

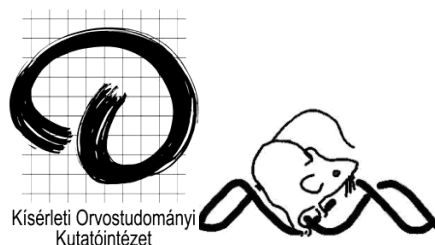
XXXI. OTDK Biológia Szekció

**A GAD67 hiányos PV⁺ idegsejtekkel rendelkező
genetikailag módosított PV/GAD67-egér mint
neurológiai és pszichiátriai betegségmodell**

Készítette: Fülöp Anikó

Biológia Bsc

Témavezető: Dr. Szabó Gábor



ELTE TTK Biológia

MTA-KOKI, Orvosi Géntechnológiai Részleg

2012

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	4
I.1. A GABA jelátvitel.....	4
I.2. A GABA jelátvitel kóros működésével járó idegrendszeri betegségek.....	6
II. Célkitűzések.....	8
III. Anyagok és módszerek	9
III.1. A PV/GAD67- egérmodell előállításához felhasznált egértörzsek	9
III.2. PV/GAD67- egérmodell előállítása a „floxolt” GAD67 és PV-IRES-Cre egértörzsek genetikai keresztezésével.....	10
III.3. DNS izolálása farokszövetből a genotipizáláshoz	11
III.4. A kísérletben használt állatok genotípusának meghatározása	12
III.5. Fagyasztott és úsztatott (floating) metszetek készítése agyszövetből	13
III.6. RNS próba <i>in situ</i> hibridizációhoz	13
III.7. GAD67 <i>in situ</i> hibridizáció agyi metszeteken	14
III.8. GAD67 <i>in situ</i> hibridizációt követő PV immunhisztokémia	14
III.9. A GAD67 és GAD65 génexpresszió vizsgálata QPCR segítségével.....	15
III.10. A GAD67 fehérje expressziós szintjeinek vizsgálata Western blot technika segítségével	16
III.11. A GAD67 hiány következtében megjelent fenotípusok vizsgálata.....	17
III.11.1. Testtömegbeli különbségek meghatározása.....	17
III.11.2. Magatartás tesztek: Motoros és mozgáskoordinációs zavarok felmérése	17
IV. Eredmények és értékelésük.....	18
IV.1. A PV/GAD67- egerek általános jellemzése	18
IV.2. A GAD67 mRNS szintű expresszió változása a PV/GAD67- egrek különböző agyterületeinek PV+ idegsejtjeiben: <i>in situ</i> hibridizációs vizsgálatok	19
Agykéreg	20

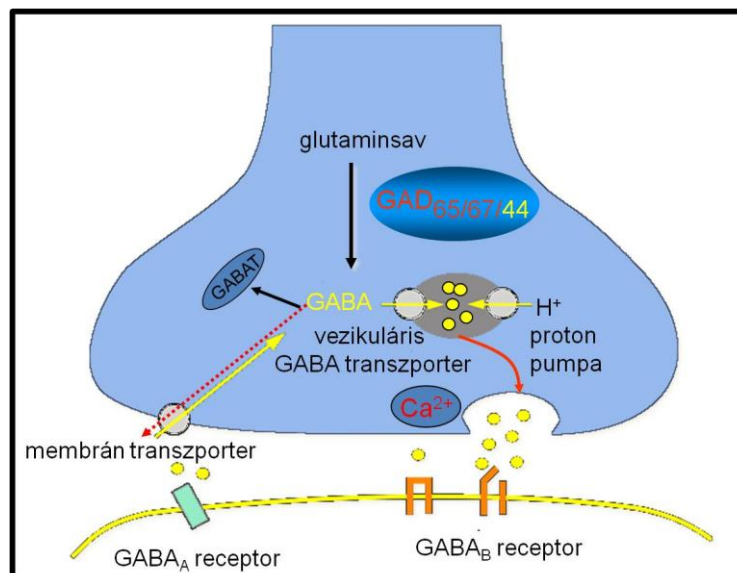
<i>Egyéb agyterületek</i>	<i>22</i>
IV.3. A GAD67 és GAD65 mRNS expresszió QPCR analízise különböző agyterületeken.....	25
IV.4. A GAD67 fehérjeszint vizsgálata Western blot segítségével	26
IV.5. Magatartásteszték: Motoros és mozgáskoordinációs zavarok.....	27
V. Összefoglalás	30
VI. Irodalom.....	32
VII. Köszönetnyilvánítás	34
VIII. Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez	35

I. Bevezetés

I.1. A GABA jelátvitel

Az idegrendszer megfelelő működéséhez alapvetően fontos az idegsejtek közötti kommunikáció fenntartása, amelyben kulcsszerepet töltenek be az ingerületátvivő anyagok (neurotranszmitterek). Az emlős idegrendszer területén a fő gátló neurotranszmitter a gamma-amino-vajsav (GABA), amely az idegsejtek kb. 20-30%-ában található meg (*Mugnaini, 1985*). A GABA elsősorban glutamátból keletkezik, a reakciót a glutaminsav-dekarboxiláz (GAD) enzim 65 és 67 kDA-os formája katalizálja. A két enzimforma jelentős hasonlóságot mutat szekvencia szinten és celluláris eloszlásban, azonban kinetikus tulajdonságaik és szubcelluláris elhelyezkedésük eltérő: az idegvégződésekből elsősorban a fázikus gátlásért felelős GAD65 található meg, míg a GAD67 inkább a citoplazmában fordul elő, és a tónusos gátlás kialakításában van szerepe (*Martin, 1993*). Embriionális korban a GAD67 génről további két forma is képződhet: a 25 kDA illetve a 44 kDA nagyságú GAD fehérje (*Szabó, 1994*). A GAD44 által szintetizált GABA-nak inkább fejlődésszabályozó szerepe lehet.

A GABA a szintézist követően szinaptikus vezikulumokba csomagolódik, ezt követően kalcium-függő exocitózis segítségével felszabadul az idegvégződésekből. Emellett a GABA szekréciónak létezik egy nem-vezikuláris formája is, amely elsősorban a fejlődés idején játszik fontos szerepet. A GABA gátló hatását az ionotróp GABA_A vagy a metabotróp GABA_B receptorokon keresztül fejti ki. Végül a GABA visszavételét az idegvégződésekből és/vagy a szomszédosan elhelyezkedő gliasejtekbe a plazmamembránon elhelyezkedő GABA transzporterek (GAT) segítik (1. ábra).



1. ábra: A GABA jelátvitel vázlatosan.

A GABA nemcsak számos biológiai folyamat során (pl. alvás, cirkadián ritmus, tanulás, szaporodás, kognitív képességek) nélkülözhetetlen, hanem parakrin/autokrin faktorként az idegrendszer fejlődésében (Katarova, 2000, Manent, 2007), illetve számos, nem-idegi sejt működésének szabályozásában (Erdő, 1990) is fontos szerepet játszik. A GABAerg rendszer zavara olyan súlyos idegrendszeri betegségek kialakulásában lehet fontos, mint például az epilepszia, a depresszió, a szorongás, a skizofrénia, vagy a cerebelláris ataxia.

A központi idegrendszerben két fő idegsejtípus fordul elő: a hosszú, messzire nyúló axonnal rendelkező projekciós serkentő neuronok (pl. agykérgi piramissejtek), és a helyi, főleg gátló interneuronok. Utóbbiak axonjai csak adott területen ágaznak el, és a környező idegsejtekkel alakítanak ki szinaptikus kapcsolatokat. Feladatuk a projekciós neuronok ingerelhetőségének szabályozása. Az idegsejtek egymással összekapcsolódva hálózatot alkotnak, melyben az interneuronok és a piramissejtek kölcsönhatásából szinkronizált gamma oszcillációk keletkeznek. A gamma oszcilláció alapvetően fontos különböző kognitív funkciókhoz (pl. szelektív figyelem, munkamemória, érzéki információk feldolgozása), zavara olyan pszichiátriai betegség megjelenéséhez vezethet, mint pl. a skizofrénia.

A GABAerg interneuronok közül a parvalbumin (PV) kalcium-kötő fehérjét tartalmazó gyorstüzelésű neuronok fontos szerepet játszanak a neuronhálózatok szinkronizált működésének szabályozásában, többek között a gamma oszcillációk vezérlésében. A serkentő

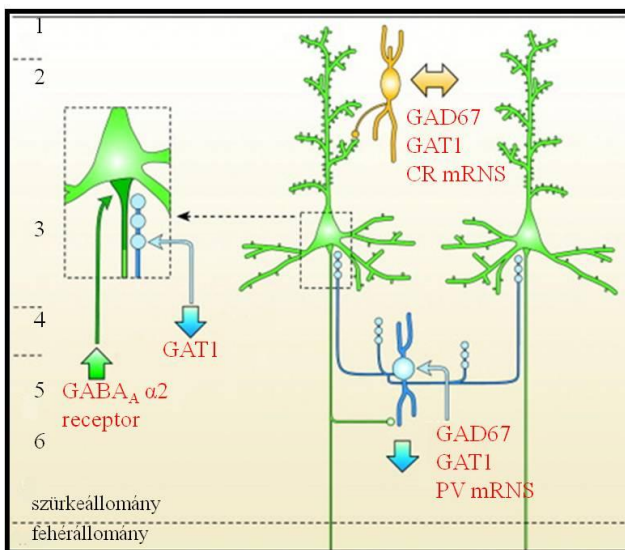
idegsejtekkel (pl. agykérgi piramissejtek) szinaptikus kapcsolatot alakítanak ki, és tüzelésüket, illetve szinkron működésüket szabályozzák. A parvalbumin (PV) fehérje az idegrendszerben a GABAerg interneuronokban, elsősorban a kérgi kosár- és kandeláber sejtekben fordul elő, a kisagyban a molekuláris réteg interneuronjaiban és a Purkinje-sejtekben, míg a hippocampusz területén a gyors tüzelésű interneuronokban mutatható ki. Fő feladata az intracelluláris Ca^{2+} szint szabályozása (Condé, 1994, Schwaller, 2002, Klausberger, 2005).

I.2. A GABA jelátvitel kóros működésével járó idegrendszeri betegségek

Humán posztmortem agyi szövetminták vizsgálatával kimutatták, hogy a **skizofrénia** esetében a legjellemzőbb molekuláris elváltozás a GABA szintetizáló enzim, a glutaminsav

dekarboxiláz 67 KDa formájának (GAD67) csökkent szintje, főleg a dorzo-laterális prefrontális kéreg parvalbumin (PV) tartalmú idegsejtjeiben (Heckers, 2002, Akbaran, 2006, Lewis, 2009).

A GAD67 hiány miatt jelentősen csökkent GABA szint következménye lehet a csökkent gátlás, ami befolyásolhatja az agykérgi neuronális hálózatok szinkronizált működését, és a kórképre jellemző kognitív zavarok kialakulásához is vezethet. A vizsgálatok a GABAerg rendszer egyéb változásait is feltárták, például a GABA-szint kompenzálására csökkent a membrán GABA transzporter GAT-1 expressziója az axon-terminálisokon, míg az alfa2 alegységet tartalmazó GABA_A receptorok



2. ábra: A GABAerg rendszer változásai az agykéregben skizofrénia során. A parvalbumin tartalmú interneuronokban csökken a GAD67 és a GAT1 szintje, míg a piramissejteken az alfa2 alegységekkel rendelkező GABA_A receptorok mennyisége megnő. (Forrás: Lewis, 2005)

mennyisége megnőtt a piramissejteken (2. ábra) (Lewis, 2005).

