletekben az *in situ* hibridizációs technikát immunfestéssel kombináltuk, ami egyben lehetőséget adott arra is, hogy néhány sejtet beazonosítsunk, hogy milyen interneuron típusba tartoznak. A GABAerg interneuronoknak sokféle típusa van, mi két interneuron populációt választottunk ki a további vizsgálatokhoz. Az egyik interneuron típust azért vizsgáltuk, mert nincsenek dendrittüskéi, de ennek ellenére mégis ennek a sejt típusnak a dendritfájára érzékeny a hippokampusz interneuronjai közül az egyik legtöbb serkentő bemenet (Gulyás et al., 1999). Ezeknek az interneuronoknak a neurokémiai markere a parvalbumin. A másik kiválasztott populáció is nagy mennyiségű serkentő szinapszist kap, ráadásul ezek a bemenetek a sejtek dendritjeiből kinyúló tüskeszerű nyúlványaira érzékenyek. Ez a tüskés sejt populáció nagy mennyiségben termel szomatosztatint (Maccaferri et al. 2000; Klausberger és Somogyi, 2008). Figyelemre méltó módon a hippokampusz teljes területén magas volt a DGL- α -t tartalmazó interneuronok aránya. Két állatban a CA1 régió területén vizsgált 58 parvalbumin-pozitív sejttest minden esetben expresszált DGL- α mRNS-t. A vizsgált 59 szomatosztatinnal immunreaktív interneuronból pedig 58 esetben érte el DGL- α expresszióját igazoló *in situ* hibridizációs jelölés a detekciós küszöböt.

Annak érdekében, hogy megállapíthassuk a DGL- α enzimfehérje jelenlétét és pontos szubcelluláris lokalizációját az adott interneuron típusokban, kettős immunjelölést alkalmaztunk. Mivel a szomatosztatinnal csak a sejttesteket és az axonfelhőt jelöli, ezért helyette egy másik markert, a szomatodendritikusan előforduló az mGluR_{1a}-t választottuk. Mindkét interneuron típus esetében jól látható volt, hogy a DGL- α enzim helyét jelölő aranyszemcse az interneuronokban is általában periszinaptikusan

helyezkedett el. Az elektronenz DAB csapadék igazolta, hogy a vizsgált dendritek a CA1 régió stratum radiatum rétegében a parvalbumin-pozitív interneuronokhoz tartoztak. Az mGluR_{1a}-pozitív, sok tüskével rendelkező dendritek pedig a CA1 régió oriens rétegében voltak nagy számban megfigyelhetőek. Az arany szemcsék az interneurokra érkező afferens szinapszisokban is leggyakrabban a szinapszis szélétől számított 60 nm-es membránszakaszon koncentráálódtak és az arany szemcsék sűrűsége a szinapszis szélétől távolodva egyre csökkent mindkét interneuron típus esetében.

3. Az endokannabinoid rendszer a ventral tegmental área (VTA) szinapszisaiban

A következő kísérletekben arra voltunk kíváncsiak, hogy a VTA-ban, ahol a függőségben is kulcsszerepet játszó dopaminerg sejtek nagy része található, vajon milyen a 2-AG-t szintetizáló DGL- α enzim előfordulási mintázata. Másodsorban azt is szeretnénk volna felderíteni, hogy vajon a hippocampus területén megfigyelt szerveződési alapelvek kiterjeszhetőek-e egy másik agyterületre is. Az in situ hibridizációs kísérlet viszonylag gyengébb erősségű, de a középagyból készült metszeteken nagy területre kiterjedő jelölést eredményezett. Jól láthatóan azokon a területeken volt legsűrűbb a jelölés (VTA, substantia nigra pars compacta), ahol a dopaminerg sejtek sejtestjei legnagyobb sűrűségben találhatóak meg. Annak érdekében, hogy megállapítsuk a VTA területén a DGL- α pontos celluláris és szubcelluláris elhelyezkedését immunhisztokémiai festéseket végeztünk. Az immunreakciókat DAB csapadékkal tettük láthatóvá. A hippocampusban megfigyelt mintázathoz hasonlóan a DGL- α enzim esetében mindkét antitesttel végzett immunfestés itt is sűrű szemcsés immunjelölést eredményezett, ezért feltételeztük, hogy a VTA-ban is kompartmentalizált a DGL- α szubcelluláris eloszlása. Érdekes módon a DGL- α membránkötöttségével összhangban még a DAB csapadék is (ami pedig könnyen diffundál) a sejtmembrán közelében és a szimmetrikus, illetve aszimmetrikus szinapszisok szomszédságában volt megtalálható. A mintákat immunarany módszerrel is megvizsgáltuk. Az arany szemcsék a plazmamembrán belső felszínén helyezkedtek el, az epitóp jóvolt helyzetével összhangban. Morfológiai bélyegek alapján feltételezhető, hogy azok a szinapszisok, amelyek közelében posztszinaptikus DGL- α enzimet figyeltünk meg elsősorban a VTA kérgi és kéreg alatti glutamaterg serkentő afferensei formálják (Sesack and Pickel, 1992; Carr and Sesack, 2000; Omelchenko and Sesack, 2007); illetve a nucleus accumbensben található enkefalin- és dinorfin tartalmú GABAerg medium spiny neuronok axonvégződéseitől származnak (Pickel et al., 1993, Sesack and Pickel, 1992,

1995). Egyes idegvégződés pedig valószínűleg a lokális GABA-pozitív interneuronokhoz tartoznak (Bayer and Pickel, 1991).

