

Az N-cadherin és az endokannabinoid rendszer szerepe az agykéreg fejlődése során

Doktori tézisek

László Zsófia

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Lele Zsolt, Ph.D.
tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Bíró Tamás, D.Sc.
egyetemi tanár

Dr. Adorján István, Ph.D.
tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Csillag András, D.Sc.
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Herberth-Minkó Krisztina, Ph.D.
egyetemi adjunktus

Dr. Tárnok Krisztián, Ph.D.
egyetemi adjunktus

Budapest
2019

1. Bevezetés

Az emlős agykéreg a legbonyolultabb szerkezettel rendelkező terület az agyban. Az evolúciós fejlődés során az agykéreg méretének növekedése és komplexitása megteremtette az ember számára, hogy a legügyesebb, legtudatosabb faj legyen a földön. Természetesen ezek a tulajdonságok nem jöhethének létre az agykéreg működését adó serkentő és gátló idegsejtek megfelelő fejlődése nélkül. Az agyfejlődés kezdetén a végagyhólyag dorzocentrális irányban két részre osztható, ezek a pallium és a szubpallium. Több mint 30 évvel ezelőtt a kutatók úgy gondolták, hogy mind a serkentő piramis sejtek mind a gátló interneuronok a pallium területéről származnak. Azonban a technológiai fejlődésnek köszönhetően, később bebizonyították, hogy az agykéreg két fő sejt típusa a végagyhólyag más területén lévő germinatív zónákban születnek. A serkentő projekciós neuronok, avagy piramis sejtek a pallium progenitor zónáiban, míg a gátló interneuronok a szubpallium területén található ganglion dombokon keletkeznek.

Az embrionális agykéreg több rétegből álló szerkezettel rendelkezik, melyekben különböző típusú és fejlődési fázisban lévő sejt található meg. A legapikálisabb palliális réteg a ventrikuláris zóna (VZ), mely főleg osztódó progenitorokat és a megszületett leánysejteket tartalmazza. A VZ fölött egy másik germinatív réteg helyezkedik el, az úgynevezett szubventrikuláris zóna (SVZ), mely mind a mélyebb (idegsejtek az 5. és 6. rétegekben) mind a magasabb agykéregi rétegekben (2-4. rétegek) elhelyezkedő piramis sejtek termeléséért felelős sejteket foglalja magába. A piramis sejtek születésüket követően megkezdik radiális irányú migrációjukat a progenitor sejtek nyúlványain a piális felszín felé. Átvándorolnak az intermedier zónán (IZ), mely a fejlődés előrehaladtával főleg a talamuszból érkező axonkötegeket tartalmazza és elválasztja a proliferatív zónákat a fejlődő agykéregi rétegektől. Az IZ-t egy étmeneti zóna a szublemez követi, mely a legelsőként született idegsejteket tartalmazza. Ezt követően a migráló neuronok eléri a kérgi lemezt, ahol beilleszkedve az adott agykéregi rétegbe megkezdik differenciációjukat. A fejlődő agykéreg piális felszínhez legközelebbi rétege a marginális zóna (MZ), ahol a Cajal-Retzius sejtek helyezkednek el, melyek aktívan szabályozzák a piramis sejtek migrációját. A radiális migráció során a vándorló neuroblasztok közvetlenül az MZ alatt megállnak, majd az őket követő migrációs hullám rajtuk áthaladva éri el a kérgi lemez tetejét, így tehát a mélyebb agykéregi rétegek neuronjai előbb alakulnak ki, mint az őket követő, a magasabban fekvő rétegek piramis sejtjei. Ezzel szemben a szubpalliumban született interneuronok tangenciális vándorlással, majd különböző palliális migrációs ösvényen át érkeznek meg az agykéregbe. Ezt követően radiális irányú mozgással helyezkednek el a megfelelő agykéregi rétegbe, ahol differenciációjuk nagyban függ az őket körülvevő piramis sejtek aktivitásától.