A skizofrénia a világnépesség 0,5-1%-át érintő súlyos idegrendszeri megbetegedés, melyet a kései serdülőkorban, illetve a felnőttkor kezdetén diagnosztizálnak. A betegséget

kiváltó pontos okok még nem ismertek, de valószínűsítik, hogy kialakulásában környezeti és genetikai tényezők is közrejátszanak. Környezeti hatás lehet például a terhesség első trimeszterében az anyára ható érzelmi és fizikai stressz; a második trimeszterben influenza fertőzés; illetve a terhesség során az anya éhezése; a születés helyén magas népsűrűség; serdülőkorban gyakori cannabis használat; bevándorló státusz. A kutatások azt mutatják, hogy a betegség kialakulásának kockázata magasabb férfiak esetében, és náluk a tünetek korábbi életkorban jelentkeznek először. Annak ellenére, hogy számos gént illetve génegyüttest azonosítottak, amelyek összefüggésben állhatnak a betegség kialakulásával, a pontos genetikai hátteret még nem sikerült felderíteni, egyetlen gén sem hozható közvetlen kapcsolatba a kórképpel. A betegség mind a skizofrén személyre, mind a családra, barátokra, sőt, a társadalomra is hatalmas terhet ró, hiszen a beteg a közösségekbe nehezen illeszkedik be, gyakran nem képes az önfenntartásra, munkavállalásra, és hangulatának, érzelmeinek ingadozása megnehezíti a velük való kapcsolatok kialakítását, fenntartását. Habár egyes antipszichotikus szerek képesek a betegség pozitív tüneteit enyhíteni, a betegség speciális kezelése és gyógyszeres terápiája egyáltalán nem megoldott.

A betegségre jellemző tünetek három csoportra oszthatóak: pozitív és negatív szimptómákra, továbbá kognitív zavarokra. A pozitív vagy pszichotikus tünetek az alábbiak: téveszmék, érzékelési zavarok, hallucinációk (a páciens leginkább hangokat hall, ezeknek a mondanivalója eltér a saját gondolatok tartalmától, vizuális látomások ritkábban jelentkeznek), zavar a gondolatok kialakításában, neologizmus (nyelvújítás), abnormális pszichoszomatikus aktivitás. A negatív tünetek az alábbiakat foglalják magukba: elszigetelődés a családtól, barátoktól, a motivációk hiánya, döntéshozó képesség hiánya, érzelmi zavarok, alógia, örömrészlet képességének csökkenése. A harmadik csoportot a kognitív zavarok alkotják, ide a szeletív figyelem, a munkamemória, a végrehajtási kontroll, az epizódikus memória, a nyelvi felfogás és a szociális, érzelmi folyamatok rendellenes működését soroljuk (Lewis, 2009, Gonzalez-Burgos, 2011).

A **cerebelláris ataxia** a kisagy (cerebellum), illetve a kisagyi pályák károsodása következtében fellépő kór, tünetei a sérülés helyétől és súlyosságától függően többfélék lehetnek: hypotonia (csökkent izomtónus), nystagmus, végtagok remegése (tremor), tántorgó

járás, emellett zavar léphet fel az egyensúly megtartásában, a szem-, fej-, nyak valamint törzs- és végtagok koordinációjában is (*Perlman, 2000, Klivényi, 2004*).

Az **epilepszia** az egyik leggyakoribb idegrendszeri megbetegedés, melyben spontán eszméletvesztéssel, izomfeszüléssel és rángásokkal együtt járó görcsroham lép fel. A görcsrohamot bizonyos neuron csoportok nagy erejű elektromos kisülései okozzák (*Bernard, 2005, Pan, 2008*).

A fent röviden ismertetett idegrendszeri betegségek mindegyikében szerepe lehet a GABAerg rendszer működési zavarának, vagyis a csökkent gátlásnak, bár ennek pontos mechanizmusa nem ismert. Ennek feltárását segítheti olyan egérmodellek előállítása és komplex jellemzése, amelyekben különböző interneuron típusokban célzottan, genetikai módosítással inaktiváljuk a GABA-szintetizáló enzimet, ezáltal jelentősen csökkenjük a GABA szintet, valamint az általa közvetített gátlást.

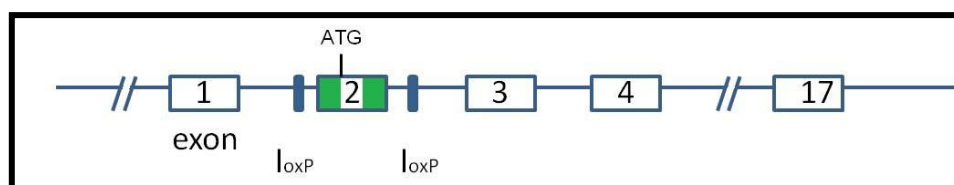
II. Célkitűzések

- (1) Célunk egy olyan genetikailag módosított egérvonal létrehozása volt, amelyben az idegi aktivitás szinkron működésének szabályozásában kitüntetett szerepet játszó idegsejt-típusban, a parvalbumin (PV) tartalmú interneuronokban inaktív a GAD67 fehérje létrehozásáért felelős gad1 gén (**PV/GAD67-**).
- (2) Továbbá jellemezni kívántuk a GAD67 hiány következtében kialakult GAD expressziós és funkcionális változásokat.
 - (a) Ennek keretében *in situ* hibridizációs és immunhisztokémiai módszerekkel kívántuk kimutatni a GAD67 hiányt a különböző agyterületeken.
 - (b) A legnagyobb mértékben érintett agyterületeken a GAD67 és GAD65 RNS- és fehérje-szint változását QPCR analízissel és Western blot technikával terveztük meghatározni.
 - (c) A GAD67 hiány funkcionális következményeit a mutáns egerek általános jellemzésével, viselkedésük megfigyelésével és célzott magatartástesztekkel kívántuk vizsgálni.

Reményeink szerint a **PV/GAD67**- egérmodell tervezett, komplex vizsgálata segíti megérteni azt, hogy mi lehet a szerepe a PV interneuronok által közvetített gátlásnak a különböző agyterületeken, és azok zavara milyen idegrendszeri betegségekkel hozhatóak összefüggésbe.

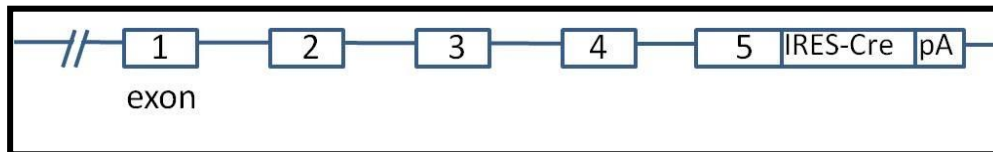
III. Anyagok és módszerek

III.1. A PV/GAD67- egérmodell előállításához felhasznált egértörzsek



3. ábra: A „floxed” GAD67 gén. A 2. exont határoló két intronba két loxP szekvenciát illesztettek be.

A kísérletekben használt egérmodell létrehozásához szükséges „floxed” **GAD67** egereket Richard Palmiter (Howard Hughes Medical Institute and Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle, Washington, USA) készítette és bocsátotta rendelkezésünkre, míg a **PV-IRES-Cre** egereket Silvia Arber (Biozentrum, Department of Cell Biology, University of Basel, Switzerland and Friedrich Miescher Institute, Basel, Switzerland) állította elő, és a Jackson Laboratóriumból szereztük be. A floxed GAD67 egerekben a gad1 gén 2. exonját (ami az első kódoló exon) határoló két intronba „gén-targetinggel” két Cre-rekombináz felismerő loxP szekvenciát építettek be (3. ábra), majd az így létrehozott heterozigóta lox/+ egereket egymással keresztezve megalapították a GAD67-flox/flox egérvonalat. Ez a genetikai módosítás nincs hatással a GAD67 gén funkciójára (Chattopadhyaya, 2007).



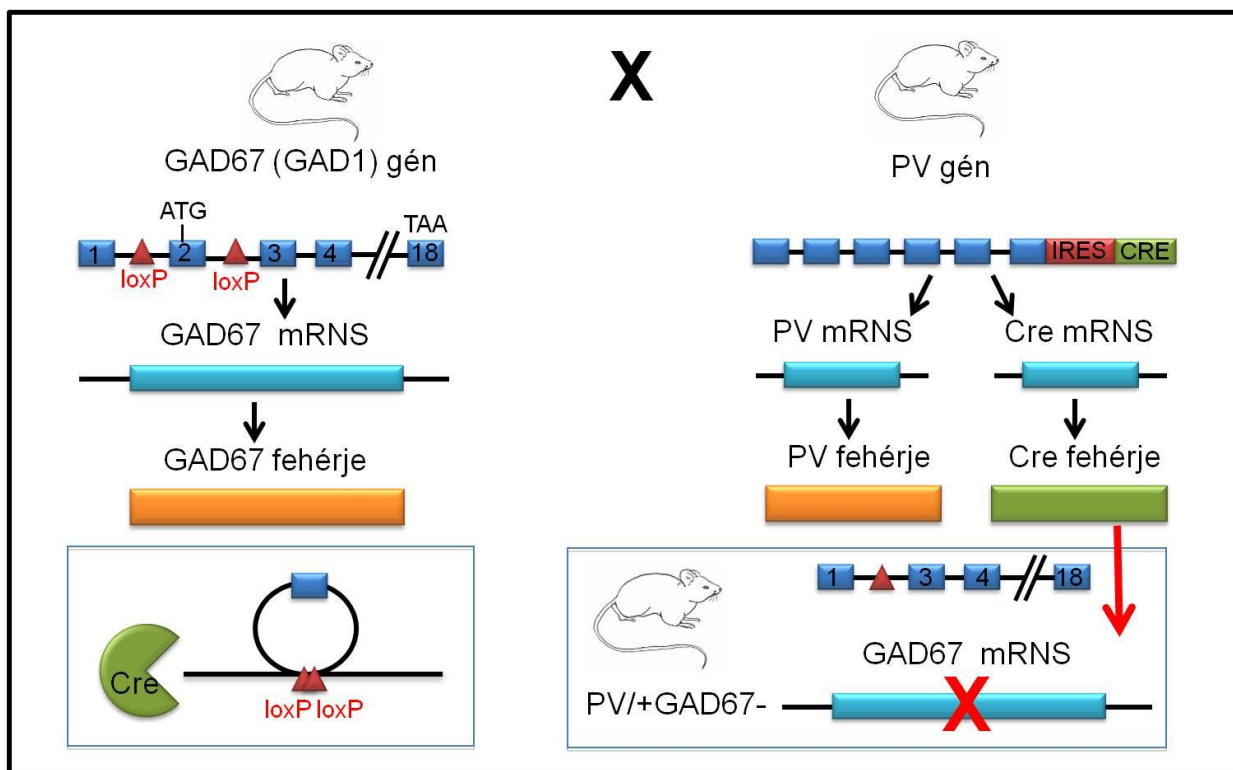
4. ábra: A PV-IRES-Cre konstrukció. A PV gén 5. exon nem transzlálódó régiójába egy IRES-Cre-polyA kazettát klónoztak.

A **PV-IRES-Cre** vonalban a parvalbumin gén 5. exonjának nem transzlálódó régiójába egy IRES-Cre-polyA kazettát klónoztak „knock-in” technológiával (4. ábra), és ebből hozták létre a vonalat. A Cre rekombináza képes két loxP hely között helyspecifikus rekombinációt előidézni, melynek során a két loxP által határolt régió kivágódik. Az IRES (Internal Ribosomal Entry Site) egy olyan nukleotidszekvencia, amely lehetővé teszi a riboszóma számára, hogy az mRNS 5'-végén kívül erre a szakaszra is be tudjon kötődni, ezáltal egy átíródó mRNS-ről több fehérje is képződhet. Így a **PV-IRES-Cre** vonal egereiben a változatlan mennyiségű parvalbumin mellett Cre rekombináza is képződik (Hippenmayer, 2005).

