

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Az alfa-béta hidroláz 4 (Abhd4) eloszlása és szerepe az agykéreg fejlődése során

László Zsófia

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Biológus MSC, V. éves hallgató

Idegtudomány és Humánbiológia szakirány

Témavezetők: Dr. Katona István, Dr. Lele Zsolt

Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Molekuláris Neurobiológia Kutatócsoport

Budapest, 2013

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések	3. oldal
2. Összefoglaló	4. oldal
3. Bevezetés és irodalmi áttekintés	5. oldal
4. Célkitűzések	9. oldal
5. Anyagok és módszerek	9. oldal
6. Eredmények	14. oldal
7. Megbeszélés	23. oldal
8. Irodalom	25. oldal
9. Köszönetnyilvánítás	27. oldal
10. Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez	28. oldal

1. Rövidítések

Abhd4- alfa/béta hidroláz 4

AEA- anandamid (arachidonoil-etanolamin)

BSA- borjú szérum albumin (bovine serum albumin)

CP- kortikális lemez (cortical plate)

DAPI- 4',6-diamidino-2-fenilindol

DIG- digoxigenin

EDTA- etiléndiamin-tetraecetsav

FAAH- zsírsavamid hidroláz (fatty acid amide hydrolase)

GDE1- glicerofosz-fodiészterfoszfodiészteráz 1

GFP- zöld fluoreszkáló fehérje (green fluorescent protein)

GP-NAE- glicerofoszfo-N-acil-etanolamin

ISH- in situ hibridizáció

IZ- intermediér zóna

LB- baktérium tápoldat (lysogeny broth)

LysoNAPE- lizofoszfatidil-etanolamin

MZ- marginális zóna

NAE- N-acil-etanolamin

NaOH- nátrium-hidroxid

NAPE- N-acil-foszfatidil-etanolamin

NAPE-PLD- N-acil-foszfatidil-etanolamin foszfolipáz D

NAT- N-acil transzferáz

PBS- foszfát pufferelt sóoldat

PBST- PBS+ 0,1 % Tween-20

PFA- paraformaldehid

SDS- nátrium dodecil szulfát (sodium lauryl sulfate)

SSCT- nárium-klorid/nátrium-citrát oldat (saline sodium citrate)+ 0,1% Tween-20

SVZ- szubventrikuláris zóna

TRIS-HCl- Trizma-hidroklorid

TRPV- tranziens receptor potenciál vanilloid 1 receptor

TUNEL- fragmentált DNS-t detektáló módszer (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)

VZ- ventrikuláris zóna

2. Összefoglaló

Az anandamid az elsőként felfedezett endokannabinoid molekula, amely számos élettani és kórélettani folyamatban játszik fontos szerepet. Ennek ellenére máig nem ismert, hogy milyen biokémiai útvonalakon és milyen élettani jelek hatására keletkezik az idegrendszerben. Az egyik potenciális szintézis útvonal résztvevője az eddig szinte ismeretlen *Abhd4* szerin-hidroláz lehet. Ezért először célul tűztük ki az *Abhd4* expresszió tér- és időbeli eloszlásának felderítését egér előagyban anatómiai módszerekkel, majd a kapott eredményekből származó, az enzim funkciójára vonatkozó hipotézist teszteltük *in utero elektroporáció* módszerét alkalmazva.

Az *Abhd4* mRNS eloszlását *in situ* hibridizációs technikával vizsgáltam és az *Abhd4* antiszensz ribopróba specificitását *Abhd4*^{-/-} knockout egerekből származó mintákon validáltam. Megállapítottam, hogy már az embrionális fejlődés 14. (E14) napján specifikus *Abhd4* expresszió figyelhető meg az előagy I-II. és III. kamrájának ventrikuláris zónájában. Az átmeneti zónában és a kortikális lemezen *Abhd4* mRNS-t nem detektáltam, míg az osztódó prekurzorokban megfigyelhető expresszió a születés után fokozatosan eltűnt. Erre a megfigyelésre alapozva *in utero elektroporáció* segítségével megvizsgáltam, hogy mi a következménye, ha meggátolom az *Abhd4* gén kikapcsolását a radiális migrációt kezdő sejtekben. Azt tapasztaltam, hogy az ektopikus *Abhd4*-et és EGFP-t termelő neuronok lekerekednek és a szubventrikuláris/átmeneti zónában maradnak. Ezzel szemben sem a kontrollként elkészített, inaktív hidroláz domain tartalmazó pontmutáns *Abhd4*, sem az EGFP önmagában nem befolyásolta a multipoláris neuroblasztok vándorlását az agykéreg II-III. rétegébe. Az *Abhd4*-gyel elektroporált területeken a sejthalált jelző, TUNEL pozitív sejtek száma megnőtt, ami valószínűsíti, hogy a migrációs defektusban szenvedő sejtek szelektíven eliminálódnak. Az *Abhd4*^{-/-} „knockout” állatok agykérgében ugyanakkor kvalitatív vagy kvantitatív eltéréseket eddig nem tapasztaltunk a vad típusú testvérállatok agykérgéhez képest.

Kísérleteink feltárták, hogy az *Abhd4* a kamrafal germinatív zónáiban expresszálódik. Itt olyan készenléti funkciót tölthet be, amelynek szerepe lehet az osztódásból származó utódsejtek minőség-ellenőrzés utáni eliminációjában, ezért kikapcsolása elengedhetetlen a programozott sejthalál elkerüléséhez a neuroblasztok radiális migrációjának kezdetén.

3. Bevezetés

3.1. Az endokannabinoid rendszer

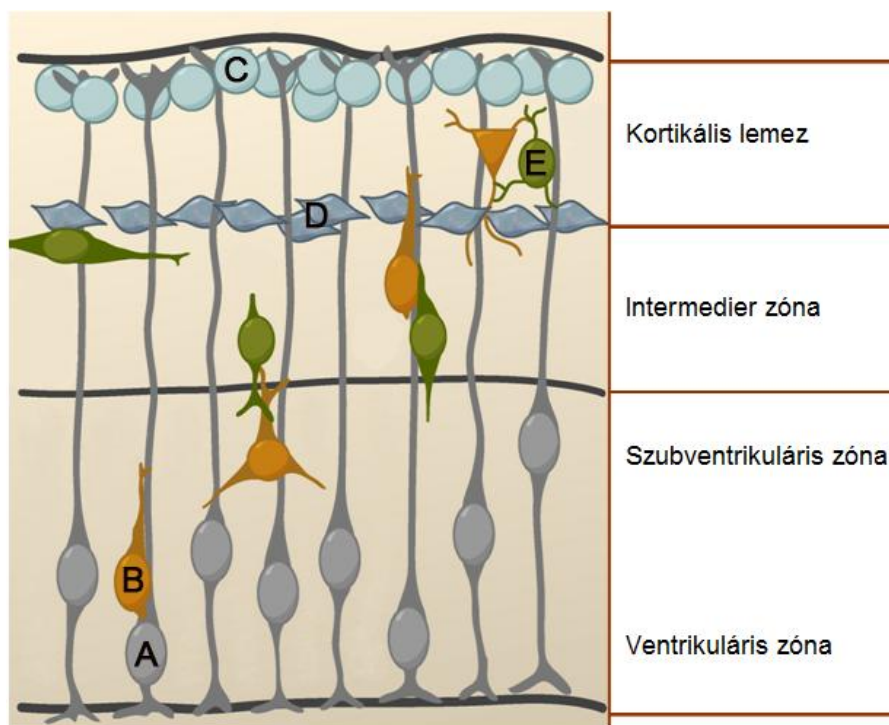
Az endokannabinoidok a szervezet által előállított, a vadkender növényben (*Cannabis sativa*) található pszichoaktív hatóanyaghoz, a Δ^9 -tetrahidro-kannabinolhoz hasonló molekulák. Idegrendszeri hatásaikat az 1-es típusú endokannabinoid receptorok (CB₁) közvetítik (Piomelli 2003), amelyekhez kapcsolódó ősi, általános jellegű jelpályának szerepe van a retrográd szinaptikus transzmisszió létrehozásában. A legkorábban felfedezett és legtöbbet vizsgált CB₁ receptor agonista az anandamid vagy más néven N-arachidonoil-etanolamid (AEA, Devane és mtsai. 1992). Felépítése alapján a többszörösen telítetlen N-acil-etanolaminok (NAE) közé tartozik, melyek a membránokban lévő N-acil-foszfatidil-etanolaminokból (NAPE) keletkeznek (Di Marzo és mtsai. 1994) egy kalcium-függő transzacyláz, N-acil-transzferáz (NAT) közreműködésével (Cadas és mtsai. 1997). Az elsőként felfedezett anyagcsere útvonalban a NAPE molekulákat egy a cink metalloproteázok közé tartozó N-acil-etanolaminokat hidrolizáló foszfolipáz D enzim (NAPE-PLD) bontja foszfatidsavra és NAE-kra (Okamoto és mtsai. 2004). A NAE-k az etanolaminhoz kapcsolódó acil csoportban különböznek, az anandamid esetében ez arachidonsav. A NAE-k lebontását a zsírsavamid hidroláz végzi (FAAH), mely etanolamidra és zsírsavszármazékra bontja az adott acil csoporttal rendelkező vegyületet (Cravatt és mtsai. 1996).

Az elmúlt években az endokannabinoidok fejlődő idegrendszerben való jelenlétük és funkciójuk megértése a kutatások középpontjává vált. Bizonyított, hogy az anandamid fontos szabályozó szerepet tölt be az idegsejtek proliferációjában és migrációjában (Mulder és mtsai. 2008).