Az agykéreg normál fejlődése nem valósulhatna meg szigorúan szabályozott molekuláris jelpályák nélkül, mint például adhéziós molekulák és az endokannabinoid rendszer. Az egyik legfontosabb adhézióért felelős fehérje család a klasszikus cadherineket, melyek Ca^{2+} -függő sejt-sejt kapcsolatok megteremtéséért felelős molekulák mind az embrionális mind a felnőtt agyban. A neurális-cadherin (N-cadherin vagy *Cdh2*) magas szintű expressziót mutat az embrionális agy ventrikuláris felszínén lévő adherens junctionokban, mind a pallium és a szubpallium területén, illetve az intermedier zónában és a kérgi lemezben. Az N-cadherin elengedhetetlen a progenitor sejtek osztódásának fenntartásában, valamint meghatározza az asszimmetrikus osztódás során születő leánysejtek vezető nyúlványának irányultságát a kérgi lemez felé. Mind a serkentő és gátló sejtek migrációja N-cadherin mediált adhézió keresztül zajlik. A radiális glia nyúlványa által irányított radiális migráció során reverzibilis N-cadherin adhézió segíti a migráló neuroblasztok vándorlását, melyek a kérgi lemezt elérve hasonló, N-cadherin alapú homofil kötést létesítenek a Cajal-Retzius sejtekkel, így segítve azok beintegrálódását az adott agykérgi rétegbe. Azonban fontos megjegyezni, hogy míg az N-cadherin szerepe a piramis sejtek migrációja során kellően feltérképezett, az interneuronok migrációjában betöltött szerepe még vitatott.

Az endokannabinoidok membrán alkotó lipidekből szintetizálódó molekulák, melyek a kannabinoid receptorokon (CBR1, CBR2) keresztül történő retrográd szignalizációért felelősek a felnőtt agy szinapszisaiban. A két fő endokannabinoid szintje az agy fejlődése során folyamatosan nő és posztnatális kor első két hetében éri el a maximumot. Ennek megfelelően, a 2-AG (2-arachidonoil-glicerol) metabolizmusát végző enzimek hasonló expressziós tendenciát mutatnak, ezzel szemben az anandamid (AEA) szintéziséért felelős NAPE-PLD csak a posztnatális fejlődés első hetében válik enzimatikusan aktívvá. Így tehát az AEA szintézise embrionális korban egyelőre nem tisztázott. A CB1 receptor növekvő expressziót mutat az embrionális kéreg ventrikuláris zónájától a kérgi lemezig bezárólag. Habár a parakrin endokannabinoid szignalizáció elengedhetetlen a szinaptikus működés finomhangolásában a felnőtt agyban, embrionálisan inkább autokrin szabályozás jellemző. Az endokannabinoid rendszer elemei bizonyítottan fontos szerepet játszanak az agykéreg fejlődése során, mint például szabályozzák a progenitor sejtek proliferációját és a radiális migrációt. Ezen felül, az endokannabinoid rendszer szabályozza az axonális nyúlványnövekedést az agykéregben, mely végső során segíti a CB1-pozitív interneuronok vándorlását is.

2. Célkitűzések

2.1 Az N-cadherin szerepének vizsgálata a posztnatális interneuronok migrációjában és differenciációjában

- Megfelelő egérmodell létrehozása, melyben az N-cadherin hiányos vándorló posztmitotikus interneuronok nyomon követhetők
- Az interneuronok vándorlásának vizsgálata N-cadherin hiányában
- Az N-cadherin hiányában kialakuló fenotipikus változások megfigyelése mind az juvenilis mind a felnőtt agyban

2.2. Az adherens junkciók felbomlása miatt kialakuló molekuláris változások feltérképezése

- In vivo cadherin szétkapcsoló modell létrehozása a fejlődő palliumban
- Az endokannabinoid rendszer szerepének vizsgálata az abnormálisan kialakuló delamináció mechanizmusában
- Teratogén behatások molekuláris hátterének vizsgálata, melyről tudott, hogy delaminációt és migrációs defektust okoz