III.2. **PV/GAD67**- egérmodell előállítása a „floxolt” **GAD67** és **PV-IRES-Cre** egértörzsek genetikai keresztezésével

A „floxolt” **GAD67** (ff/++) és **PV-IRES-Cre** (++)/cc) homozigóta egértörzsekből származó tenyészállatokat pároztattuk, így az első utódnemzedékben (F1 generáció) mindkét génre nézve heterozigóta állatok születtek. Az F1 nemzedékből kiválasztott tenyészpárok utódai (F2 generáció) között többféle genotípus volt megtalálható, többek között a „floxolt” **GAD67**-re homozigóta és a Cre- rekombináza heterozigóta (ff/c+), illetve mindkét génre nézve homozigóta (ff/cc) egerek.

Az F2 generáció ff/c+ és ff/cc egyedeiben a PV-t expresszáló sejtekben Cre rekombináza is képződik, amely képes kihalmozni a gad1 gén két loxP közé illesztett 2. exonját, vagyis inaktiválni a GAD67 gént (5. ábra).



5. bra: PV/GAD67- egérmodell el all t sa a „floxolt” GAD67  s PV-IRES-Cre eg rt rsek genetikai keresztezésével. A Cre rekombináz a két loxP hely közé illesztett szekvencia k has t s val inaktiválja a gad1 gént, ezáltal a PV+ interneuronokban nem képződik GAD67 mRNS és fehérje. Ennek következménye a jelentősen csökkent GABA szint.

III.3. DNS izolálása faroksz vetb l a genotipizáláshoz

A genotipizáláshoz szükséges DNS az egerek farokmint j b l származott, izolálása az alábbi módon történt. Az egerek f l centiméteres farokdarabk i egy éjszakán át inkub l dtak 55 C-on, 0,5 mg/ml Proteináz K-t tartalmazó lízis pufferben (50mM TRIS-HCl pH 8.0, 100mM EDTA pH 8.0, 100mM NaCl, 1%SDS). Másnap 25:24:1 arányban, összesen 700 l fenolt, kloroformot és izoamil alkoholt tartalmazó oldat hozzáadását követően a minták 10 percen át maximális sebességen (13000 RPG) centrifug l dtak, majd a vizes fázis tézta eppendorf cs vekbe került. 1ml 96%-os etanol hozzáadását követően a minták újabb 10 percig centrifug l dtak. A 96%-os etanol eltávolítása után 70%-os etanolos mosás, és újabb, 5 perces centrifuga következett. Ezután 37 C-os vízfürdőben száradtak a minták, végül feloldásuk 100 l TE pufferben (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) történt.

III.4. A kísérletben használt állatok genotípusának meghatározása

A „floxolt” **GAD67** gént azonosítása PCR-ral történt, a reakcióhoz választott specifikus primerek az egyik beépült loxP helyet határolták, így a beépült szekvenciából adódó méretbeli különbség alapján elkülöníthető volt a vad típusú és „floxolt” allél. A primerek a következők voltak: forward: 5'- GCTACTGTGCTTGCGCCCCAGTC -3' reverz: 5'- GTAACCTCGCGTCCCTGGCAGCC -3'. A reakcióhoz az alábbi paraméterek kerültek kiválasztásra: 94°C 1 percig, 62°C 1 percig, 72°C 1 percig 30 cikluson keresztül. A PCR reakciót követően a keletkezett termékek meghatározása agaróz gélelektroforézis segítségével történt, így a vad típusú (508 bázispár) és „floxolt” (576 bázispár) allélok elkülöníthetőkké váltak. A „floxolt” **GAD67** génre homozigóta állatok két kópiában tartalmazták a „floxolt” allélt, míg a heterozigóták mind a vad típusú, mind a „floxolt” allélt egy-egy kópiában hordozták.

A **PV-IRES-Cre** egerek genotipizálása real-time PCR (RT-PCR) technikával a Cre kazettára tervezett primerekkel történt. Az alkalmazott oligonukleotidok a következők voltak: forward primer: 5'-GCCGCGCGAGATATGG-3', reverz primer: 5'-AGCTTGCATGATCTCCGGTATT -3'. A reakció végbemenetele az alábbi paraméterek alapján történt: 94°C 15 másodpercig, 60°C 1 percig 32 cikluson keresztül. A detektáláshoz fluorogén TaqMan próbák kerültek kiválasztásra, amelyek fluorofort tartalmaznak, és képesek az oligonukleotidok 5' végéhez kötődni. A keletkező fluoreszcens jel alapján a képződött termék mennyisége mérhető volt. A reakcióban egy egykópiás belső kontroll is szerepelt, amelyhez a keresett gén kópiaszáma viszonyítható. Ez alapján eldönthető volt, hogy a vizsgált állat a Cre génre nézve heterozigóta (c/+) vagy homozigóta (c/c) genotípussal rendelkezett. Az 1. táblázat összefoglalja a genotipizálásokhoz használt primerek szekvenciáit és főbb reakciókörülményeit.

Gén	Primer szekvencia	Primer kezdete-vége	Olvadási hőmérséklet	Ciklusszám
gad1(GAD67)	Forward: GCTACTGTGCTTGCGCCCCAGTC		62°C	30
	Reverz: GTAACCTCGCGTCCCTGGCAGCC			
Cre	Forward: GCCGCGCGAGATATGG	898-913 bp	60°C	32
	Reverz: AGCTTGCATGATCTCCGGTATT	951-930 bp		

1.táblázat: PCR és RT-PCR reakciók szekvenciái és főbb reakciókörülményei

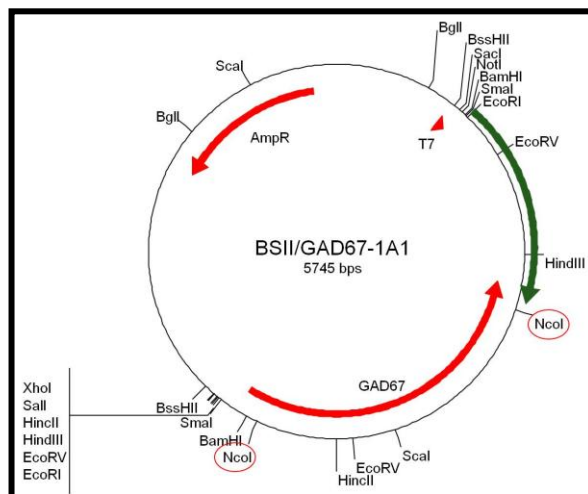
III.5. Fagyasztott és úsztatott (floating) metszetek készítése agyszövetből

A kontroll és mutáns állatokat avertinnel elaltattam, majd 0,9%-os NaCl oldatos atmoszféra követően transzkardiálisan megperfundáltam őket. Az *in situ* hibridizációhoz 4%-os paraformaldehidet használtam fixálóként.

A fagyasztott metszetekhez a mintákat egy napra 10%-os, két napra 20%-os, cukoroldatba helyeztem, majd kriosztáttal 20 µm vastagságú koronális szeleteket metszettem belőlük. Az úsztatott metszetekhez szintén 20 µm vastagságú koronális metszeteket készítettem vibretommal.

III.6. RNS próba *in situ* hibridizációhoz

Az *in situ* hibridizációhoz a digoxigennel jelölt RNS próbát egy, az egér GAD67 cDNS-ét tartalmazó Bluescript alapú plazmidról (GAD67 1A1) szintetizáltam, melyet a laboratóriumunk készített (Katarova, 2000). A plazmidot először NcoI restrikciós enzimmal emésztettem, így két lineáris fragment keletkezett, melyek közül a nagyobbik (4000 bp) méretű tartalmazott egy kb. 1000 bp-nyi méretű darabot a GAD67 mRNS 5' részéből, és közvetlenül utána egy T7 RNS polimeráz felismerő szekvenciát a vektorból. Az



6. ábra: GAD67 1A1 plazmid. A hosszabbik piros nyíl a próba szintézis irányát jelöli.

in situ hibridizációhoz egy „antisense” orientációjú RNS próbát szintetizáltam erről a fragmentről, amely komplementer a GAD67 mRNS-sel, így képes ahhoz hibridizálódni. A szintézishez T7 RNS polimeráz enzimet (Promega) használtam (6. ábra).

III.7. GAD67 *in situ* hibridizáció agyi metszeteken

A 4%-os paraformaldehidben (PFA) történő posztfixálást és 0,1%-os Tween detergenst tartalmazó PBS (PBST) mosásokat követően 2µg/ml-es ProteinázK-val emésztettem a szöveteket. Az emésztést 2mg/ml-es glicin oldattal állítottam le, ezután 4%-os PFA-ban posztfixálaltam a metszeteket. A GAD67 próbák felvitele a hibridizációs pufferben (50% formamid, 5% SSC, 0,1% Tween és 50µg/ml élesztő- tRNS) történt, a hibridizáció egész éjjel át, 62°C-on ment végbe. A nem kötődött próbák eltávolítása szintén 62°C-on, több lépésben történt: 50%-os formamid-2xSSC, 2xSSC és 0,2xSSC oldatok segítségével. A metszeteket 2 órán át blokkoltam 2%-os FBS-t (magzati szarvasmarha szérum) és 2mg/ml BSA-t (marha szérum albumin) tartalmazó PBST oldatban, ezután alkalikus-foszfátáz konjugált α-DIG-Fab ellenanyaggal (Roche, 1:3000, 1% BSA-PBST-ben) inkubáltam őket 4°C-on, egy éjszakán át. A PBST és az alkalikus- foszfátáz pufferes (0,1 M Tris pH 9,5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂ és 2µg/ml levamisol) mosásokat követően a metszeteket BCIP és NBT alkalikus-foszfátáz szubsztrátot tartalmazó festőoldatba helyeztem 3-16 órára. A megfestett metszeteken ezután PV immunhisztokémiát indítottam.

III.8. GAD67 *in situ* hibridizációt követő PV immunhisztokémia

A TBS (50 mM TRIS HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) mosásokat követően a metszeteket 0,3%-os H₂O₂ oldattal, majd 0,4% Triton-X-et tartalmazó 0,5 %-os blokkolóban (Boehringer) inkubáltam. Az elsődleges ellenanyagot (PV; Sigma-Aldrich, 1:5000, 1% BSA-TBST-ben) 72 óráig hagytam a metszeteken, 4°C-on. A másodlagos biotinilált kecske-anti-egér (Vector, 1:500, 1% BSA-TBST-ben) ellenanyagot, 2 órán át, szobahőmérsékleten alkalmaztam. Ezután HRP-vel jelölt Extravidinnel (Sigma-Aldrich, 1:500 TBS-ben) inkubáltam a metszeteket. A PV jelölést 0,001% H₂O₂, 0,05M (Diaminobenzidin) tartalmú TBS oldattal hívtam elő. A metszeteket először felszálló etil alkoholos sorban, majd xilolban dehidratáltam, végül DepEX-

xel fedtem le. A megfestett és lefedett metszeteket Zeiss Axioskop 2 Mot Plus mikroszkóppal vizsgáltam és AxioVision Rel. 4.8.3. programmal fényképeztem.