3.2 Az endokannabinoidok jelenléte a fejlődő agykéregben

Az agykéregben helyet foglaló idegsejtek kialakulása bonyolult és összetett folyamat. Az embrionális fejlődés korai szakaszában a prosencephalikus agyhólyagból kialakuló előagy két részre különül, a palliumra és a subpalliumra. A pallium kezdetben egysejtrétegű neuroepithelium, melynek őssejtjei folyamatos szimmetrikus osztódással hozzák létre a már neuronok termelésére is képes radiális gliasejteket a ventrikuláris zónában (VZ) (Marín és mtsai. 2003). A radiális gliasejtek asszimmetrikus osztódásával keletkező neuronok radiális

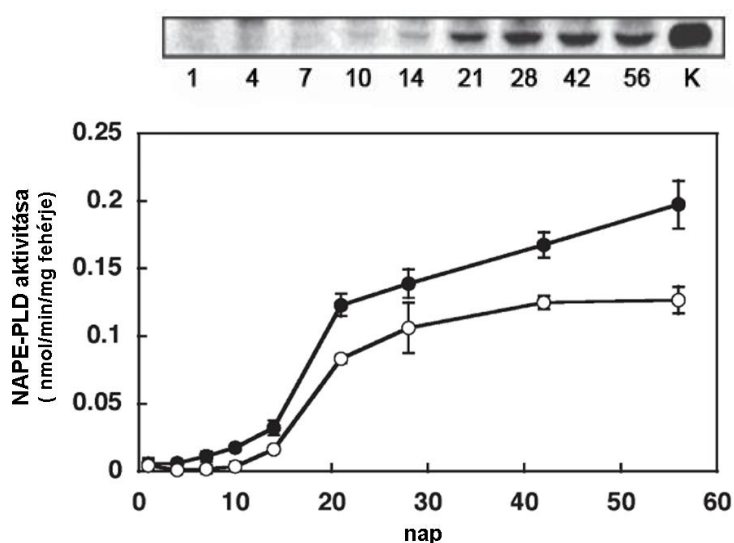
migrációval haladnak a piális felszín felé (1. ábra), majd cortex megfelelő rétegét elérve serkentő glutamaterg piramissejteké differenciálódnak (Ayala és mtsai. 2007). Az első neuroblasztok az embrionális fejlődés 11. napján hagyják el a ventrikuláris zónát, és a radiális gliasejteket segítségül használva a piális felszín felé vándorolnak, ahol létrehozzák az előlemezt (preplate, Huang 2009). A preplate piális felszín felé eső rétegében levő Cajal-Retzius sejtek a reelin nevű szignálfehérje kiválasztásával megakadályozzák a később érkező neuroblasztok tovább vándorlását, ezzel szétválasztva az előlemezt alsó lemezre (subplate) és marginális zónára (MZ). A reelin szignál az ezután következő migrációs hullámokkal érkező sejteket mindig megállásra készíti, így azok közvetlenül a MZ alatt fognak elhelyezkedni – így a neokortex fejlődése „inside out” sémát követ (Frotscher 2010). Az agykéreg különböző rétegeiben elhelyezkedő sejttypusokat specifikus markerek segítségével tudjuk nyomon követni, így az cortex II.-III. rétegében elhelyezkedő piramis sejteket pl. a Cux2 transzkripciós faktorról, míg a V.-VI. laminában lévő vetítő neuronokat pl. a Ctip2 transzkripciós faktorról detektálhatjuk (Leone és mtsai. 2008). Születés után a ventrikuláris zóna sejtjeinek aktív osztódása alábbhagy és a maradék radiális gliasejtek asztrocitává illetve oligodendrocitává alakulnak (Marín és mtsai. 2010).



1. ábra. A projekciós neuronok migrációja az agykéregbe

A piramissejtek különböző vándorlási fázisokon esnek át. A radiális glia sejtek (A) aszimmetrikus osztódása után (VZ-ben) a leendő projekciós neuronok (B) radiálisan az SVZ-ba migrálnak, ahol bipoláris sejtalakot vesznek fel és nyúlványt bocsájtanak a piális felszín felé. Miután megérkeznek a kortikális lemezbe multipoláris morfológiát mutatnak. C) Cajal-Retzius sejtek D) Subplate sejtjei E) Interneuron (Ayala és mtsai. 2007, módosítva).

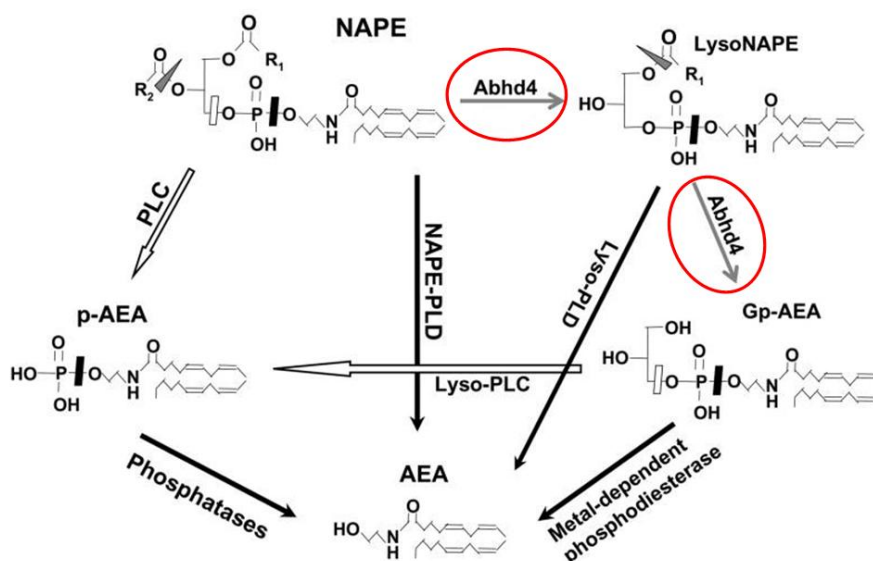
Bár bizonyított, hogy az anandamid már az embrionális fejlődés 10. napjától jelen van a fejlődő agyban (Psychoyos és mtsai. 2012), funkciójának molekuláris hátteréről keveset tudunk. Az anandamid potenciális lebontó enzimének, a FAAH-nak hiányában (*FAAH* $-/-$ állatokban) migrációs defektus figyelhető meg (Mulder és mtsai. 2008). Berghuis és munkatársai 2007-ben kimutatták, hogy az elsőként felfedezett anandamidot szintetizáló enzim a NAPE-PLD az embrionális fejlődés csak 18,5. napjától expresszálódik az agykéregben, enzimatis aktivitása pedig csak 10 napos (P10) kortól detektálható (2. ábra, Morishita és mtsai. 2005), így az anandamid embrionális korban való szintézisének pontos útvonala jelenleg nem ismert.



2. ábra. A NAPE-PLD enzimatis aktivitása különböző korú egerekben.

A két grafikon két különböző radioaktívan jelölt NAPE-PLD lebontási terméket mutat. A fekete körök esetében a keletkezett NAE-ban található acil csoport palmitoil, a fehér körök esetében pedig arachidonil. Látható hogy mindkét esetben a posztnatális kor 10. napjától válik aktívvá a NAPE-PLD. A felső kép a különböző korú egerekből készített homogenátumokon végzett western blot eredményét mutatja. Megfigyelhető, hogy az enzim megjelenése, szintjének alakulása és aktivitásának intenzitása jól korrelál.(K: kontroll, rekombináns NAPE-PLD, Morishita és mtsai. 2005, módosítva).

Azonban 2006-ban Cravatt és munkatársai által elkészített *NAPE-PLD* $-/-$ állatokban normál, a vad típusú állatokéhoz hasonló anandamid szintet detektáltak (Leung és mtsai. 2006), ami alternatív AEA-szintetizáló enzimek meglétére utal. Az ezt követő biokémiai vizsgálatok során számos újabb enzimet fedeztek fel, melyek a NAE-k szintézisében és eliminációjában vesznek részt (Simon és mtsai. 2006). Jelenlegi ismereteink szerint az anandamid bioszintézise felnőtt állatokban 4 különböző NAPE-PLD független útvonalon mehet végbe (3. ábra, Liu és mtsai. 2008), melyek egyikének hidrolizáló enzime az alfa-béta hidroláz 4 (Abhd4).



3. ábra. Az anandamid bioszintetikus útvonalai (Liu és mtsai. 2008, módosítva).

Az anandamid bioszintézise 5 különböző útvonalon történhet. Az egyik potenciális hidrolizáló enzim, az Abhd4 (piros körök), mely a NAPE molekuláról O-acil láncok lehasításával intermedier alakot képez (GP-AEA). A köztes terméket a GDE1 (metal-dependent phosphodiesterase) hidrolizálja anandamidra.

Az alfa-béta hidroláz 4 (Abhd4) 342 aminosavból felépülő, a szerin hidrolázok családjába tartozó B típusú NAPE lipáz, melynek szubsztrátjai egyszeresen, ill. többszörösen telítetlen N-acil-láncok. Az enzim katalitikus aktivitásáért a konzervatív hidroláz doménban elhelyezkedő a 146. pozícióban (*Mus musculus*-ban) lévő szerin felelős (Simon és mtsai. 2006). Az anandamid szintézise során az Abhd4 a NAPE-ről O-acil láncok eltávolításával intermedier alakokat hoz létre (N-acil-lizofoszfatidil-etanolamint (LysoNAPE) majd N-acil-glicerofoszfo-etanolamint (GP-NAE)) melyeket a glicerofoszfo-foszfodiészteráz 1 (GDE1) hidrolizál NAE-ra (anandamid) és glicerol-3-foszfátra (Simon és mtsai. 2008).

Mivel az anandamid elsőként felfedezett szintetizáló enzime, a NAPE-PLD embrionális korban még nem rendelkezik enzimatis aktivitással ezért feltételezzük, hogy az AEA egyik potenciális hidrolizáló enzime, az Abhd4 töltheti be ezt a funkciót a fejlődő agykéregben.

4. Célkitűzések

Annak ellenére, hogy az anandamid korai jelenléte bizonyított, embrionális agyban való szintézisééről nem áll rendelkezésünkre információ. Kísérleteink során célul tűztük ki:

- Az *Abhd4* mRNS expresszió időbeli és térbeli eloszlásának vizsgálatát az egér előagyának fejlődése során.
- Az *Abhd4*-nek az agykéreg fejlődésében betöltött szerepének vizsgálatát funkcióvesztéses (génkiütött állatok vizsgálata) és funkciónyeréses (in utero elektroporáció) módszerek alkalmazásával.