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy a VTA dopaminerg sejtjei termelik-e a DGL- α enzimfehérjét, kettős immunfestést alkalmaztunk. A DGL- α enzimet immunarany technikával, míg a VTA-ban található dopaminerg sejtekre jellemző tirozinhidroxiláz (TH) jelenlétét immunperoxidáz (DAB) technikával tettük láthatóvá. Az enzim a feltételezett GABAerg, illetve glutamaterg szinapszisok közelében egyaránt megtalálható volt, bár a diffúzibilis DAB csapadék sokszor megnehezítette a szinapszisok pontos behatárolását. A mintáinkban gyakran előfordultak TH-immunnegatív, de DGL- α pozitív sejtek is.

A posztzinaptikus DGL- α enzim és az előzetes kutatások alapján felmerült a kérdés, hogy a CB₁ kannabinoid receptor vajon megtalálható-e preszinaptikusan a glutamaterg, illetve a GABAerg szinapszisokban a VTA-ban. A korábbi anatómiai kutatások azt mutatták, hogy a CB₁ receptor nagyon kis mennyiségben fordul elő a VTA-ban (Herkenham et al. 1991b; Mailloux and Vanderhaeghen, 1992; Tsou et al., 1998). Ezért ennek a kérdésnek a megválaszolására a nagy érzékenyséű CB₁ antitestet használtuk (Fukudome et al., 2004). Ez az antitest a vad típusú állatokban sűrű neuropil jelölést adott, ami a CB₁-génkiütött állatokból származó középagyi mintákban teljesen hiányzott. Ahhoz, hogy megállapítsuk a CB₁ receptorok sejten belüli lokalizációját, az immunfestések után elektronmikroszkópos analízist végeztünk az adott VTA mintákon. A CB₁-immunjel az axonterminálisokra korlátozódott és az immunarany jelölés azt is megmutatta, hogy a receptor az idegvégződés plazmamembránjához kötötten helyezkedik el nagyrészt extraszinaptikus pozícióban. A homoszinaptikus depresszióhoz szükséges molekuláris alkotóelemek jelenlétének bizonyítására DGL- α és CB₁ kettős festést végeztünk a VTA-t tartalmazó középagy metszeteken. A festések igazolták, hogy a CB₁-pozitív axonterminálisokkal szemben, mind a szimmetrikus, mind az aszimmetrikus szinapszisok esetében megtalálható a DGL- α enzim. Ez a molekuláris szerveződés közvetlen bizonyítékot jelent a retrográd 2-AG endokannabinoid jelpálya jelenlétére és a hippokampuszban talált eredményeinkkel összhangban arra utal, hogy ez a jelpálya általános alkotóeleme lehet a központi idegrendszer sok szinapszistípusának.

Következtetések

Munkám során a központi idegrendszer két különböző területén, a hippocampusban és a VTA-ban vizsgáltuk a 2-AG közvetítette endokannabinoid szignálrendszer két elemének eloszlását. A vizsgált szinapszisokban az egyik elem, a 2-AG előállításáért felelős enzim a DGL- α mindig poszt-szinaptikusan a szinapszisok szélén helyezkedik el. A 2-AG jelfogó receptora a CB₁ pedig a szinapszis másik oldalán, a preszinaptikus idegsejt idegvégződésén. Mivel az összes általunk vizsgált szinapszistípusban és agyterületen ezt az elhelyezkedést találtuk, ez egyrészt utal arra, hogy az általunk vizsgált rendszer alkotóinak szubcelluláris eloszlása egy általános érvényű törvényszerűséget követ, illetve alátámasztja a korábbi élettani megfigyeléseket, amelyek szerint a 2-AG egy retrográd jelátviteli molekula.

Az endokannabinoid rendszernek a szinaptikus plaszticitási folyamatokban kiemelkedő szerepe van. A hippocampusban végzett vizsgálataink során arra is fény derült, hogy mind az interneuronokra, mind pedig a principális sejtekre érkező serkentő szinapszisokban megtalálható az endokannabinoid szignálrendszer és ezen szinapszisokban indukálható az endokannabinoid-függő LTD. Az LTD kiváltásához sejttípus-specifikus indukció szükséges, ami abban nyilvánul meg, hogy a serkentő szinapszisokban kisebb indukció kell az adott gátlás kiváltásához. Ennek olyan élettani vagy kórélettani folyamatokban lehet szerepe neuronhálózati szinten, amikor bizonyos körülmények között kialakuló túlzott serkentés hatására endokannabinoidok szabadulnak fel és ezek a serkentő sejtek szinapszisainak a működését lecsendesítik, miközben a gátló sejtek szinapszisaik még tovább működhetnek segítve ezzel az esetleges patológiás állapot elkerülését.