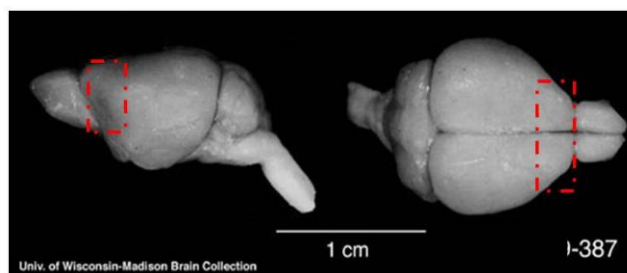
A frontális agykéreg területén a PV/GAD67 kettős pozitív sejtek számát ImageJ program segítségével határoztam meg.

III.9. A GAD67 és GAD65 génexpresszió vizsgálata QPCR segítségével

3 kontroll és 3 mutáns (ff/c+) állatból 3 agyterületet izoláltam (frontális agykéreg [7. ábra], hippokampusz és kisagy), ezt követően TriReagent (Molecular Research Center) segítségével RNS-t nyertem ki belőlük. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) segítségével protokoll szerint

(*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits protokoll, Applied Biosystems: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042557.pdf*) 2µg RNS-ből cDNS-t készítettem, a reakciókörülmények az alábbiak voltak: 10 perc 25°C-on, 2 óra 37°C-on, 5 perc 85°C-on, majd hűtés 4°C-ra.

A QPCR reakciók összeméréséhez Taqman Gene Expression Master Mix-et (Applied Biosystems), gad1 (GAD67) vagy gad2 (GAD65) TaqMan próbát, belső kontrollként pedig eger β-aktint (Applied Biosystems) használtam. A bemért cDNS mennyiség minden esetben 1,5 ul volt (ez a szintetizált cDNS 7,5%-a volt), a reakciókörülményeket az 2. táblázat tartalmazza. A statisztikai elemzéshez GraphPad InStat3 szoftvert használtam.



7. ábra: Egér agy. A piros négyzetek a frontális agykéreg területét jelzik.

Reakciókörülmények	UDG Inkubáció	AmpliTaQ Gold, UP enzim aktiváció	PCR, 40 ciklus	
			Denaturáció	Annealing
Hőmérséklet (°C)	50	95	95	60
Idő	2 min	10 min	15 sec	1 min

2.táblázat: A QPCR reakciókörülményei összefoglalva.

III.10. A GAD67 fehérje expressziós szintjeinek vizsgálata Western blot technika segítségével

3 kontroll és 3 mutáns (ff/c+) egérből 4 agyterületet (szaglógumó, agykéreg, hippocampus, kisagy) izoláltam, majd homogenizáló pufferben (20 mM HEPES, pH 7,4, 1% Triton X-100, 4% SDS, proteáz inhibitorok) homogenizáltam őket. Ezt követően 10 µg fehérje

Elsődleges ellenanyag	Hígítás	Másodlagos ellenanyag	Hígítás
Nyúl-anti-GAD67	1:2000	Anti-nyúl- HRP	1:40 000
Egér anti-β-aktin	1:10 000	Anti-egér-HRP	1:20 000

3.táblázat: A Western blot során használt ellenanyagok.

mintát futtattam meg 10%-os SDS-PAGE elektroforézissel, majd PVDF membránra blottoltam őket. A membránokat Amersham-féle ECDL-technikával (GE Healthcare Lifesciences) festettem meg. A használt ellenanyagokat a 3. táblázatban foglaltam össze. A kiértékelést GeneSnap (Syngene) szoftverrel végeztem, kontrollként β-aktint használtam.

III.11. A GAD67 hiány következtében megjelent fenotípusok vizsgálata

III.11.1. Testtömegbeli különbségek meghatározása

30 mutáns és 28 kontroll állat testtömegét mértem meg, majd az adatokat korcsoportonként Microsoft Office Excel2007 program segítségével ábrázoltam. A szignifikancia meghatározását GraphPad InStat3 szoftver segítségével végeztem el.

III.11.2. Magatartás tesztek: Motoros és mozgáskoordinációs zavarok felmérése

Annak bizonyítására, hogy a mutáns állatokra gyenge izomzat és motoros zavarok jellemzőek, az alábbi tesztekot végeztem el.

A „**claspig**“ **viselkedés** (a hátsó végtagok görcsös behúzása) megfigyelésében 17 kontroll és 18 mutáns állat vett részt. Az állatokat egyenként, a farkuknál felfüggesztve lógattam, 30 másodpercig.

Az izomzat erősségének megállapítására az állatok **rácson történő kapaszkodását** figyeltem meg. Ehhez 30 kontroll és 36 mutáns egeret helyeztem egyesével egy rácsra. Rövid rázogatóst követően - így bátorítva az állatokat kapaszkodásra - hirtelen megfordítottam azt. Minden állat esetében három ismétlést végeztem.

A **negatív geotaxis** kísérlet során függőleges rácsra helyeztem egyesével, fejjel lefelé 9 kontroll és 8 mutáns állatot, majd mértem a megfordulásukig eltelt időt. Minden állatnál három ismétlés történt.

Járásmód vagy „gait“ analízishez 9 kontroll és 9 mutáns állat mellső és hátsó mancsait különböző színűre festettem, majd egy kb. 1 m X 15 cm-es fehér papírlapon hagytam őket végigsétálni. Ezután lemértem az azonos oldali mellső és hátsó mancs közötti különbséget (lépéshosz), a mellső mancsok valamint a hátsó mancsok távolságát, illetve az azonos oldali mellső és hátsó mancsnyomok közötti átfedést (Carter, 1999).

Az első három teszt kiértékelését videó felvételek alapján végeztem, a „gait“ analízis esetében a mancslenyomatokat a megadott szempontok alapján mértem le.

IV. Eredmények és értékelésük

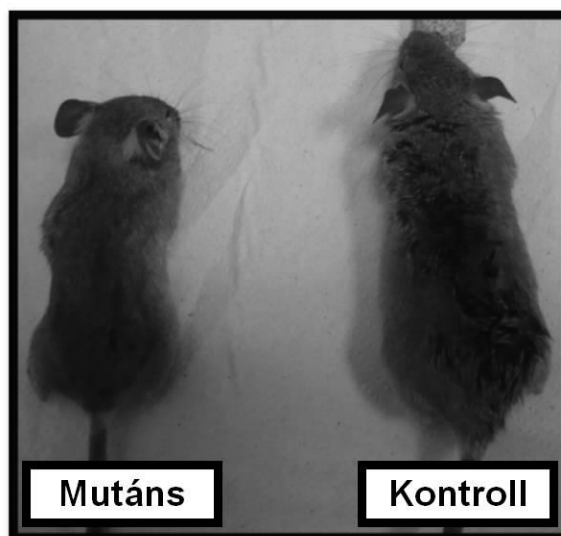
IV.1. A PV/GAD67- egerek általános jellemzése

A „floxolt” GAD67 és PV-IRES-Cre egértörzsek keresztezéséből keletkezett egérvonalból azokat az egyedeket válogattam ki, amelyeknek a genotípusa „floxolt” GAD67 allélokra nézve homozigóta (f/f), míg Cre-rekombináz alléljait tekintve homozigóta (c/c) vagy heterozigóta (c/+) volt.

Az egy (c/+) és két (c/c) kópia Cre rekombinázttal tartalmazó PV+ idegsejtekben is inaktiválódik mindkét gad1 gén, vagyis a mutáció a GAD67-re nézve homozigóta. Azonban a c/+ egerekben a c/c egerekhez viszonyítva kevesebb PV+ sejtben vágódik ki a gad1 gén az alacsonyabb Cre rekombináz szint miatt.

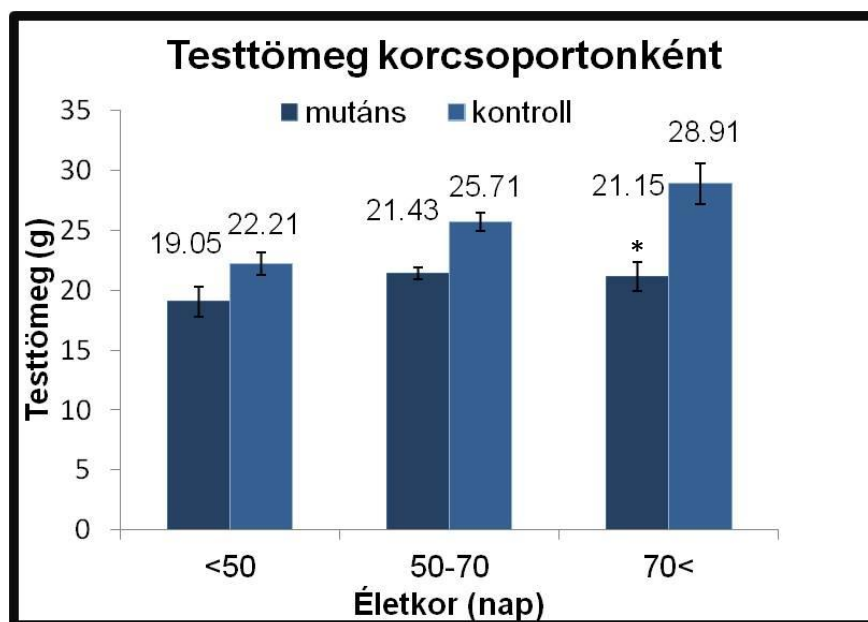
Így a genotípustól függően erősebb (ff/cc) és gyengébb (ff/c+) fenotípust mutató egereket is vizsgálhattam. Kontrollként FVB-Ant vad típusú vagy ff/++ genotípusú egereket választottam.

A kísérletbe vont ff/cc és ff/c+ állatok visszahúzódóbbak voltak, mint a kontroll egerek, gyakran lassan és bizonytalanul mozogtak, dülöngélve, szétterpesztett lábakkal jártak, izomtónusok egészséges társaikhoz képest jelentősen csökkent. A külvilág ingereire sokkal érzékenyebben reagáltak, evési nehézségeik voltak, és súlyosabb esetben szemrángások illetve görcsrohamok is jelentkeztek náluk. A mutáns egerek általában kisebb testmérettel rendelkeztek (8. ábra), illetve testtömegük is szinte minden esetben kisebb volt, mint az azonos korú kontroll egereké. Az 50 nap alatti állatoknál a testtömeg csökkenés 14%, az 50-70 nap közötti állatoknál 17%, míg a 70 nap feletti állatok esetében 27% volt, a kontroll állatokhoz viszonyítva. Emellett



8.ábra: Mutáns és vad genotípusú egerek testméretbeli különbségei. A mutáns egerek testmérete jóval kisebb a kontroll állatokéhoz viszonyítva.

a mutáns állatok testtömeg növekedésének mértéke is sokkal kisebb volt a kontroll állatokhoz képest, sőt, 50 napos kor után a mutáns állatok tömege gyakorlatilag nem nőtt tovább (9. ábra).