5. Anyagok és módszerek

- **Felhasznált egértörzsek**

Az in situ hibridizációs kísérleteinkhez C57BL/6 egértörzset, valamint egy alomból származó *Abhd4* ^{-/-} génkiütött egereket (Benjamin Cravatt, LA Jolla, USA), az in utero elektroporációhoz CD1 egereket használtunk (Charles River, Németország).

- **Minták előkészítése (ISH-hoz)**

A vemhes nőstényeket Avertinnel (250mg/kg) elaltattam. Az egérembriókat (különböző korú E14-18) a méhből eltávolítottam, dekapitációt követően agyukat kipreparáltam a koponyából, és 4%PFA/PBS oldatban fixáltam egy éjszakán át. A felnőtt korú egyedeket intrakardiális perfúzióval fixáltam. Az egereket intraperitoneálisan beadott, 250 mg/ttkg dózisú Avertin injekcióval elaltattam, majd feltártam a mellüregüket. A szív jobb pitvarát felnyitottam, miközben a bal kamrába 0,1 M PB-t injektáltam, amíg a máj el nem veszítette bordó színét, ami a cardiovascularis rendszer átmosását jelzi. Ezután 100 ml 4%PFA-t juttattam a szíven át az érhalózatba és azon át a szövetekbe perfundáló pumpával. Dekapitációt követően az agyat kipreparáltam, és 4%-os PFA oldatban utófixáltam egy éjszakán át.

- **Vibratomos metszés**

A fixált egéragykból Leica VT 1000S típusú vibratommal 40 µm-es agymetszeteket készítettem, amelyeket a felhasználásig 1 M PBS oldatban tároltam 4 °C fokon (maximum 2 hétig).

- **Fagyasztott metszetek készítése**

Az előzetesen fixált embrió agyakat krioprotekció céljából 15% (1 órán át) majd 30%-os szacharóz/PBS oldatban tartottam. Az agyakat Tissue-TEK OCT-be (Sakura Scientific kat.

szám: 4583) ágyaztam és 20 µm vastag metszeteket készítettem MICROM HM 550 típusú kriosztáton -21 °C-on, amiket Ultrafrost Plus tárgylemezekre (Thermo Scientific) húztam fel.

- **Abhd4 cDNS előállítása: PCR reakció**

Az *Abhd4* cDNS szintetizálásához szükséges mRNS-t, egér agy homogenizálását követően nyertem ki, majd RT-PCR-rel a következő primerek segítségével szintetizáltam meg:

Forward primer: 5'-CGGCAGGGCTTGTTTACTATGGCTG-3'

Reverse primer: 5'-AGAGGGCGGTACAGAGATAACTCCG-3'

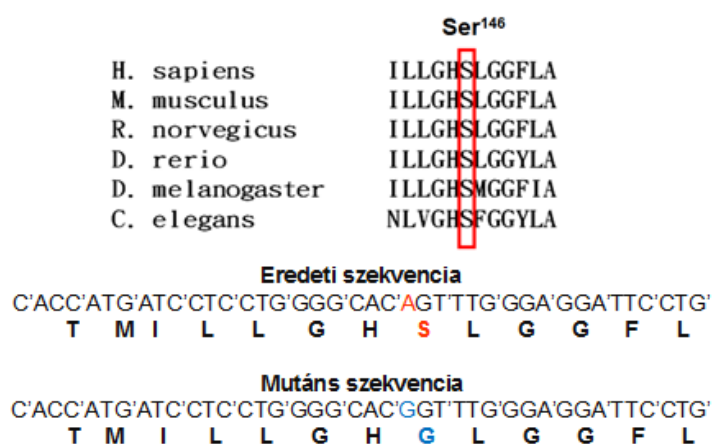
RT-PCR program: 95°C - 3 perc, 95°C - 30s, 55°C - 30s, 72°C - 45s, 72°C - 7 perc. A 2-4 lépések 32-szer ismétlődtek. Az így kapott 418 bp hosszúságú szekvenciát pGEMT vektorba klónoztam (Promega T-Easy Kit).

- **In situ hibridizáció - próbaszintézis**

Az mRNS próbákat a laborban előzetesen megklónozott *Ctip2-pGEMT*, *Cux2-pGEMT* és *Glast1-pGEMT*, illetve az *Abhd4-pGEMT* plazmidokból szintetizáltam. Ehhez 20µg plazmidot NdeI vagy NcoI restrikciós enzimmel linearizáltam, majd a lineáris templátot GeneJET Gel Extraction Kit-tel (Thermo kat. szám: #KO691) a gyártó által javasolt recept szerint izoláltam. Ezután Roche DIG RNA labelling kit (katszám.11093274910) felhasználásával SP6 (NcoI-gyel linearizált templát esetében), illetve T7 (NdeI-gyel linearizált templát esetében) RNS polimerázzal RNS-t szintetizáltam 37 °C-os vízfürdőben 2 órán keresztül. A mintákat RNáz mentes DNázzal való, szintén 37 °C-os vízfürdőben történő 30 perces emésztés követően RNA Clean & Concentration 5 kit (Zymo Research kat.szám: R1015) alkalmazásával nyertem ki a DNS mentes RNS-t. A 4% PFA-ban fixált szabadon úszó metszeteket PBST-vel (PBS + 0,1% Tween20) kimostam (3x10 perc), majd egy éjszakán át 65°C-on hibridizáltam a szensz vagy antiszensz RNS próbával hibridizációs pufferben (50%-os formamid, 5X SSC, 0,1% Tween, 100 ng/µl tRNS). A hibridizációt követően a mintákat intenzíven mostam csökkenő formamid tartalmú, illetve sótartalmú oldatsoron (50%formamid-2X SSCT, 2X SSCT, 0,2X SSCT, PBST) majd 2mg/ml-es BSA, 2%-os FBS/PBST-ben (0,1%Tween/PBS) blokkoltam két órán át szobahőmérsékleten. Ezután a metszeteket alkalikus-foszfátáz enzimmel konjugált anti-digoxigenin antitesttel inkubáltam egy éjszakán át 4 fokon. A reakciót intenzív PBS-es (5x20 perc) és TBS-es (2x10perc) mosás után 5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfát (BCIP) és nitrokék-tetrazoliumklorid kromogének elegyével hívtam elő foszfátmentes TBS pufferben. Majd a reakció leállítása és alapos mosása után a metszeteket tárgylemezre helyeztem és Aqua Poly/Mount (Polyscience Inc. kat.szám:18606) fedőanyagban fedőlemezzel lefedtem. A metszeteket Nikon Eclipse 80i mikroszkóppal vizsgáltam és fotóztam le.

- **Konstrukciók előállítása**

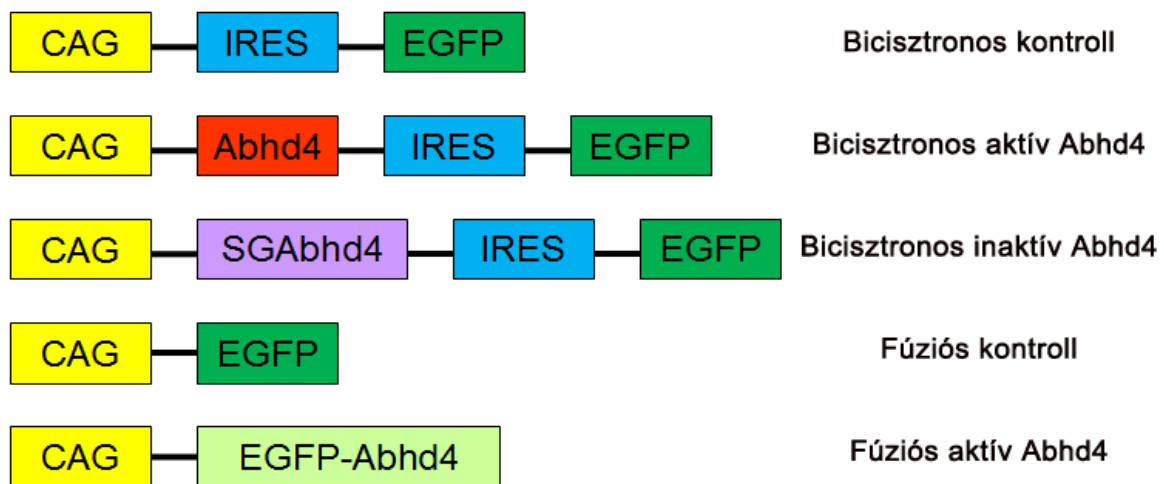
Témavezetőm, Dr. Lele Zsolt segítségével, Connie Cepko és munkatársai által létrehozott (Matsuda és mtsai. 2004) és az Add Gene-től megvásárolt pCAG-GFP, pCAGIG és pCAGEN plazmidokat használtuk. Egy előzőleg már a laborunkban elkészített (Dr. Ludányi Anikó által) teljes hosszúságú *Abhd4* cDNS-t, illetve az *Abhd4* N-terminálisán GFP-vel kapcsolt változatát illesztettük a megfelelő vektorokba (5. ábra). Ezután a QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) segítségével, a kit által javasolt recept szerint pont mutációval a konzervatív hidroláz doménben található, az enzim katalitikus aktivitásáért felelős szerint (Ser¹⁴⁶) glicinre cseréltük (4. ábra). Szekvenálást követően az *aktív Abhd4*-hez hasonlóan lett az expressziós vektorba klónozva (Dr. Lele Zsolt munkája).



4. ábra. Az *Abhd4* hidroláz doménjában található törzsfajlódás során konzervált szerin, és az enzim általunk készített mutációja.

A piros keretben látható a szerin hidrolázok hidroláz doménjében található katalitikus aktivitásért felelős konzervatív szerin. Az általunk elkészített mutáns szekvenciában a 146. pontban található szerint (S) glicinre (G) cseréltük.

Az elektroporációhoz szükséges nagy mennyiségű és tisztaságú DNS-t a Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kit-ével izoláltuk a gyártó által javasolt protokoll szerint. A tisztaság növelése érdekében a DNS-t újra kicsaptam 2-propanollal és 0,3M-os nátrium-acetáttal. Az endotoxinmentes vízben felvett DNS oldat koncentrációját és tisztaságát spektrofotométerrel (Eppendorf BioPhotometer) mértük meg. Ezután 0,01% Fastgreen vitális festék hozzáadásával színeztük a DNS oldatot, hogy az nyomon követhető legyen az injektálás során.