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált állatok

Minden egérvonal standard laboratóriumi körülmények szerint volt tartva megfelelően az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács elvárásainak (engedély szám: XIV-1-001/2332-4/2012 and PE/EA/354-5/2018). Az C57BL/6 egérvonal Charles River Laboratories-tól volt rendelve. Az Abhd4 egérvonalat Benjamin Cravatt laborja hozta létre. A genetikailag módosított N-cadherin egérvonal három genetikailag módosított vonal egyesítésével jött létre, melyben a posztmitotikus interneuronokban expresszálandó *Dlx5/6* fehérjék promotere szabályozta az N-cadherin jelenlétét Cre/lox rendszerben, majd a migráló sejteket egy interneuron-specifikus *Gad65-GFP* vizualizálta, így létrehozva a tézisben szereplő $+/+$ (vad típusú) azaz *Dlx5/6i-Cre^{+/+};Cdh2^{fl/fl}* és $-/-$ (génkiütött) azaz *Dlx5/6i-Cre^{Cre/+};Cdh2^{fl/fl}* állatokat.

3.2. Minta előkészítés

A felnőtt és juvenilis állatokat megfelelő dózisu 1,25% avertin (2,2,2, -tribromoetanol és 2-metil-2-butanol autoklávozott vízben oldva, Sigma) intraperitoneális (IP) injekcióval altattuk el, majd transzkardiálisan perfundáltuk őket 4% PFA/0,1 M PB oldat felhasználásával, melyben az agyak eltávolítása után egy éjszakán át posztfixálódtak. Másnap az agyakat PBS-ben mostuk, majd 40 μ m-es metszeteket készítettünk Leica1000 vibratóm (Leica) segítségével. A metszeteket 24 lyukú sejttenyésztő lemezekben gyűjtöttük és 4 ° C-on tároltuk a kísérletekig. A fagyasztva történő metszéshez az embrionális agyakat egy éjszakán át 30% -os szacharóz / PBS oldatban tartottuk majd a szövetet beágyaztuk speciális Tissue-TEK OCT (Sakura) krioprotektív oldatba, végül 20 μ m vastag metszeteket gyűjtöttünk Superfrost Ultra Plus

üveglemezeken (Thermo Fisher Scientific) MICROM HM 550 kriosztáttal (Thermo Fisher Scientific) és -20 ° C-on tároltuk a további kísérletekig.

3.3. DNS konstrukciók és klónozás

Az egér N-cadherint RT-PCR-rel, embrionális és felnőtt cDNS templát alkalmazásával klónoztuk meg, Long-template PCR mix használatával a gyártó utasításai szerint (Roche; 1. táblázat, primerek). Az egér Abhd4-et szintén embrionális cDNS-ből származó RT-PCR-rel hoztuk létre. Az Abhd4 rövidebb, az *in situ* hibridizációhoz használt 418 bp méretű fragmentet külön eljárásban klónoztuk meg. Az Abhd4 enzimatikusan inaktív verzióját (inaktív Abhd4) a 159. szerint specifikus mutagenézissel glicinné alakítottuk át. Az összes termék pGEM-T Easy vektorba (Promega) került majd szekvenálással ellenőriztük őket. A Δ nCdh2, Abhd4 és az Inaktív-Abhd4 végül pGEMT-ből pCAGIG emlős expressziós vektorba (Addgene # 1115) klónoztuk át majd NucleoBond Xtra Plus EF Kit (Macherey-Nage) felhasználásával tisztítottuk. *In situ* hibridizációhoz az RNS-t Ambion RNAqueous-4PCR kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével izoláltuk. A reverz transzkripciót a Maxima RT Kit segítségével végeztük (Thermo Fisher Scientific), és a fragmenteket RT-PCR-rel amplifikáltuk megfelelő primerek alkalmazásával (1. táblázat), majd klónoztuk pGEMT-Easy vektorba (Promega).