9. ábra: Az állatok testtömeg változása korcsoportonként.
(* $p < 0,05$)

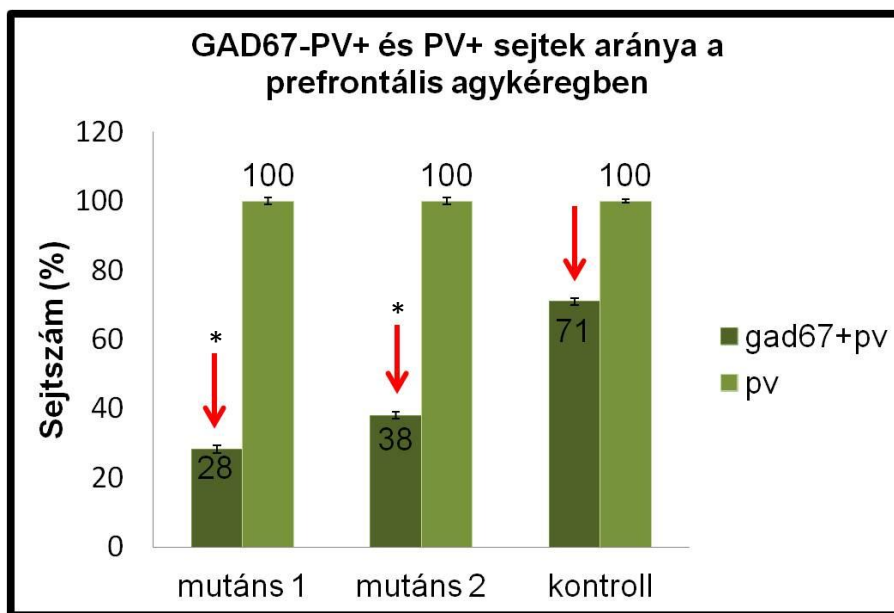
IV.2. A GAD67 mRNS szintű expresszió változása a **PV/GAD67**- egrek különböző agyterületeinek PV+ idegsejtjeiben: *in situ* hibridizációs vizsgálatok

A mutáns egrek különböző agyterületein a PV+ sejtek egy részéből teljesen hiányzik a GAD67 mRNS, ez a változás a GAD67 *in situ* hibridizációval és PV immunhisztokémiával festett ábrákon jól látható.

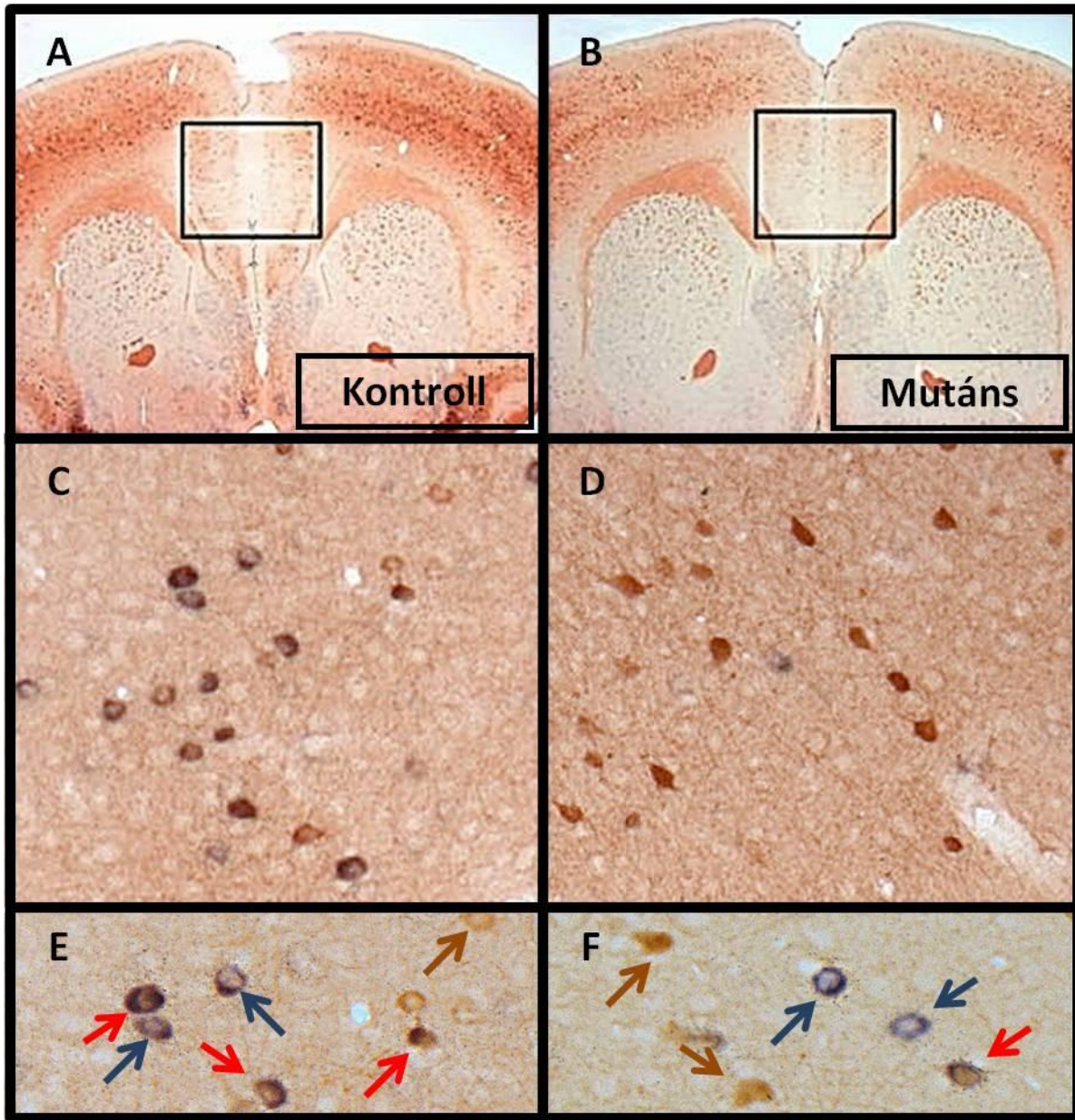
A kor előrehaladtával a mutáns állatok PV+ idegsejtjeiben fokozódik a GAD67 hiány. Előzetes kísérletekben meghatároztam, hogy a GAD67 gén inaktiválódása az állatok egy hetes kora körül indul meg. A gén kivágódása 60 napos kor körül lesz teljes, ezért a vizsgálatokhoz ilyen korú állatokat választottam. A kísérletekben nőstény és hím állatok is részt vettek, azonban a nemek között számottevő különbséget nem tapasztaltam.

Agykéreg

A mutáns egerek agykérgében a kontrollhoz képest kevesebb volt a GAD67-PV+ sejt, ez a csökkenés különösen a prefrontális területet érinti (11. ábra). Ezt a változást a sejtszámolás adatai is alátámasztották: a vizsgált területen két mutáns állatban a PV sejtek 28% illetve 38%-a volt GAD67 pozitív is, míg ez a szám a kontroll állatokban 71% volt (10. ábra). Ezenkívül a mutáns állatok egyéb agykérgi területein elhelyezkedő PV+ neuroncsoportok egy részéből is hiányzott a GAD67 mRNS.



10. ábra: A mutáns állatok prefrontális agykérgében lecsökken a GAD67-PV+ sejtek aránya a kontrollokhoz viszonyítva. (* $p < 0,05$)



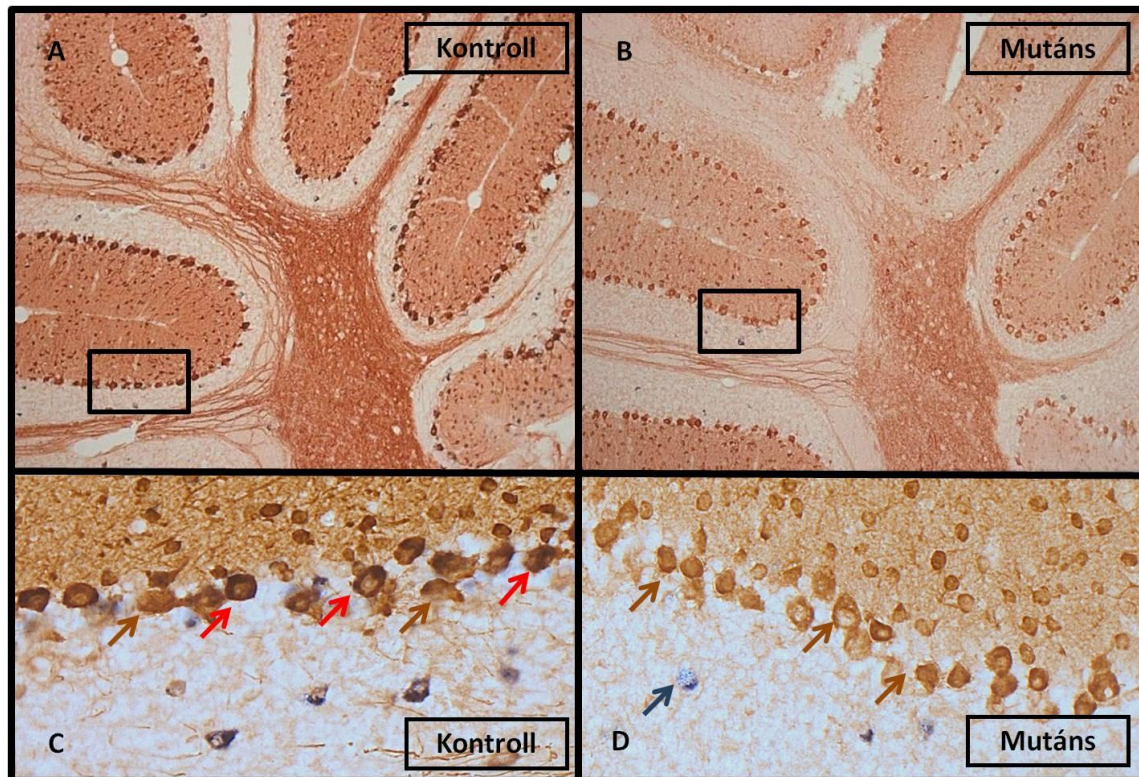
11. ábra: A prefrontális kéregben jól megfigyelhető, hogy a mutáns állatokban jelentősen csökkent a GAD67/PV kettős pozitív sejtek száma. (*In situ* hibridizációval kombinált PV immunhisztokémia. A-B: 2,5X-es nagyítás C-D: a fekete kerettel kiemelt terület 10X-es és E-F: 20X-os nagyítása; sötét kék nyíl: GAD67 mRNS, barna nyíl: PV fehérje , piros nyíl: GAD67 mRNS+ PV fehérje).

Egyéb agyterületek

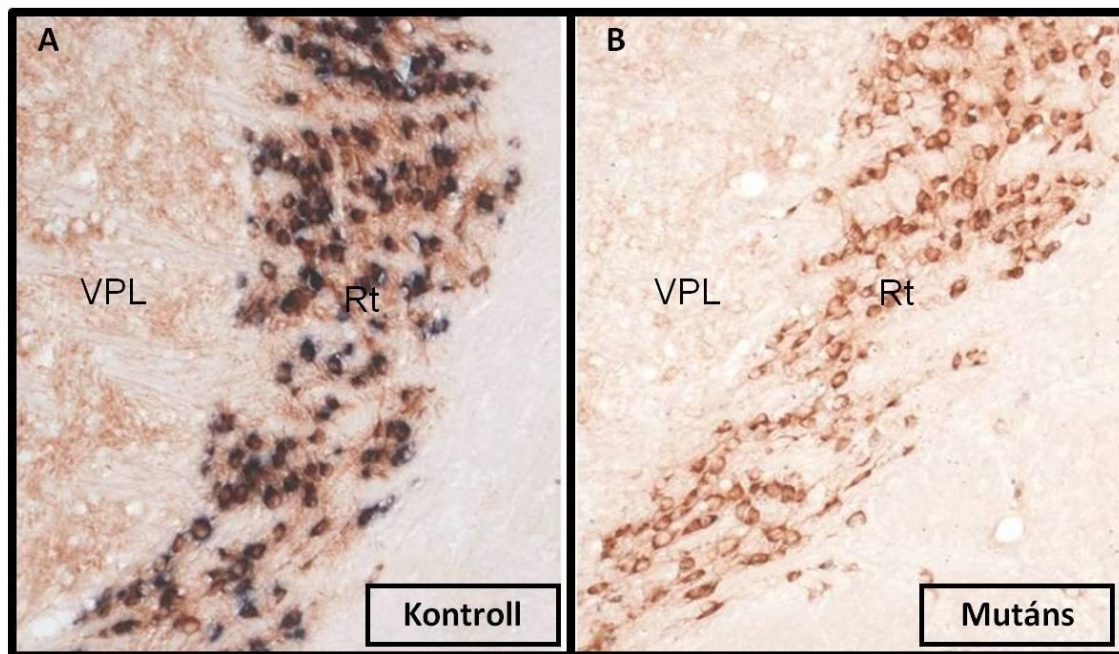
A **kisagy**ban főleg a Purkinje-sejtekben és a molekuláris rétegben történt változás, a GAD67 mRNS alig mutatható ki (12. ábra).