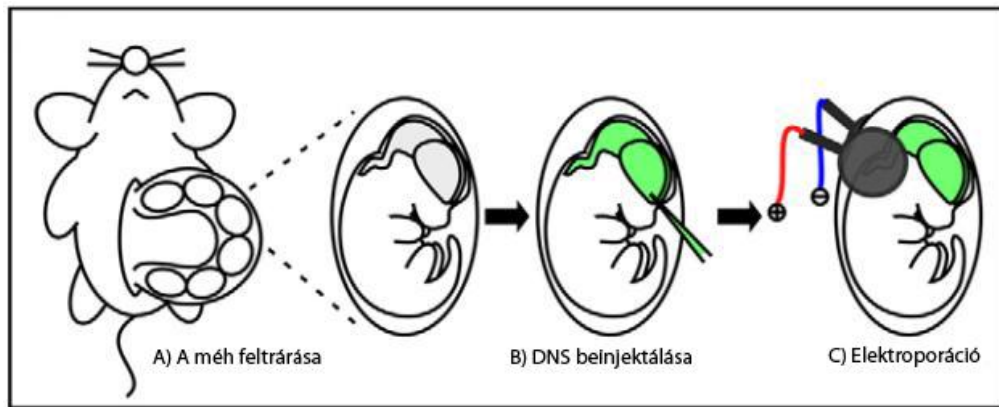


5. ábra. In utero elektroporáció során felhasznált vektorok.

2 bicisztronos és 1 fúziós konstrukciót készítettünk el. A bicisztronos vektorokról az Abhd ill. a GFP 2 külön fehérjeként íródik át, míg a fúziós konstrukció esetében egy proteinként.

- In utero elektroporáció (szomatikus géntranszfer)**

A 14,5 napos embriókat tartalmazó vemhes állatot Avertinnel (250mg/kg) elaltattam, majd a hasüreg parasagittális metszéssel történő feltárását követően kiemeltém a méhet (6. ábra/A). Ezt követően az agy előagyi kamrájába injektáltam nagyjából 1µl, Fastgreen-nel megfestett DNS oldatot egy üveg kapilláris felhasználásával (6. ábra/B). Egy perc elteltével az embrió fejét csipesz-típusú elektródok közé helyeztem, úgy, hogy a pozitív pólus az injektált féltekén legyen. Egy Supertech elektroporátor berendezés segítségével öt, 50 ms időtartamú, 50 V feszültségű egyenáramú négyszögimpulzust adtam 1 Hz frekvenciával 950 msec követési idővel (6. ábra/C). Ezután, visszahelyeztem a méhet a hasüregbe, hogy lehetővé tegyem az embriók további fejlődését. A műtét nem tartott tovább 30 percnél. A túlélési idő elteltével a vemhes állatot Avertinnel (250mg/kg) túlaltattam, az embriókat pedig eltávolítottam és dekapitációt követően fejüket 4 %-os PFA oldatban fixáltam egy éjszakán át, majd vibratómmal 40 µm vastag, míg kriosztáttal 20 µm vastag metszeteket készítettem. Hosszú távú vizsgálat céljából bizonyos állatokat 1, 7, 14 napos korig az anyával hagytam, majd az agyukat intracardialis perfúziót követően eltávolítottam a koponyából, végül 40µm vastag metszeteket készítettem belőlük.



6. ábra. Az elektroporáció menetének sematikus rajza. (Okada és mtsai. 2007, módosítva).

- **Sejthalál vizsgálata**

Az elektroporált, majd kriosztáttal metszett agyszeleteken ApopTag Red In Situ Apoptosis Detection Kit-tel (Millipore kat.szám:S7165) a gyártó által javasolt procedúra szerint TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) metodikával, immunfluoreszcenciával festettük meg a fragmentált DNS-el rendelkező sejteket.

- **Konfokális mikroszkópia**

Az elektroporált agyak vibratómmal készített metszetein a GFP+ sejteket tárgylemezre való helyezésük után DAPI-t tartalmazó (1 μ l :2000 μ l hígítva) 50%-os glicerol-PBS oldattal fedtük le. 10x nagyítással, 5 μ m-enkénti mintavételezéssel és 60x nagyítással 0,5 μ m-enkénti mintavételezéssel 30 μ m vastagságú metszetekből készítettem projekciós képet NIKON A1R konfokális mikroszkóppal.

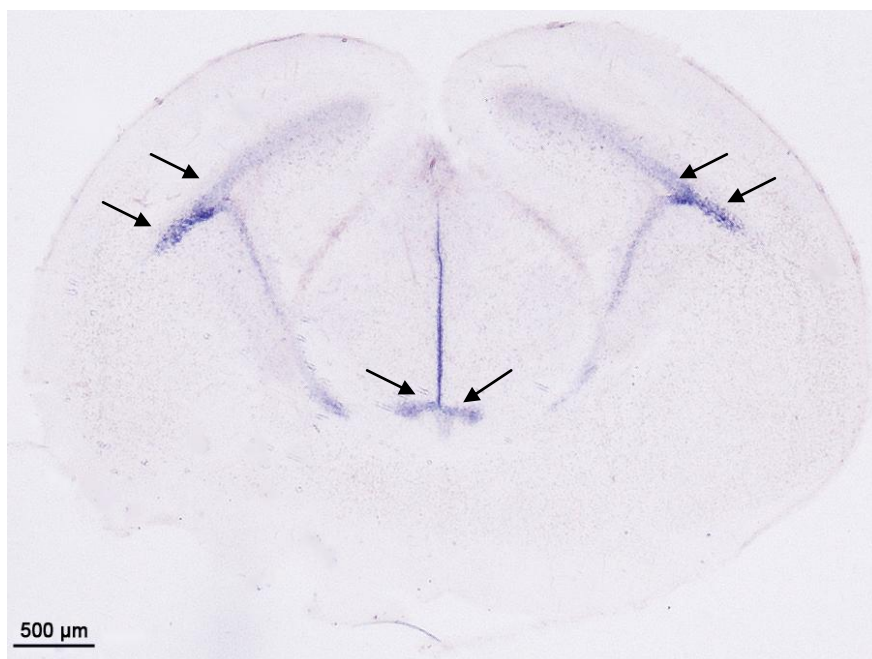
- **Statisztikai analízis**

A jelölt sejtek számát MacBiophotonics ImageJ program segítségével határoztam meg, majd a StatSoft STATISTICA 9 programmal készítettem a statisztikai analíziseket. A GFP+ sejtek számát a képek 5 egyforma horizontális kvadrátra való felosztásával kvantifikáltam, az eloszlást az egyes rétegekre jutó összes sejtszámra vonatkoztatott %-os adattal mutattam ki (az általam kialakított rétegek nem azonosak kortex anatómiai rétegeivel). A sejthalállal kapcsolatos statisztika első lépéseként az egyes területeken leszámolt TUNEL pozitív sejtek számából Kolmogorov-Smirnov tesztet végeztem, mellyel megvizsgáltam, hogy a kapott értékek normális eloszlásúak-e. Mivel az értékeim nem követték a normális eloszlást, ezért a 3 kiszámolt csoportra (Abhd4-gyel elektroporált és a két kontroll) nem-parametrikus Kruskal-Wallis és a hozzá tartozó posthoc (Multiple Comparisons test) tesztet alkalmaztam.

6. Eredmények

6.1. *Abhd4* expressziójának vizsgálata a fejlődő idegrendszerben

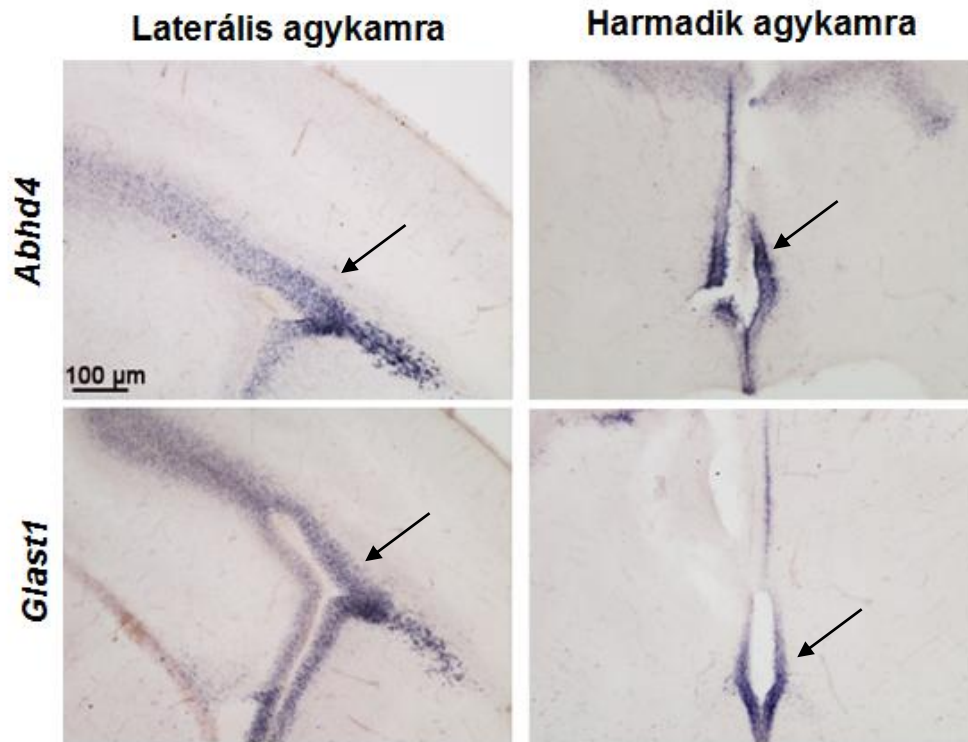
Az *Abhd4* mRNS anatómiai eloszlásának felderítésére különböző korú vad típusú egerek agyából készült metszeteken in situ hibridizációt végeztem. 16 napos embrionális korban specifikus *Abhd4* expresszió figyelhető meg az előagy I.-II. és III. agykamrájának ventrikuláris zónájában, ami különösen erős a pallium-subpallium határán (7. ábra).