A VTA az agyi belső jutalmazórendszer központja, a dopamintermelő sejtek nagy része itt található. A kábítószer egyik legfontosabb hatása, hogy a dopamin felszabadulást fokozzák. Ezt az is bizonyítja, hogy a dopaminerg rendszer blokkolásával kivédhető a legtöbb anyag jutalmazó hatása. Az addikció tulajdonképpen egy kóros tanulási forma. A mi eredményeink azt mutatták, hogy többféle típusú, helyi vagy külső forrásból származó GABAerg, illetve helyi glutamaterg a dopaminerg sejtekre érkező szinapszisban megtalálhatóak az endokannabinoid jelpálya elemei, így ez a rendszer fontos szerepet játszhat a dopaminfelszabadulás szabályozásában.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témáját adó saját közlemények:

1. Péterfi Z*, Urbán GM*, Papp OI, Németh B, Monyer H, Szabó G, Erdélyi F, Mackie K, Freund TF, Hájos N, Katona I. (2012) Endocannabinoid-mediated long-term depression of afferent excitatory synapses in hippocampal pyramidal cells and GABAergic interneurons. **Journal of Neuroscience**, 32(41):14448-63.
*=megosztott első szerző
2. Mátyás F, Urbán GM, Watanabe M, Mackie K, Zimmer A, Freund TF, Katona I. (2008) Identification of the sites of 2-arachidonoylglycerol synthesis and action imply retrograde endocannabinoid signaling at both GABAergic and glutamatergic synapses in the ventral tegmental area. **Neuropharmacology**, 54(1):95-107.
3. Katona I, Urbán GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF. (2006) Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. **Journal of Neuroscience**, 26(21):5628-37.

Az értekezés témájától független közlemények:

4. Nyilas R, Dudok B, Urbán GM, Mackie K, Watanabe M, Cravatt BF, Freund TF, Katona I. (2008) Enzymatic machinery for endocannabinoid biosynthesis associated with calcium stores in glutamatergic axon terminals. **Journal of Neuroscience**, 28(5):1058-63.
5. Berghuis P, Rajnicek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urbán GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Cauty A, Irving AJ, Katona I, Yanagawa Y, Rakic P, Lutz B, Mackie K, Harkany T. (2007) Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. **Science**, 316(5828):1212-6.

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőmnek, Freund Tamás professzornak tartozom köszönettel a munkám során nyújtott támogatásért és a rengeteg tanácsért, valamint azért, hogy lehetővé tette, hogy a KOKI-ban dolgozhassak. Másodsorban köszönöm tanítómesteremnek, Katona Istvánnak annak a lehetőségét, hogy a Molekuláris Neurobiológiai Kutatócsoport tagjává válhattam. Rengeteg gyakorlati és elméleti tudást kaptam Tőle és a tudományos munkához való olyan hozzáállást, mely bármilyen kutatási területen hasznomra válhat majd.

Köszönettel tartozom az Agykéreg Kutatócsoport, a Molekuláris Neurobiológiai Kutatócsoport és a Hálózat-idegéletani Kutatócsoport valamennyi munkatársainak a hasznos tanácsokért és a közös tanulmányainkban az értékes együttműködésért.

Köszönöm a Molekuláris neurobiológiai Kutatócsoport tagjainak, kiemelten Dudok Barnának, Ludányi Anikónak és Nyilas Ritának a sok segítséget és a hatékony munkához szintén nagyon fontos jó hangulatú mindennapokat.

Köszönöm az Agykéreg Kutatócsoport tagjának, Mátyás Ferencnek a közös munkánk során nyújtott segítségét. Szeretnék köszönetet mondani a kutatómunka technikai hátterének biztosításáért és a fontos módszertani alapok türelmes megtanításáért Lengyel Katalinnak. Köszönöm a szintén sok technikai segítséget Goda Gyözőnek és Iványi Katalinnak.

Köszönettel tartozom külföldi kollégáinknak és együttműködő partnereinknek Kwang-Mook Jung-nak, Catherine Ledent-nek, Ken Mackie-nek, Danielle Piomellinek, Andreas Zimmernek, Masahiko Watanabe-nak az antitestek és genetikailag módosított egérvonalak rendelkezésünkre bocsátásáért.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm családomnak a munkában és a dolgozat megírásában nyújtott segítséget és támogatást. Köszönöm férjemnek, aki mindvégig támogatott és hitt bennem és akinek támogatása nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre. Gyermekeimnek, akik drukkoltak és türelmesen túrték, hogy helyettük a dolgozatom megírásával foglalkozzam és a nagymamáknak, akik pedig sokszor erejükön felül dolgoztak azon, hogy a gyerekek ne érezzék annyira édesanyjuk hiányát.