A **retikuláris mag** egy teljes egészében GABAerg struktúra, gyakorlatilag minden sejtjéből hiányzik a GAD67 mRNS a mutáns egerekben. (13. ábra).

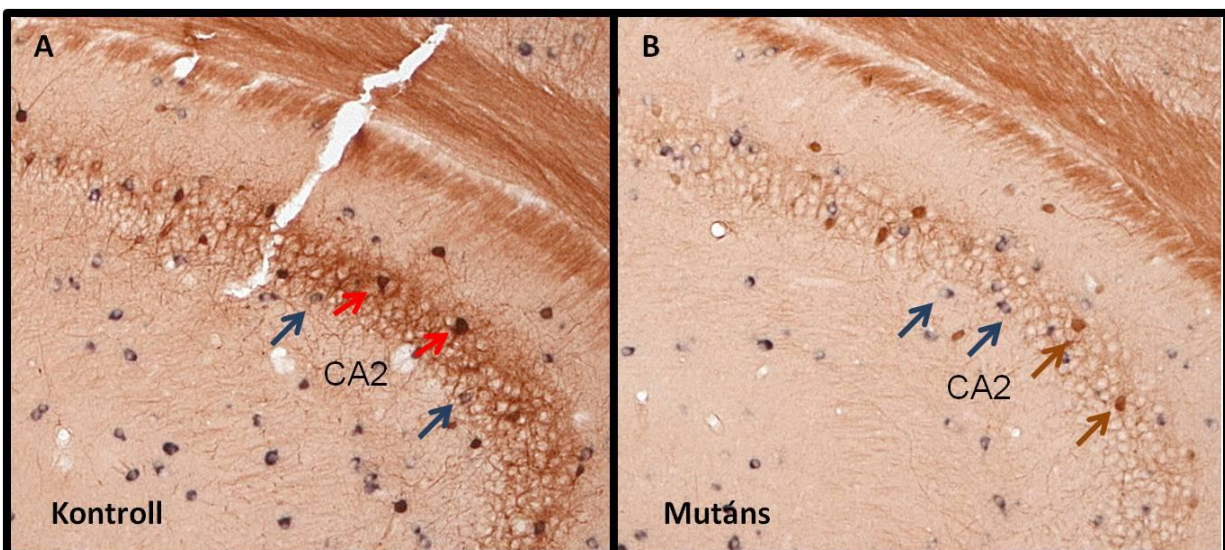
A **hippokampusz** esetében CA2-es régió és a subiculum (az ábrán nem szerepel) a legérintettebb, a GAD67+ sejtek száma erősen lecsökken ezeken a területeken (14. ábra).



12. ábra: A mutáns állatokban, a kisagy területén szinte teljes GAD67 mRNS hiány figyelhető meg a Purkinje- sejtek rétegében, de a molekuláris rétegben is jelentős csökkenés tapasztalható. (*In situ* hibridizációval kombinált PV immunhisztokémia. A-B: 10X-es nagyítás C-D: a fekete kerettel kiemelt terület 20X-os nagyítása; sötét kék nyíl: GAD67 mRNS, barna nyíl: PV fehérje , piros nyíl: GAD67 mRNS+ PV fehérje)

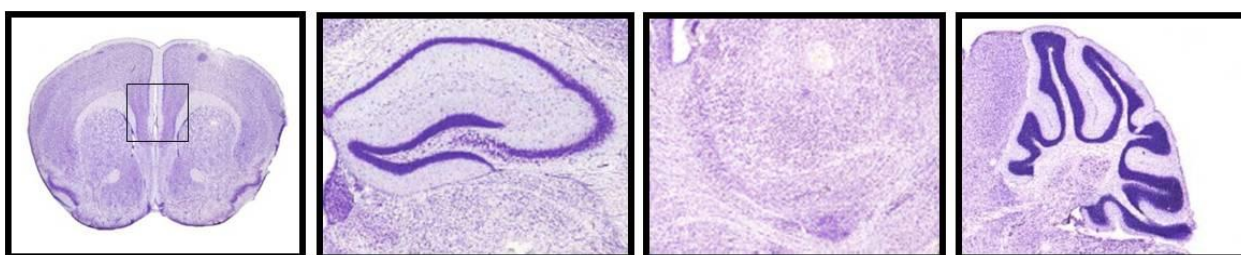


13. ábra: A retikuláris magban a PV+ sejtekből teljesen hiányzik a GAD67 mRNS a mutáns állatokban. (*In situ* hibridizációval kombinált PV immunhisztokémia. A-B: 20X-os nagyítás, kék szín: GAD67; barna szín: PV pozitív sejtek)



14. ábra: A hippocampusz területén a GAD67 mRNS hiány elsősorban a CA2 régióra jellemző. A PV+ sejtek egy részében nincsen GAD67 mRNS. (*In situ* hibridizációval kombinált PV immunhisztokémia. A-B: 20X-os nagyítás, kék szín: GAD67; sötét kék nyíl: GAD67 mRNS, barna nyíl: PV fehérje, piros nyíl: GAD67 mRNS+ PV fehérje)

Összefoglalva elmondható, hogy az összes vizsgált mutáns állatban a retikuláris mag GABAerg idegsejtjei (mindegyik PV+) nem tartalmaztak GAD67 mRNS-t, emellett a kisagy Purkinje sejtjeinek döntő többségében sem volt GAD67. Ugyanakkor a különböző mutáns állatokban az agykéreg területén eltért a GAD67-/PV+ sejtek száma és eloszlása, illetve a hippocampusz területén is egyedenként változott a GAD67 mRNS expresszió mintázata a PV+ interneuronokban (4. táblázat).

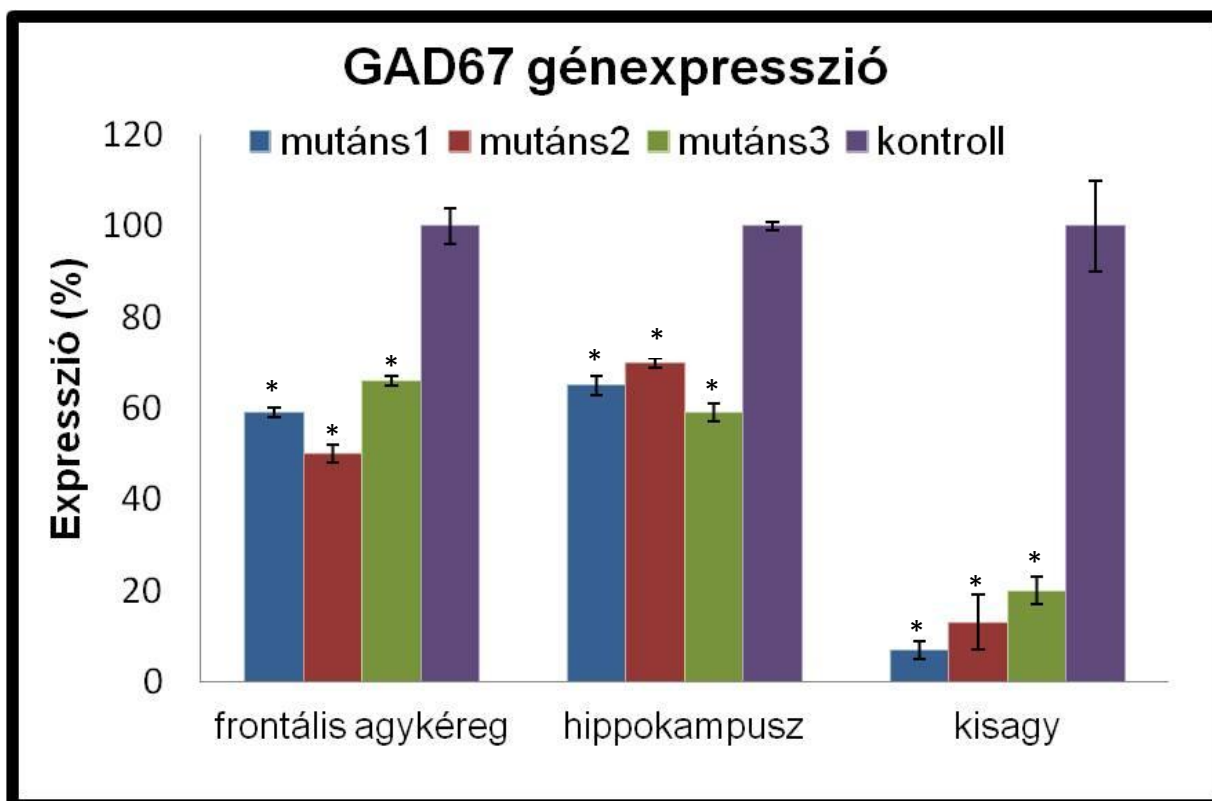


Agyterület	Kontroll	Mutáns
Frontális agykéreg	*****	***
Retikuláris mag	*****	-
Kisagy	*****	*
Hippokampusz	*****	***

4. táblázat: A GAD67 mRNS-t expressziáló PV+ idegsejtek aránya a különböző agyterületeken a kontroll, illetve a mutáns állatokban.

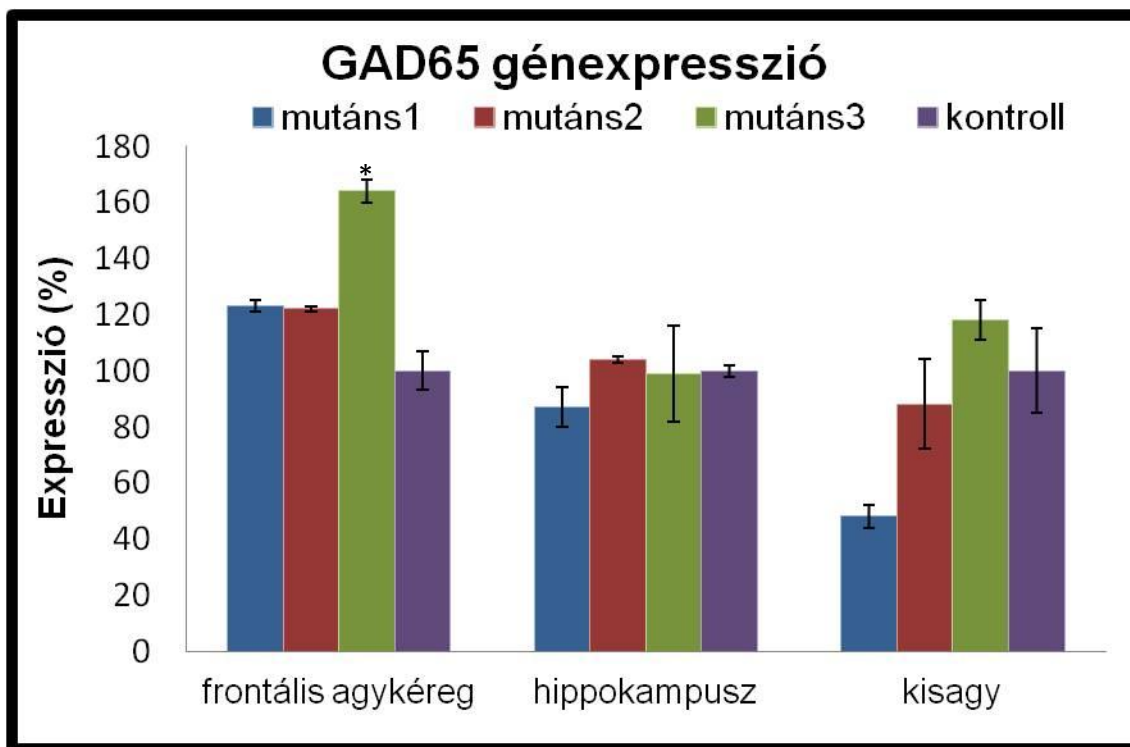
IV.3. A GAD67 és GAD65 mRNS expresszió QPCR analízise különböző agyterületeken

QPCR technikával kimutattam, hogy mindhárom vizsgált agyterületen (frontális kéreg, hippocampusz, kisagy) lecsökkent a mutáns állatokban a gad1 (GAD67) mRNS szintje a kontrollokhoz viszonyítva. A frontális agykéregben a redukció átlagosan 42%, a hippocampuszban 35%, míg a kisagyban 83% volt. A csökkenés mindhárom esetben szignifikánsnak adódott ($p < 0,05$) (15. ábra).