7. ábra. *Abhd4* mRNS eloszlása embrionális fejlődés 16. napján.

A nyilak a 16 napos egér embrió laterális illetve a harmadik agykamráinak ventrikuláris zónájában megjelenő *Abhd4* expressziót mutatja (n=5 állat).

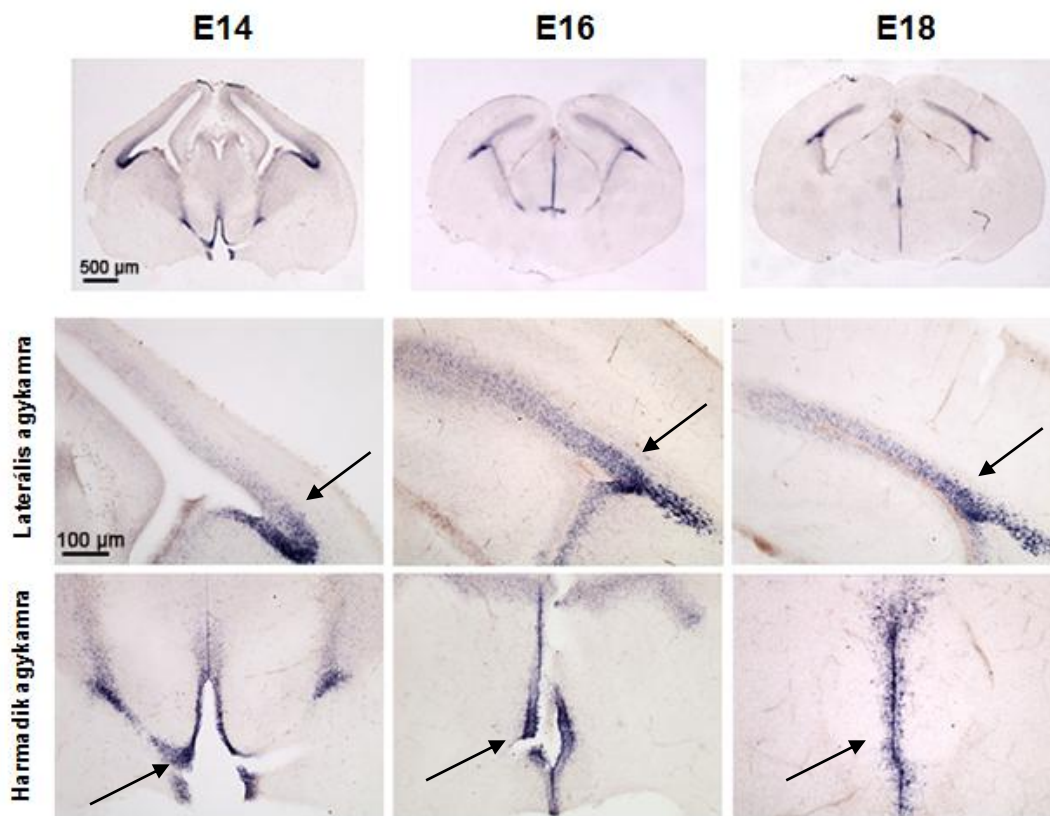
Ezután megvizsgáltam, hogy az *Abhd4* expresszió valóban a germinatív rétegben van-e, ezért az ott elhelyezkedő radiális glia sejtekre specifikus marker, a *Glast1* felhasználásával in situ hibridizációt készítettem (8. ábra). A két mRNS mintázata nagyfokú hasonlóságot mutat, ami arra utal, hogy az *Abhd4* mRNS valóban a ventrikuláris zónában, a radiális glia sejtek rétegben található meg.



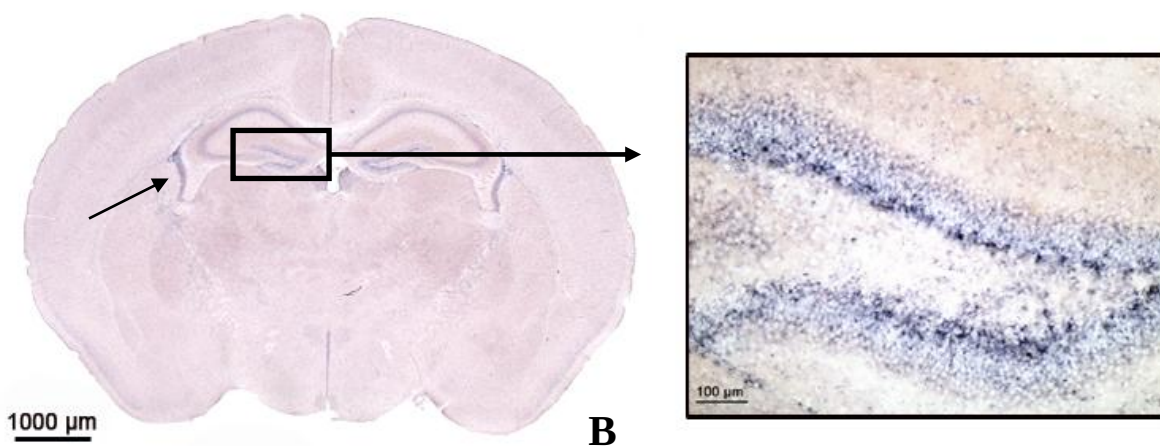
8. ábra. Az *Abhd4* és a *Glast1* ISH-val jelölt sejtek eloszlása E16 egéragyban.

Az ábrán látható hogy a két mRNS eloszlása nagyfokú hasonlóságot mutat (nyilak), ami arra enged következtetni hogy az *Abhd4* valóban a ventrikuláris zónában található meg (n=5 állat).

Kísérleteinket kiterjesztettük különböző korú embrionális egerek agymetszeteire, melyeken az E16 korban megjelenő specifikus ventrikuláris zónai *Abhd4* expresszióhoz nagyon hasonlót tapasztaltam (9./A ábra). Azonban születés után ez specifikus expresszió lecsökken, csak a telencephalon szubventrikuláris zónájának és a gyrus dentatus osztódó sejtjeinek területére korlátozódik (9./B ábra).



A



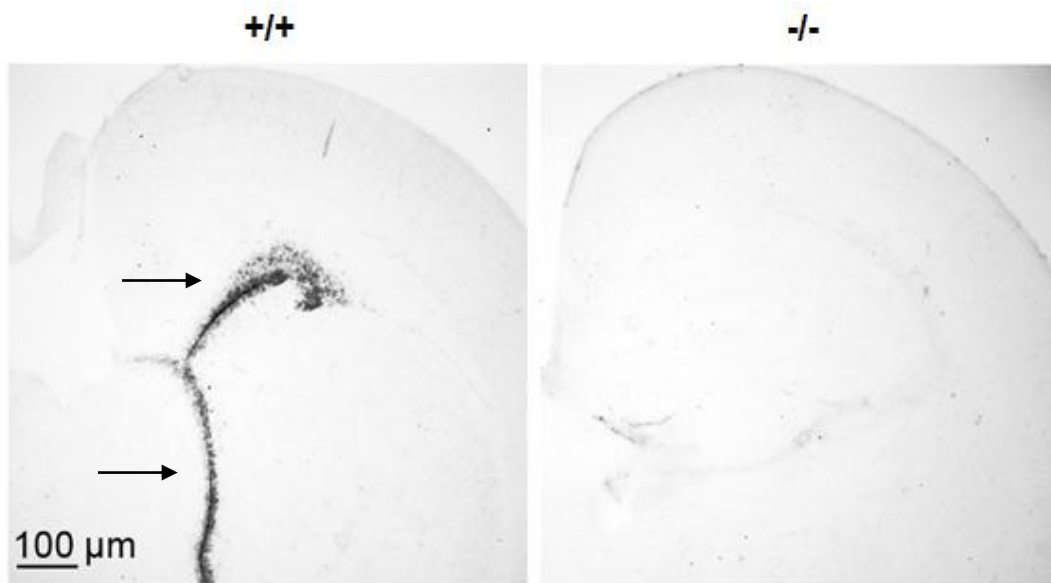
B

9. ábra. Abhd4 in situ hibridizáció különböző korú egér agymetszeteken.

Az *Abhd4* specifikus ventrikuláris zóna expressziót mutat az embrionális fejlődés során (A, nyilak, n=4 állat), majd ez a mintázat a posztnatális korú állatokban a gyrus dentatus osztódó sejtjeire (B ábra, fekete keret) és a telencehalon szubventrikuláris zónjára korlátozódik (B ábra, nyilak, n= 5 állat).