3.4. *In vitro* transzkripció és *in situ* hibridizáció

A ribopróbák elkészítéséhez az inzertet tartalmazó plazmidokat 5'végnél linearizáltuk megfelelő restrikciós enzimek használatával, majd agaróz gél elektroforézis segítségével szeparáltuk, végül izoláltuk a mintákat GeneJET Gel Extraction Kit segítségével (Thermo Fisher Scientific). Az *in vitro* transzkripciót DIG-UTP jelölő mixel (Roche) és megfelelő RNS polimerázok (T3, T7, SP6, Promega) felhasználásával készítettük el. Az *in situ* hibridizáció menete korábban publikált protokoll szerint készült, lásd Mayer és mtsai. 2010. A kísérleteket végeztével a mintákat üveg tárgylemezre (Thermo Fisher Scientific) húztuk fel majd Aqua/Poly Mount (Polysciences, Inc.) oldattal fedtük le, végül körömlakk segítségével rögzítettük a fedőlemezt.

3.5. *In utero* elektroporáció és injektálások

A vemhes egéranyákat az embrionális fejlődés 14.5 napján 1.25% avertin IP injekcióval vagy izoflurán vaporizációs kamra használatával altattuk el. A hasüreg felnyitását követően a méhszarvak kiemelésre kerültek. Egy vékony üveg kapilláris segítségével körülbelül 1 μ l expressziós vektort és kezelés esetén általános kaszpáz inhibitor (Z-VAD-FMK, 5 μ M; BD Biosciences) tartalmazó oldatot injektáltunk az embriók laterális agykamrájába (minden konstrukció 1-3 μ g/ μ l, Fast Green festéket (Roth) tartalmazó endotoxin mentes vízben oldva). Az elektroporáció 5 egymást követő impulzus 50 V áram 50 ms időtartam alatt 950 ms időközönként történt egy SP-3C elektroporátor (Supertech) és csipesz elektródok segítségével.

Az elektromos pulzusokat követően az embriókat visszahelyeztük a hasüregbe, majd az anya hasizmai és törzsi bőr összevarrása után az embriók a megadott napig fejlődtek tovább (kísérlettől függően 1-3 nap).

BrdU 0.9% fiziológiás sóoldatban beoldva (200 mg/kg; Sigma) egy 0.2 µm pórusú filteren (Millipore) szűrtük át. A vemhes egéranyákat az embrionális fejlődés 14. napján IP injekció formájában kezeltük majd 2 órával később 4% PFA-val fixáltuk az embrionális agyakat.

1. táblázat. A klónozáshoz felhasznált primerek és tulajdonságaik

Gén	Primerek	Kapcsolódási hőmérséklet	Fragment mérete
Cdh2	-ATGTGCCGGATAGCGGGAGCGC -TCAGTCGTCACCACCGCCGTACATG	57°C	896 bp
Abhd4	-ATGGGCTGGCTCAGCTCGACCCG -TCAGTCAACTGAGTTGCAGATCTCT	57°C	1068 bp
Abhd4 <i>in situ</i> fragment	-CGGCAGGGCTTGTTTACTAT -TCTCCCGCCATGTCTCTATT	57°C	418 bp
Inaktív Abhd4	-CCGTGCACCTCCAACCTGGGTCAGGGCTG TGGCATCTGTCC -GGACAGATGCCACAGCCCTGACCCAGGTT GGAGGTGCACGG	62 °C	1068 bp
VIP	-CCTGGCATTCTTGATACTCTTCAG -TTCTCTGATTTCAGCTCTGCCAG	52°C	527 bp
NPY	-AGAGGCACCCAGAGCAGAG -AATGGGGCGGAGTCCAGCCTAGTG	55°C	471 bp
Reln	-TCGCACCTTGCTGAAATACACAGTG -GCCGCATCCCAAATTAATAGAAAAC	55°C	1176 bp
Calb2	-GATGCTGACGGAAATGGGTACATTG -CCTACCAGCCACCCTCTCTCCATC	55°C	893 bp
Slc1a3 (Glast1)	-TAGGGGCAGGCTGTGTGTGGCTCAC -TCGTTTCTTTGGGGGCTGATTAGGGAC	55°C	406 bp
SST	-TGAAGGAGACGCTACCGAAGCCG -TGCAGGGTCAAGTTGAGCATCG	52°C	544 bp
Cnr1 (CBR1)	-ATGAAGTCGATCTTAGACGGCCTTG -TCACAGAGCCTCGGCAGACGTGTCTG	55°C	14227 bp