15. ábra: gad1 (GAD67) gén expressziója különböző agyterületeken, QPCR analízis alapján. (* $p < 0,05$)

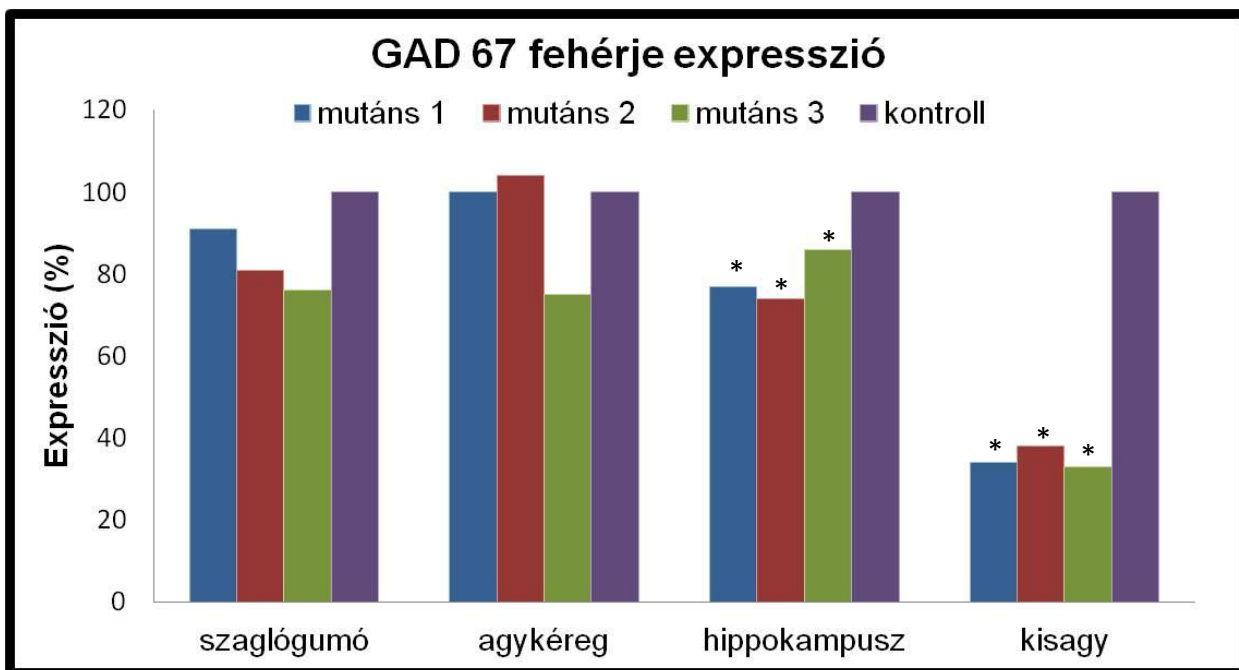
A gad2 (GAD65) gén esetében nem történt szignifikáns változás. ($p > 0,05$). Az egyes agyterületek esetében egyedfüggő volt az expresszió mértéke a mutáns állatokban, ez alól a frontális agykéreg volt kivétel: itt mind a három vizsgált állatban megnőtt a génexpresszió szintje a kontrollokéhoz képest (16. ábra).



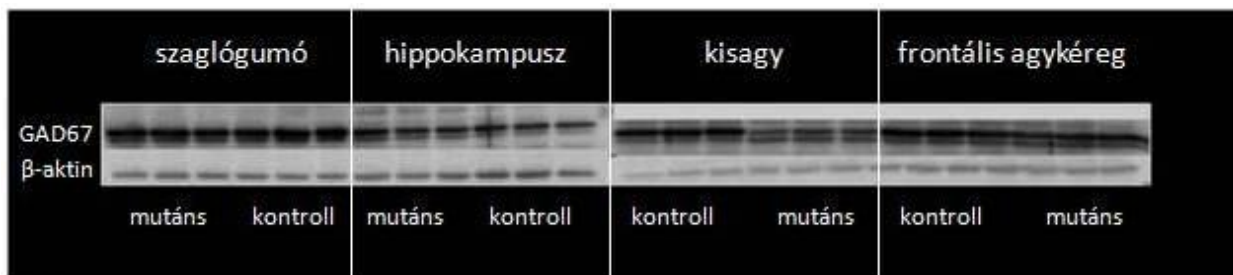
16. ábra: gad2 (GAD65) gén expressziója különböző agyszerületeken, QPCR analízis alapján.

IV.4. A GAD67 fehérjeszint vizsgálata Western blot segítségével

Western blott analízissel egyértelmű GAD67 fehérje szint csökkenést mutattam ki 3 agyszerületen (szaglógumó, hippocampusz, kisagy), azonban az agykéreg területén egyedenként kissé eltért az expressziós szint. A szaglógumó területén a GAD67 fehérje csökkenés átlagosan 17%, a hippocampusz esetében 21%, míg a kisagynál 65% volt. A GAD67 fehérjeszint két mutáns állat agykérgében számottevően nem változott, azonban a harmadik mutáns állat esetében 25%-os csökkenés volt tapasztalható. Szignifikáns változás csak a hippocampusz és a kisagy területén történt ($p < 0,05$) (17. ábra, 18. ábra).



17. ábra: A GAD67 fehérje expressziós szintje különböző agyszerületeken, Western blot analízis alapján. (* $p < 0,05$)



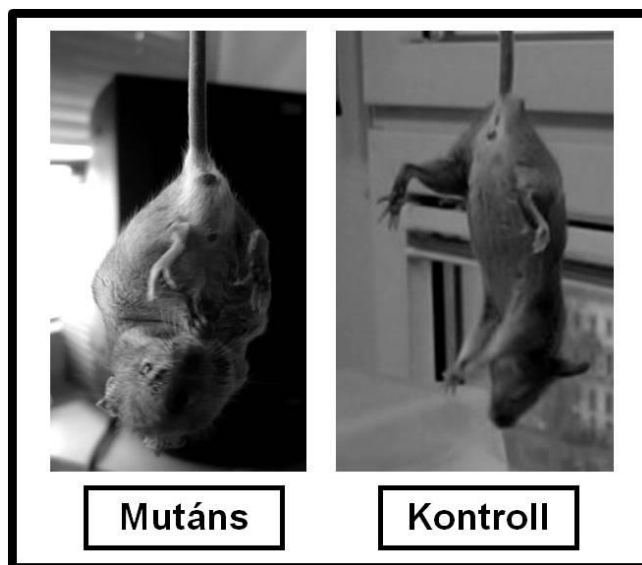
18. ábra: Western blot membrán GAD67 és β-aktin ellenanyaggal festve. A kisagy és a hippocampus területén a GAD67 fehérje szintjében jól látható a különbség.

IV.5. Magatartástesztek: Motoros és mozgáskoordinációs zavarok

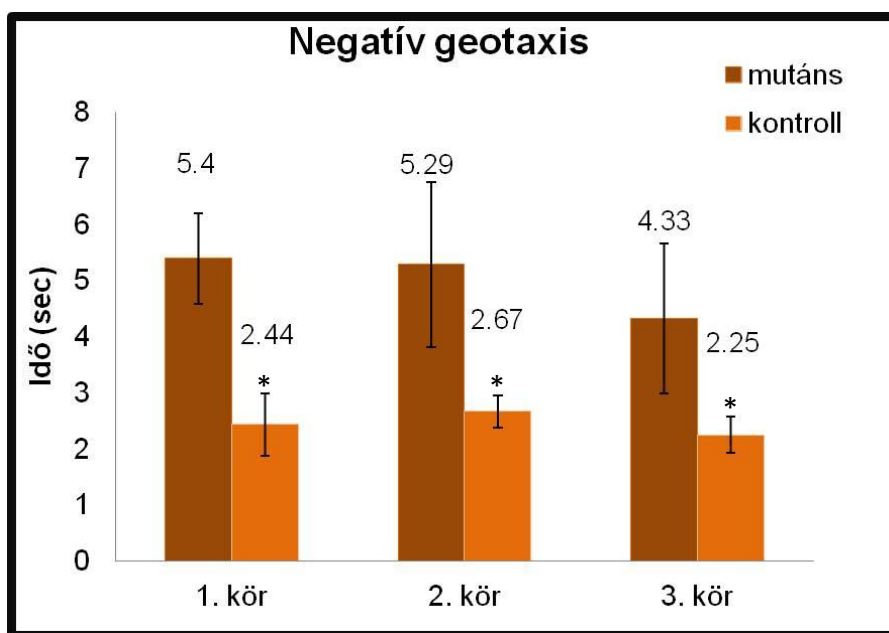
A „clapsing” viselkedés során a mutáns fenotípusú állatok mindegyike a hátsó végtagjait görcsösen behúzta, szemben a kontroll állatokkal, akik normálisan, a testtől eltávolítva tartották azt (19. ábra).

A **rácson történő kapaszkodás** vizsgálatakor 36 mutáns állatból 16 gyenge izomzatuk következtében leesett a rács megfordításakor, a többi mutáns illetve a kontroll állatok mindegyike a megfordítást követően is képes volt magát megtartani.

A **negatív geotaxis** kísérlet esetében a mutáns egerek mindegyikének jelentősen tovább tartott a rácson megfordulni, mint a kontroll állatoknak. Ez a különbség mind a 3 tesztelési körben fennmaradt. Azonban a 3. ismétlésre mind a mutáns, mind a kontroll állatoknak kevesebb időre volt már ehhez szüksége (20. ábra).

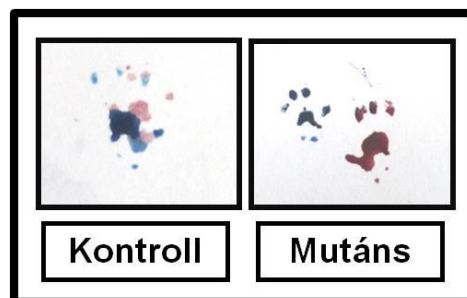


19. ábra: A „clapsing” viselkedés vizsgálata során a mutáns állatok hátsó végtagjaikat a testükhöz közel húzzák, míg a kontroll állatok testüktől eltávolítják azokat.