6.2. *Abhd4* KO egerek vizsgálata

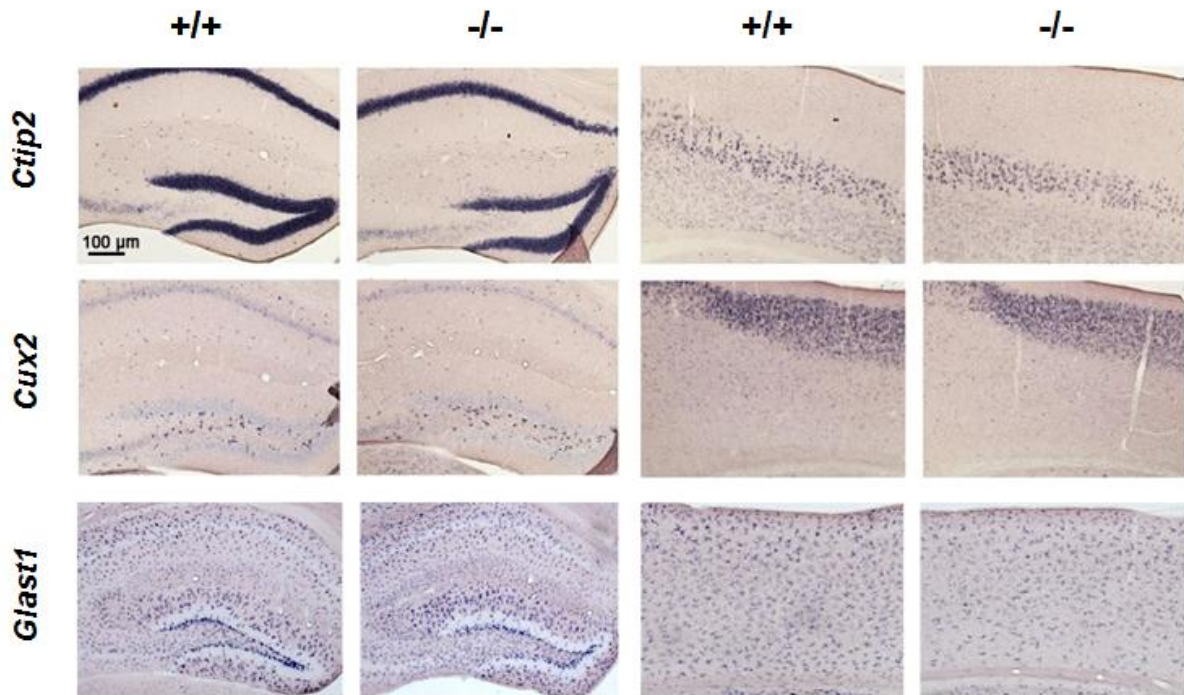
ISH vizsgálataimat a kollaborátorunk, Benjamin Cravatt (La Jolla, USA) által biztosított *Abhd4* géniütiött állatokon folytattam. Először az előzőekben felhasznált ribopróbát validáltam a KO állatok agyából készült metszeteken. Az antiszensz ribopróbák használatával kimutattam, hogy a szensz riborópához hasonlóan az *Abhd4* $-/-$ állatok metszetein nem detektálható *Abhd4* mRNS, így a felhasznált *Abhd4* ribopróba valóban az *Abhd4* mRNS-ét ismeri fel (10. ábra).



10. ábra. E16 vad típusú és KO egerek agyszeletein detektált *Abhd4* mRNS eloszlása.

Szemben az *Abhd4* $-/-$ állatok agymetszeteivel, a vad típusú (+/+) állatok agymetszetein jól detektálható az *Abhd4* mRNS (nyilak, n= 3 állat).

Az embrionális fejlődés során a radiális glia sejtek elengedhetetlenek az agykéreg normális kialakulásához. Szerepük van az utódsejtek létrehozásában, a differenciáció elindításában, a sejtek migrációjában, valamint az agykéreg rétegződésében (Marín és mtsai. 2003). Ezért az agykéreg germinatív zónájában megfigyelt specifikus *Abhd4* expressziót követően az agykérgi rétegekben elhelyezkedő sejtekre specifikus ISH markerek segítségével megvizsgáltam a felnőtt korú *Abhd4* $-/-$ állatok kortexét (11. ábra). A kísérletek azonban semmilyen rétegződési defektust nem mutattak ki sem a neokortexben, sem a hippocampusban.



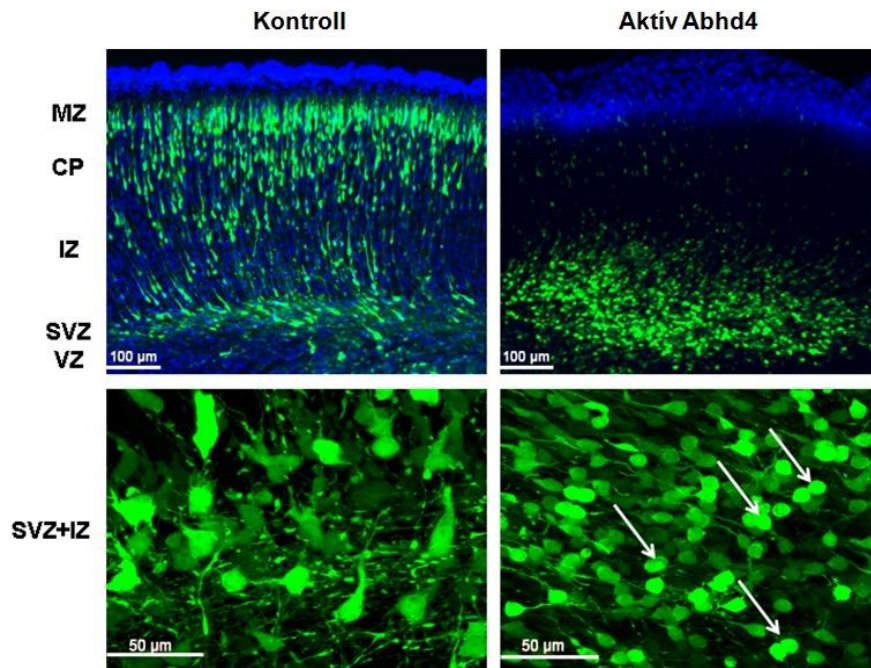
11. ábra. *Abhd4* $-/-$ állat agykérgének vizsgálata az adott rétegekre jellemző markerekkel.

Semmilyen szerkezeti defektus nem látható, mind a II.-III. (*Cux2*) illetve V.-VI. (*Ctip2*) agykérgi réteg ép, valamint az asztrocitákra jellemző *Glast1* ISH sem mutat különbséget a vad és a KO típusú egerek agymetszetei között. (n=4 állat).

6.3. Az *Abhd4* funkciójának vizsgálata a fejlődő idegrendszerben

Mivel az *Abhd4* $-/-$ egerek agymetszetein végzett kísérletek során nem tapasztaltam semmilyen elváltozást, ezért két hipotézist állítottunk fel. Elképzelhető, hogy a genetikai homeosztázis jelenségéből kifolyólag az *Abhd4* enzimatisz szerepét egy másik enzim vette át, és ezért nem tapasztaltam változást a vad típusú egerek metszetein végzett ISH kísérleteimhez képest. Ennek vizsgálatára létrehoztunk egy *Abhd4*/*NAPE-PLD* kettős mutáns egértörzset (Dr. Lele Zsolt munkája), melynek vizsgálata jelenleg is folyik. A másik lehetőség, hogy az *Abhd4* egy készenléti funkciót betöltő enzim, mely csak egy megfelelő élettani szignál hatására válik aktívvá és fejti ki enzimatisz hatását. Felnőtt korú állatok agymetszetein készített *Abhd4* in situ hibridizáció során nem detektáltunk *Abhd4* pozitív sejteket. Ezért eddigi eredményeink alapján, arra kerestük a választ, hogy mi történik a neuroblasztokkal (melyekben normális esetben nem detektálható az *Abhd4*), ha a ventrikuláris zónát elhagyva is megmarad bennük az *Abhd4* expresszió. Ehhez in utero elektroporációval a *bicisztronos* aktív *Abhd4*-et tartalmazó illetve a *bicisztronos* kontroll konstrukciókat juttattam be E14 egér embrióba, a laterális agykamra ventrikuláris zónájának radiális glia sejtjeibe (6.

ábra). Először az *EGFP* kontroll konstrukciót injektáltam az embriók agyába, annak bizonyítására, hogy az idegen DNS önmagában nem okoz semmilyen károsodást az agykéreg fejlődése során. Három nappal a műtét után az embriók agymetszeteiről konfokális mikroszkóppal készített felvételeken látható, hogy az irodalomban szereplő adatoknak megfelelően a kérgi piramis sejtek kivándorolnak a ventrikuláris zónából az agykéreg II.-III. rétegébe, ahol később felveszik a piramis sejtekre jellemző multipoláris morfológiát (12. ábra).



12. ábra. E 14,5 napos korban *EGFP* kontroll és a *bicisztronos* aktív *Abhd4* konstrukciókkal történő elektroporáció eredménye.

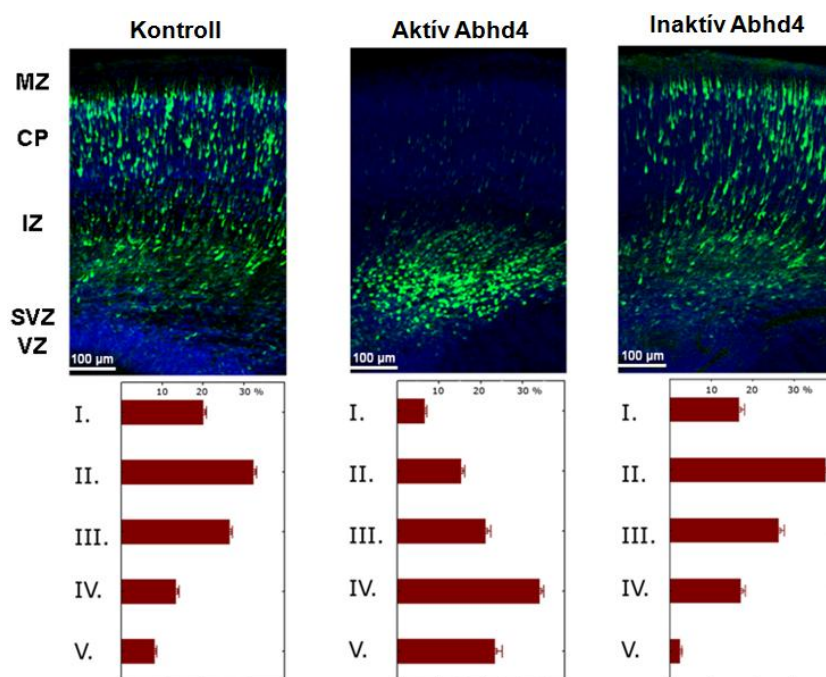
E14,5 napos embrió ventrikuláris zónájában megjelölt GFP pozitív sejtek nagy része 17,5 napos korára eléri az agykéreg megfelelő (II-III.) rétegeit. Ezzel szemben az *Abhd4* túltermeltetés hatására nem képesek a sejtek felvándorolni az agykéreg II.-III. rétegébe, megragadnak az SVZ+IZ-ban, ahol már E17,5-ben a fiziológiás állapottól eltérő, lekerekedett sejt morfológia figyelhető meg (n= 4 állat)

Ezzel szemben a *bicisztronos* aktív *Abhd4*-el történő elektroporációt követően az agykérgi neuroblasztok viselkedése eltér a normál, fiziológiásan tapasztaltaktól. Azoknak a sejteknek az utódai, melyek az elektroporáció során felvették az *Abhd4*-t tartalmazó konstrukciót nagy valószínűséggel az intermedier zónában maradnak, ahol a normálistól eltérő, lekerekedett sejt morfológiát mutatnak (12. ábra).