3.6. Fluoreszcens egyedi mRNS detekció (RNAscope)

Ahhoz, hogy a ventriuláris zóna sejtjeit el tudjuk különíteni, Chr2-GFP (Addgene #26929) felhasználásával *in utero* elektroporációt végeztünk. Egy nappal később (E15.5) az embriók dekapitációját követően az agyakat azonnal izopentán/száraz jég fölött megfagyasztottuk, majd a kriosztátban ekvilibráltuk 2-3 órán át -20°C-on. A minták OCT oldatba való beágyazását követően 20 µm vastag metszeteket készítettünk. A szeleteket a metszés teljes időtartama alatt a kriosztátban tartottuk, majd előre lehűtött 10% PFA segítségével 30 percig 4 °C-on fixáltuk azokat. Az egyedi mRNS detekció a gyártó által mellékelt protokoll alapján lett elkészítve

(Advanced Cell Diagnostic, Manual Fluorescent Assay AP-FastRed) melyhez egyedi tervezésű *Abhd4* próbát használtunk, *Tbr2* vagy *Glast1* próbával párosítva. Az utolsó mosást követően a minták 10% PFA-val fixálódtak további immunhisztokémia elvégzése előtt, mely segítségével visszanyertük az elektroporált GFP jelét.

3.7. Immunhisztokémia

Embrionális, illetve felnőtt állatból származó krio – vagy szabadon úszó metszetek konfokál és STORM szuper-rezolúciós mikroszkópiához az antitesteknek megfelelően lettek permeabilizálva (2. táblázat, feltárás oszlop). A minták ezt követően 5% normál szarvasmarha szérummal (NDS, Sigma) lettek kezelve egy órán át. Néhány mosást követően a minták elsődleges ellenanyagban inkubálódtak egy éjszakán át 4°C-on (2. táblázat). A következő napon a szeleteket másodlagos ellenanyagot tartalmazó oldattal (3. táblázat) kezeltük 4 órán át szobahőmérsékleten. Végül PBS oldatban való mosást követően a metszeteket Vectashield Hard Set készítménnyel fedtük le és körömlakkal lezártuk a fedőlemezt. STORM szuper-rezolúciós mikroszkópiához a mintákat fedőlemezekre helyeztük majd a képalkotás napjáig 4°C-on tároltuk őket.