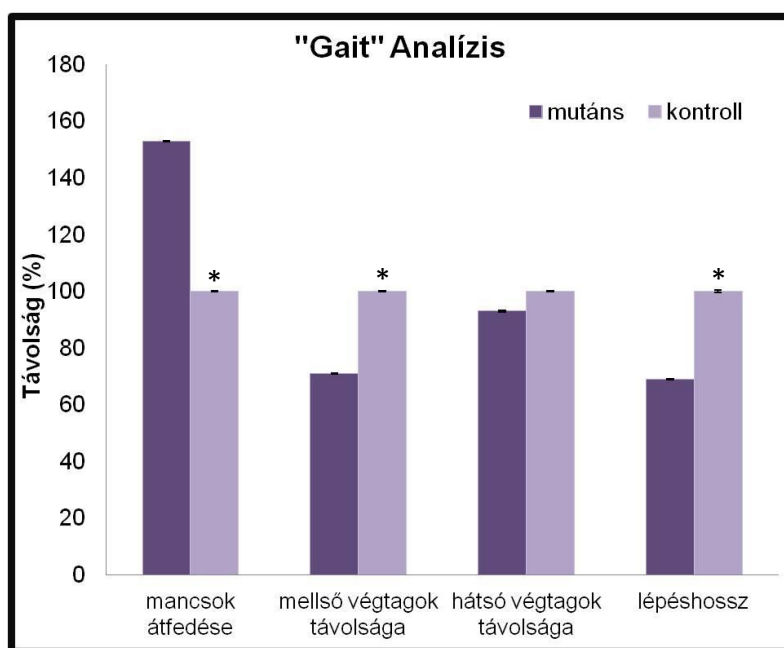


20. ábra: A negatív geotaxis eredménye. A mutáns állatoknak jóval több ideig tartott a függőleges rácson megfordulni, mint a kontroll állatoknak. (* $p < 0,05$)

A **járásmód vagy „gait”** analízis során a vizsgált mutáns állatok lépéshossza, mellső és hátsó végtagjuk távolsága a kontroll csoport tagjaihoz képest jóval kisebbnek adódott. Ez is azt demonstrálja, hogy a mutáns állatok testmérete kisebb. A mancsok átfedésének távolsága a kontroll állatoknál közel fele akkora, mint a mutáns egyedek esetében (21. ábra), amely azt mutatja, hogy az egerekre jellemző ruganyos, kiegyensúlyozott járás a mutáns állatoknál megszűnik. A szétterpesztett lábakkal történő mozgást bizonyítja az is, hogy a hátsó végtagok távolsága nem csökkent olyan mértékben, mint a mellső mancsok távolsága és a lépéshossz (22. ábra).



21. ábra: A „gait” analízis során felvett mancslenyomatok. A mutáns állatok mellső és hátsó mancsnyoma között nagyobb a távolság, mint a kontroll állatok esetében.



22. ábra: A járásmód analízis eredménye. A mutáns állatok mellső és hátsó végtag távolsága, valamint lépéshossza kisebb, mint a kontroll állatoké. Ezzel ellentétben a mancsnyomok átfedése a mutáns állatoknál nagyobb. (* $p < 0,05$)

A fenti kísérletsorozat alapján egyértelműen megállapítható, hogy a mutáns állatok a kontroll állatokhoz viszonyítva motoros zavarokkal és csökkent izomtónussal rendelkeznek.

V. Összefoglalás

A fenti kísérletek alapján elmondható, hogy sikerült létrehoznunk egy olyan egér modellt, amelynek PV+ neuronjaiban egy hetes kor után egyre erőteljesebb GAD67 hiány figyelhető meg. Ez a csökkenés leginkább a, a retikuláris magban és a kisagyban feltűnő, de különböző mértékben prefrontális kéreg területét és a hippocampuszt is érinti.

A GAD67 csökkenés a különböző agyterületeken olyan magatartási formák megjelenését eredményezi, amely jellemző lehet többek között a cerebelláris ataxiára és a skizofréniára. A kor előrehaladtával az állatok epilepsziás rohamoktól is szenvednek, amely szintén összefüggésben állhat a GAD67 hiányával a PV+ neuronokban (5. táblázat.).

Tünet	Magatartás teszt	Agyterület	Betegség
Csökkent izomerősség	Kapaszkodás fordított rácson	kisagy	Cerebelláris ataxia
Motoros koordináció zavara	Negatív geotaxis	kisagy	Cerebelláris ataxia
Motoros zavarok	Járásmód vagy „gait” analízis	kisagy	Cerebelláris ataxia
	„Clasping” viselkedés	kisagy, striatum	Cerebelláris ataxia
Görcsös rohamok	-	hippocampusz, agykéreg, retikuláris mag(?)	Epilepszia
Szociális elszigetelődés	-	agykéreg, hippocampusz	Skizofrénia
Szorongás	-	agykéreg, hippocampusz	Skizofrénia
Stressz (fokozott érzékenység a zajokra)	-	agykéreg, hippocampusz	Skizofrénia

5.táblázat: Összefoglaló táblázat a mutáns egereknél jelentkező tünetekről, a hozzájuk kapcsolódó agyterületekről és a feltételezett betegségekről.

A jövőben tervezzük, hogy a létrehozott modell-állatban RT-PCR, Western blot és immunhisztokémiai módszerek segítségével meghatározzuk a GABAerg rendszer egyéb molekuláris komponenseinek: a GABA receptoroknak és transzporterek az expressziós változásait is. Továbbá megvizsgáljuk a PV+ interneuronok egymásközi szinaptikus és réskapcsolatait, valamint a serkentő piramissejtekkel létesített periszomatikus szinaptikus kapcsolatait is.

Reményeink szerint részletesebb és célzott magatartás vizsgálatokkal és azok expressziós változásokkal való összevetésével adatokat szolgáltatunk arra, hogy a GABA jelátvitel zavara a különböző agyterületek PV+ interneuronjaiban milyen funkcionális következményekkel jár, és milyen idegrendszeri betegségeket okozhat.

VI. Irodalom

1. S. Akbaran, H-S. Huang (2006) „Molecular and cellular mechanisms of altered GAD1/GAD67 expression in schizophrenia and related disorders”. Brain Research Review 52: 293-304
2. C. Bernard (2005) „Dogma and dreams: experimental lessons for epilepsy mechanism chasers”. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 62: 1177-1181
3. R.J. Carter, L.A. Lione, T. Humby, I. Mangiarini, A. Mahal, G.P. Bates, S.B. Dunnet, A.J. Morton (1999) „Characterization of progressive motor deficit in mice transgenic for the human Huntingtons's disease mutation.” J. Neurosci 19: 3248-3257
4. B. Chattopadhyaya, G. Di Cristo, C. Z. Whu, G. Knott, S. Kuhlman, Yu Fu, R. D. Palmiter, Z. J. Huang (2007) „GAD 67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex” Neuron 54: 889-903
5. F. Condé, J. S. Lund, D. M. Jacobowitz, K. G. Baimbridge, D. A. Lewis (1994). "Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: distribution and morphology". J. Comp. Neurol. 341 (1): 95–116
6. S. L. Erdő, J. R. Wolff (1990). "Gamma-Aminobutyric Acid outside the mammalian brain". J. Neurochem. 54 (2): 363–372.
7. G. Gonzalez- Burgos, K. N. Fish, D. A. Lewis (2011) „GABA neuron alterations, cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia”. Neural Plasticity Vol.2011, Article ID 723184, 24 pages
8. S. Heckers, D. Stone, J. Walsh, J. Schick, P. Koul, F. Benes (2002) „Differential hippocampal expression of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 messenger RNA in bipolar disorder and schizophrenia”. Arch Gen Psychiatry 59:521-529
9. S. Hippenmayer, E. Vrieseling, M. Sigrist, T. Portmann, C. Laengle, D.R. Ladle, S. Arber (2005) „A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling”. PLoS Biology 3: 0878-0890
10. Z. Katarova, G. Sekerkova, S. Prodan, E. Mugnaini, G. Szabo (2000) “Domain-restricted expression of two glutamic acid decarboxylase genes in midgestation mouse embryos”. J Comp Neurol 424:607-627.
11. T. Klausberger, L.F. Marton, J. O'Neill, J. H. Huck, Dalezios Y, P. Fuentealba, W. Y. Suen, E. Papp, T. Kaneko, M. Watanabe, J. Csicsvari, P. Somogyi (2005). „Complementary roles of cholecystokinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations". J. Neurosci. 25 (42): 9782–93
12. P. Klivényi, Z. Horváth, L. Vécsei. (2004) „A spinocerebelláris ataxiák klinikuma és diagnosztikája”. Clinical Neuroscience/Ideggyógyászati Szemle 57: 11-22
13. D.A. Lewis, T. Hashimoto, D. W. Volk (2005) „Cortical inhibitory neurons and schizophrenia.” Nat. Rev. Neurosci. 6 (4):312-24

14. D.A. Lewis, R. Sweet (2009) „Schizophrenia from a neural circuitry perspective: advancing toward rational pharmacological therapies” *The Journal of Clinical Investigation* 119: 706-716
15. J.B. Manent, A. Represa (2007) „Neurotransmitters and brain maturation: early paracrine actions of GABA and glutamate modulate neuronal migration.” *Neuroscientist* 13 (3):268-79.
16. D.L. Martin, K. Rimwall (1993); „Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain.” *J. Neurochem.* 60(2):395-407
17. E. Mugnaini and W. H. Oertel (1985) „An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry”. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Vol. 4: GABA and neuropeptides in the CNS. Part I.
18. J.W. Pan, I. Cavus, J. Kim, H.P. Hetherington, D.D. Spencer (2008) „Hippocampal extracellular GABA correlates with metabolism in human epilepsy”. *Metab Brain Dis* 23: 457-468
19. S. L. Perlman (2000) „Cerebellar Ataxia”. *Current Treatment Options in Neurology* 2: 215-224
20. B. Schwaller, M. Meyer, S. Schiffmann (2002) „New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice”. *Cerebellum* 1 (4): 241–58.
21. G. Szabó, Z. Katarova, and R. Greenspan (1994) „Distinct protein forms are produced from alternatively spliced bicistronic glutamic acid decarboxylase mRNAs during development.” *Mol Cell Biol*, 14(11): 7535-45.

VII. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni az MTA KOKI Orvosi Géntechnológia kutatócsoport vezetőjének, dr. Szabó Gábornak, és tagjainak, dr. Katarova Zójának, Máté Zoltánnak, valamint a Molekuláris Neurobiológia csoportból Lele Zsoltnak, hogy lehetővé tették számomra a laboratórium kutatásaiba való bekapcsolódást; köszönöm a rengeteg segítséget és jótanácsot, amivel hozzájárultak munkám előrehaladásához. Ezenkívül szeretném megköszönni dr. Emri Zsuzsannának, az Egri Főiskola Állattan Tanszék vezetőjének, hogy segített az anatómiai kiértékelésben. Továbbá köszönöm Nagy Alexának, hogy az egerek magatartás-tesztjeinek videóra rögzítésében segítséget nyújtott.

VIII. Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Fülöp Anikó a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül :

- az *in situ* hibridizációs és immunhisztokémiai festésekhez az agyszövetek begyűjtését és a metszetek készítését
- az *in situ* hibridizációhoz az RNS próba jelölését
- az *in situ* hibridizációt
- az immunhisztokémiát
- a sejtszámlálást a megfestett metszeten
- a megfestett metszetek fényképezését
- a QPCR-hoz az agyszövetek begyűjtését, az RNS izolálást, és az RNS átírását cDNS-sé
- a QPCR –t és kiértékelését
- a Western blotthoz az agyszövetek begyűjtését és a fehérjeminták elkészítését
- a Western blottot és kiértékelését
- a magatartás teszteket és kiértékelésüket

végeztem el.

.....

aláírás

Budapest, 2013. Január 09.