Azt bizonyítandó, hogy az *Abhd4* enzimatis aktivitása okozza a megfigyelt migrációs defektust, létrehoztunk egy mutáns *Abhd4* konstrukciót, melyben elimináltuk az enzim hidroláz aktivitását (Dr. Lele Zsolt munkája). Az enzim hidroláz doménjának katalitikus aktivitásáért felelős szerint (Ser¹⁴⁶) pont mutációval glicinre cseréltük. A *bicisztronos* inaktív

Abhd4 semmilyen defektust nem okoz a kérgi piramisisejtek vándorlásában (13. ábra). Ezen eredmények alapján kijelenthető, hogy az *Abhd4* enzimatis hatása felelős a migrációs defektusért.

Kvalitatív megfigyeléseimet kvantitatív eloszlás vizsgálatokkal támasztottam alá (13. ábra).



13. ábra. Elektroporált sejtek eloszlása az agykéregben.

A római számok 5 egységes méretű kvadrátot jelölnek, nem a kortex rétegeit jelentik. A bicisztronos *kontroll* elektroporáció: n=19 (9 embrióból, 4 különböző vemhes nőstény). A bicisztronos *aktív Abhd4* elektroporáció: n=23, (9 embrióból, 5 különböző vemhes nőstény). *Bicisztronos inaktív Abhd4* elektroporáció: n=5 (4 embrióból, 3 különböző vemhes nőstény).

6.4. *Abhd4* migrációs defektus hosszú távú vizsgálata

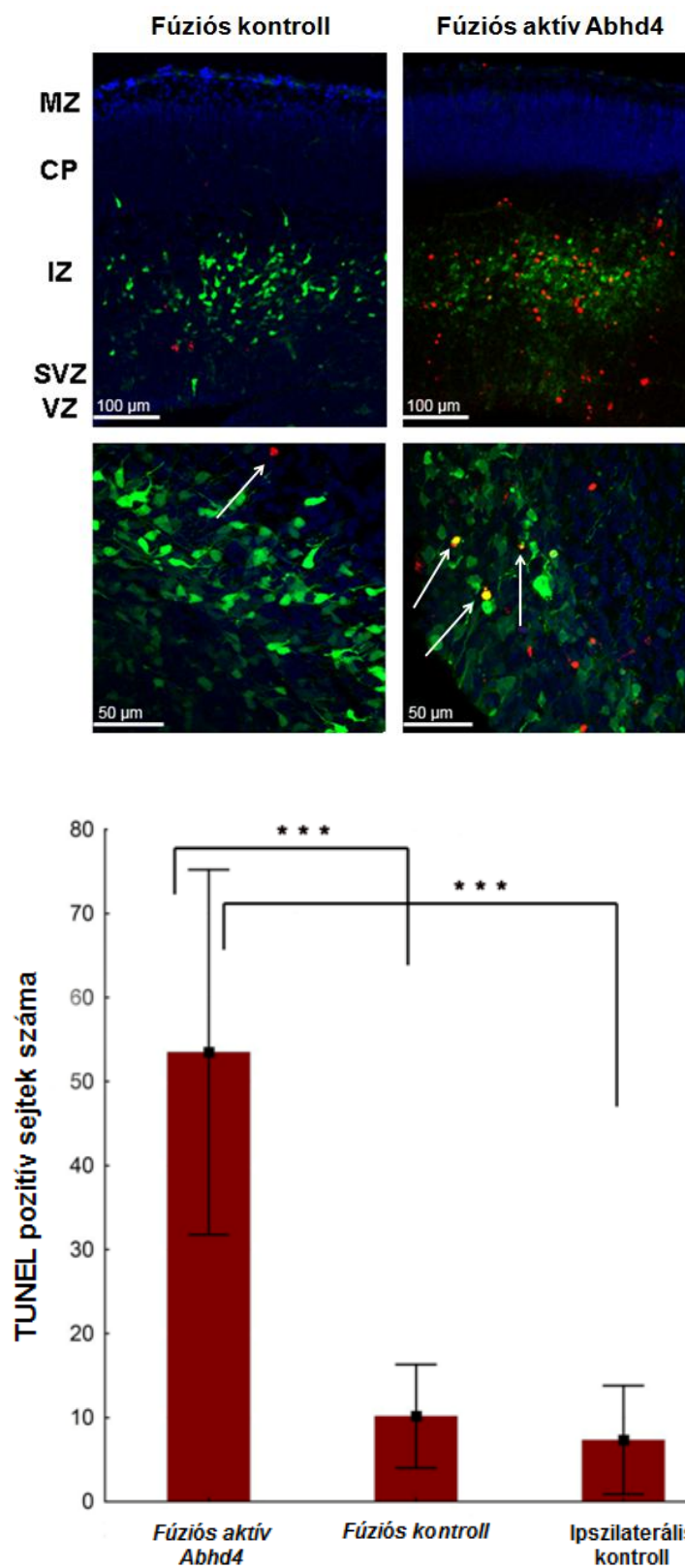
A következő kísérleteinkben az *Abhd4* túltermeltetés hatására kialakuló migrációs defektus hatását vizsgáltuk az agykéreg további fejlődésében. Azért, hogy felderítsük, tartós vagy átmeneti migrációs problémával küzdenek-e a sejtek, a migrációs defektus hosszú távú hatását vizsgáltam. Meglepetésünkre *abicisztronos aktív Abhd4-el* elektroporált sejtek P3-as korukra elérték a kortex megfelelő rétegét, ahol P14 korú állatokban semmilyen defektust nem tapasztaltam. Elképzelhető, hogy a sejtek szelektíven eliminálták a termelt *Abhd4* fehérjét és az inert GFP-t még mindig expresszálva, megkésve bár, de felvándoroltak az agykéreg II. és III. rétegébe. Ennek tesztelésére, egy GFP-*Abhd4* fúziós fehérjét kódoló konstrukciót készítettünk ugyanazokkal a reguláló szekvenciákkal ellátva, mint amik a *pCAGIG* vektorban vannak. A *fúziós aktív Abhd4-el* történő elektroporálás után három nappal

az elektroporált sejtek nem tudtak kilépni az átmeneti zóna sejtrétegéből. Ezután az elektroporált állatokat E18, P1, P7 és P14 napos korukig hagytam fejlődni. 3 különböző 18,5 napos embriókat tartalmazó vemhes nőstény embrióin végzett elektroporációt követően 17 embrióból 1 embrió agymetszetein még láthatóak voltak a VZ-ban ragadt GFP pozitív sejtek, azonban az ennél idősebb állatokban ez az expresszió eltűnt. Ezzel szemben a *kontroll* elektroporációt követően a jelölt sejtek akár 3 hét után is nyomon követhetőek voltak. A *fúziós Abhd4*-et használva az EGFP jel teljes eltűnése arra utal, hogy: 1. a neuroblasztok aktívan degradálják az ektopikus Abhd4-et, vagy 2. a sejtek szelektíven eliminálódnak.

6.5. Abhd4 túltermeltetés hatására kialakuló sejthalál

Eddig eredményeink azt mutatták, hogy az Abhd4 túltermeltetés hatására migrációs defektus alakul ki, mely során a sejtek a normális, fiziológias állapottal ellentétben, elvesztik multipoláris morfológiájukat. Ez a lekerekített sejtfforma általában a sejthalálban szenvedő sejtek jellemzője. Így azt megállapítandó, hogy a migrációban megtorpanó sejtek többségének mi lesz a sorsa sejthalálra utaló, fragmentált DNS-t detektáló TUNEL tesztet végeztünk. A 14. ábrán jól látható, hogy a *fúziós aktív Abhd4* bejuttatása után a TUNEL – pozitív sejtek száma jelentősen megnőtt, a *fúziós kontroll* konstrukcióval elektroporált állatokéhoz képest.

A TUNEL adatok statisztikai vizsgálata során a csak GFP-vel elektroporált kortexeken kívül (14. ábra), az elektroporált területek mellett lévő (ipszilaterális) *fúziós aktív Abhd4* vektort nem tartalmazó, illetve a kontralaterális agyfélteke kortextrégiókat is felhasználtam kontrollként. A 14. ábrán látható, hogy a *fúziós aktív Abhd4*-et tartalmazó területeken szignifikánsan nagyobb a fragmentált DNS-t tartalmazó sejtek száma, mint a kontroll csoportoknál. A Kruskal-Wallis teszttel kapott p érték: 0,0027. Az egyes csoportok közti p értékek: *fúziós aktív Abhd4* és a *GFP-kontroll* között 0,0028, míg a *fúziós aktív Abhd4* és az ipszi- és kontralaterális nem elektroporált területeken számolt TUNEL – pozitív sejtek között 0,004.



14. ábra. Az elektroporációt követő TUNEL teszt és annak statisztikai analízise.

Az elektroporációt követően elvégzett TUNEL teszt során láthatóvá válik fokozott DNS fragmentáció, ami a pusztuló sejtek sajátja (nyílak). A TUNEL pozitív sejtek számából készített statisztikai analízis is jól szemlélteti az Abhd4 és a kontroll csoportok közti sejthalálbeli különbségeket (n=5 állat).

7. Megbeszélés

Az endokannabinoidok korai idegfejlődésben betöltött szerepének feltárása napjaink egyik legkutatottabb területe. Mulder és kollégái mutatták meg, hogy a valószínűleg anandamid-függő endokannabinoid szignáltranszdukció serkenti a neuroblasztok radiális migrációját (Mulder és mtsai. 2008). Azonban az anandamid embrionális korban való szintéziséről nem áll rendelkezésünkre információ. Mivel elsőként felfedezett szintetizáló enzime, a NAPE-PLD embrionális korban még inaktív (Morishita és mtsai. 2005), egy másik enzimnek kell betöltenie ezt a funkciót.

Munkám során megmutattam, hogy az *Abhd4* specifikus expressziót mutat a fejlődő előagykéreg ventrikuláris zónájában. Funkciónyeréses kísérleteimben a sejtekben túltermeltetett *Abhd4* hatására a neuroblasztok megálltak az intermedier - illetve a szubventrikuláris zónában és nem tudtak tovább vándorolni a kortikális lemez felé. Általában a neuroblaszt migrációs problémák hátterében valamilyen a sejtvázat érintő molekuláris változás áll. Előzetes vizsgálataink szerint (Dr. Lele Zsolt munkája) az ektopikus *Abhd4* expresszió nem okoz defektust az aktin alapú sejtváz normális felépítésében illetve a radiális gliasejtek apikális (luminalis) felszíni kapcsolódását biztosító adherens junction-ok szerkezetében, ami a migrációs problémák egyik leggyakoribb okozója.

A hosszú távú hatásokat vizsgáló kísérleteimben a fúziós fehérjét tartalmazó *aktív Abhd4* vektort alkalmazva nem láttam GFP pozitív sejteket posztnatális korú egerek agyában. Ennek két oka lehet, vagy az elektroporált sejtek pusztulnak el, vagy a sejtek lebontják az *Abhd4*-et a hozzá kapcsolt GFP-vel együtt. Az első lehetőség vizsgálatára TUNEL – teszteket végeztünk, melynek eredménye arra utal, hogy az *Abhd4*-et expresszáló sejtek legalább egy része apoptotikus, autofágiás vagy nekrotikus folyamatok eredményeképp elpusztul. Jelenleg vizsgáljuk, hogy melyik folyamat eredménye a megemelkedett mértékű sejtpusztulás, illetve hogy az elektroporált sejtek, amelyek lebontják az *Abhd4*-et képesek-e további normális fejlődésre.

Az embrionális fejlődés során alapvető szerepe van az epitheliális-mezenchimális transzformációnak, amikor a még epitheliális, de leendő mezenchimasejtek polaritása megváltozik, a bazális és az apikális membránjukban található adhézis fehérjék mennyisége csökken, illetve eloszlása megváltozik, így a sejtek képesek lesznek az epitheliális környezetet elhagyni (pl. ilyen folyamat zajlik a dúcléc sejtjeinek a velőcsőből való kiválásakor is, Jia és mtsai. 2012). Igen hasonló folyamat zajlik le az epitheliális eredetű rákos sejtek áttétképződése során is. Ezzel kapcsolatban érdekesek egy nemrégén publikált cikk

eredményei, melyek szerint az *Abhd4* az anoikis típusú apoptózis fontos komponense (Simpson és mtsai. 2012). Az anoikis típusú apoptózis a rákos transzformáción átesett sejtek extracelluláris mátrixtól, illetve egymástól való elválása miatt bekövetkező sejthalál. A radiális glia osztódásával keletkezett neuroblasztta váló utódsejtnek szintén el kell szakadnia az egymással szoros adhézios (adherens junction) kapcsolatban levő radiális gliasejtektől. Elképzelhető, hogy az *Abhd4* egy készenléti funkciót betöltő enzim, amely csak akkor válik aktívvá, ha az osztódó réteg sejtei (melyekben igen nagy a mutációk kialakulásának lehetősége) megszakítják adhézios kapcsolataikat és onkogén elváltozást is szenvednek. Ezen elmélet azt is megmagyarázza, hogy kísérleteink során miért nem detektáltunk az *Abhd4* -/- állatokban semmilyen fejlődésbeli defektust.

Ezt a lehetőséget az is alátámasztja, hogy a központi idegrendszerben kialakuló rosszindulatú rákos elváltozás, a glioblasztóma sejtei specifikusan expresszálják az anandamidot ligandként kötni képes TRPV1 receptort. Mi több, a rákos sejtekhez szelektíven migráló pluripotens osztódó sejtek (a radiális gliasejtek felnőttkorban megmaradó utódai) endovanilloidot (anandamid) termelnek, melynek hatására a TRPV1 receptor közvetítésével a rákos sejtben ER stressz alakul ki, mely végső soron annak pusztulásához vezet (Stock és mtsai. 2012). Ezen megfigyelések és a saját eredményeink együtt arra engednek következtetni, hogy a kortex osztódó radiális glia sejtjeiben az *Abhd4* által termelt anandamid vagy más lipid molekula lehet az a szignál, mely egyéb feltételek teljesülése esetén (pl.onkogén transzformáció esetén) a TRPV1-hez kapcsolódva sejthalált indukál. Jelenlegi kísérleteink az *Abhd4* által előidézett sejthalál pontos hatásmechanizmusának megértésére irányulnak.

8. Irodalom

- Ayala, R., T. Shu, et al. (2007). "Trekking across the brain: the journey of neuronal migration." *Cell* 128(1): 29-43.
- Berghuis, P., A. M. Rajnicek, et al. (2007). "Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity." *Science* 316(5828): 1212-1216.
- Cadas, H., E. di Tomaso, et al. (1997). "Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain." *J Neurosci* 17(4): 1226-1242.
- Cravatt, B. F., D. K. Giang, et al. (1996). "Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides." *Nature* 384(6604): 83-87.
- Devane, W. A., L. Hanus, et al. (1992). "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor." *Science* 258(5090): 1946-1949.
- Di Marzo, V., A. Fontana, et al. (1994). "Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons." *Nature* 372(6507): 686-691.
- Frotscher, M. (2010). "Role for Reelin in stabilizing cortical architecture." *Trends Neurosci* 33(9): 407-414.
- Huang, Z. (2009). "Molecular regulation of neuronal migration during neocortical development." *Mol Cell Neurosci* 42(1): 11-22.
- Jia, J., W. Zhang, et al. (2012). "Epithelial mesenchymal transition is required for acquisition of anoikis resistance and metastatic potential in adenoid cystic carcinoma." *PLoS One* 7(12): e51549.
- Leone, D. P., K. Srinivasan, et al. (2008). "The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex." *Curr Opin Neurobiol* 18(1): 28-35.
- Leung, D., A. Saghatelian, et al. (2006). "Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids." *Biochemistry* 45(15): 4720-4726.
- Liu, J., L. Wang, et al. (2008). "Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide." *Neuropharmacology* 54(1): 1-7.
- Marín, O. and J. L. Rubenstein (2003). "Cell migration in the forebrain." *Annu Rev Neurosci* 26: 441-483.
- Marín, O., M. Valiente, et al. (2010). "Guiding neuronal cell migrations." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(2): a001834.
- Matsuda, T. and C. L. Cepko (2004). "Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(1): 16-22.
- Morishita, J., Y. Okamoto, et al. (2005). "Regional distribution and age-dependent expression of N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D in rat brain." *J Neurochem* 94(3): 753-762.
- Mulder, J., T. Aguado, et al. (2008). "Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(25): 8760-8765.
- Okada, T., K. Keino-Masu, et al. (2007). "Migration and nucleogenesis of mouse precerebellar neurons visualized by in utero electroporation of a green fluorescent protein gene." *Neurosci Res* 57(1): 40-49.
- Okamoto, Y., J. Morishita, et al. (2004). "Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners." *J Biol Chem* 279(7): 5298-5305.
- Piomelli, D. (2003). "The molecular logic of endocannabinoid signalling." *Nat Rev Neurosci* 4(11): 873-884.
- Psychoyos, D., K. Y. Vinod, et al. (2012). "Cannabinoid receptor 1 signaling in embryo neurodevelopment." *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 95(2): 137-150.

- Simon, G. M. and B. F. Cravatt (2006). "Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway." *J Biol Chem* 281(36): 26465-26472.
- Simon, G. M. and B. F. Cravatt (2008). "Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain." *J Biol Chem* 283(14): 9341-9349.
- Simpson, C. D., R. Hurren, et al. (2012). "A genome wide shRNA screen identifies α/β hydrolase domain containing 4 (ABHD4) as a novel regulator of anoikis resistance." *Apoptosis* 17(7): 666-678.
- Stock, K., J. Kumar, et al. (2012). "Neural precursor cells induce cell death of high-grade astrocytomas through stimulation of TRPV1." *Nat Med*.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönök minden segítséget az MTA KOKI Molekuláris Neurobiológia kutatócsoport vezetőjének, Dr. Katona Istvánnak. Hálás vagyok Dr. Lele Zsolt témavezetőmnek fáradhatatlan munkájáért és végtelen türelméért. Köszönöm a csoportom minden tagjának, a hétköznapiakban nyújtott feltétlen segítségüket. Hálás vagyok Dudok Barnának a statisztikai analízis során nyújtott önzetlen segítségéért. Köszönöm az Orvosi Géntechnológia Részleg dolgozóinak az állattartásban nyújtott segítségüket, valamint a NIKON-KOKI Mikroszkóp központnak és vezetőjének, Barna Lászlónak, a konfokális felvételek elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönöm családomnak és barátaimnak a tudományos munkához szükséges megértő türelmüket és feltétlen támogatásukat.

10. Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

A kísérletekhez felhasznált állatokat magam perfundáltam, fixáltam és metszettem le.

Az általam készített digoxigeninnel jelölt *Abhd4* ribopróbák szintézise után in situ hibridizációt készítettem a különböző korú vad típusú egerek agymetszetein. Kimutattam, hogy a korai embrionális fejlődési stádiumokban specifikus *Abhd4* expresszió figyelhető meg a telencephalon I.-II. illetve III. agykamráinak ventrikuláris zónájában.

Méhen belüli in situ elektroporációs technikával a témavezetőm és az általam elkészített DNS konstrukciókat juttattam be a ventrikuláris zónában található sejtekbe. A műtét után az általam eltávolított és fixált agyszeletek metszetein migrációanalízist készítettem. Megfigyeltem, hogy a kontroll csoportokhoz képest az *Abhd4* hatására az agykéreg leendő vetítő neuronjai nem képesek migrációs útjukat az átmeneti zónán túl folytatni.

Az apoptózis vizsgálatára témavezetőm, Dr. Lele Zsolt által készített TUNEL tesztek elemzését és kvantifikálását hajtottam végre. Megmutattam, hogy az *Abhd4* túltermeltetés hatására szignifikánsan nagyobb mennyiségű sejthalál következett be, mint a kontroll csoportoknál.