3.8. In vitro kísérletek

A HEK-293 sejt vonalat Dr. Gereben Balázs laborjától (KOKI) kaptuk. A sejtek normál laboratóriumi körülmények között tartottuk, 10% szarvasmarha szérumot tartalmazó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4.5 g/L glükóz, L-glutamin & nátrium-piruvát (Corning) valamint hő inaktivált magzati szarvasmarha szérum (Biosera)) oldatban, műanyag petricsészében 5% CO₂ inkubátorban 37 °C-on. A sejtek egy nappal a transzfekció előtt egy 24 lyukú sejt kultúra lemezben lévő poly-D-lizin (Sigma) fedőréteggel rendelkező üveg lemezekre lettek szélesztve Opti-MEM szarvasmarha szérum csökkentett médiumban (Gibco). A sejtek transzfekciójához tisztított plazmid DNS-t (1 µg), lipofektamint (Lipofectamine 2000 Reagent, Invitrogen) illetve Opti-MEM médiumot használtunk. 20 órával később a sejteket 4% PFA-val fixáltuk 10 percig. Ezt követően 0.2% Triton X 100/ PBS oldattal permeabilizáltuk a sejteket 15 percig, majd 1 % humán szarvasmarha albumint (Human Serum Albumin Sigma) tartalmazó oldatban inkubáltuk a lemezeket 30 percen keresztül. Ezután a sejteket másfél órán át elsődleges antitestet tartalmazó oldattal kezeltük (2. táblázat). PBS mosás után a sejtek másodlagos antitest oldatba kerültek egy órára. Végül a mintákat az előzőekhez hasonlóan fedtük le, kivéve a STORM szuper-rezolúciós mikroszkópiához készített mintákat, melyeket PBS-ben tartottunk a képalkotás napjáig.

2. táblázat. A kísérletek során alkalmazott elsődleges antitestek

Név	Gazda	Hígítás	Előállító	Feltárás	
paired box protein-6 (PAX6)	Nyúl	1:300	Biolegend (901301)	10 mM sodium-citrate and 0.1% TritonX/PBS	
cleaved Caspase-3 (CC3)	Nyúl	1:500	Cell signaling (9661S)	0.3% TritonX/PBS	
calretinin (Calb2)	Egér	1:1000	Millipore (MAB1568)		
somatostatin (SST)	Kecske	1:1000	Santa Cruz (sc-7819)		
laminin subunit alpha 1 (LAMA1)	Nyúl	1:500	Sigma (L9393)	0.2% TritonX/PBS	
transcription factor T-box brain 1 (Tbr1)	Nyúl	1:500	Abcam (ab31940)		
transcription factor T box brain 1 (Tbr2)	Nyúl	1:500	Abcam (ab23345)		
phospho-histone H3 (PHH3)	Nyúl	1:500	Millipore (06-570)		
nestin	Egér	1:200	Millipore (MAB353)		
green fluorescent protein (GFP)	Kecske	1:1000	Abcam (ab5450)		
Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20 (TOM20)	Nyúl	1:1000	Santa Cruz (s-11415)		
cytochrome c (CytC)	Egér	1:2000	Biolegend (612302)		
parvalbumin (PV)	Kecske	1:3000	Swant (PVG214)		
5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	Egér	1:400	Sigma (B8434)		2 M HCl
catalase	Nyúl	1:3000	Abcam (ab1877)		TBS/Tween20
abhydrolase domain containing 4 (Abhd4)	Nyúl	1:500	ImmunoGenes Ltd	TBS/Tween20	

3.10. Western blot

Az Abhd4 vad típusú és génkiütött álatokból származó embrionális végagyhólyagokat és Abhd4 transzfektált HEK-293 sejt mintákat RIPA lízis pufferben homogenizáltuk (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1% Tx-100, 0.1% SDS, 1mM DTT, 1X proteáz inhibitor (Roche)). A mintákat Laemli féle pufferben 95 °C-on denaturáltuk 5 percen át, majd 15 µg fehérjének megfelelő mennyiségű mintát 12% SDS-poliakrilamid gélen méret szerint szeparáltunk egy PowerPac HC High-Current Power Supply készülék segítségével (Bio-Rad) 160 V-on, 400 mA áramerősség mellett. Végül a mintákat nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A kívánt fehérjék megjelenítésének érdekében a membránokat 5% BSA-val (Bovine Serum Albumin Sigma), majd primer antitesteket tartalmazó oldattal kezeltük. Másnap pufferben való mosást követően másodlagos HRP-kötött ellenanyagot (3. táblázat) tartalmazó oldatban inkubáltuk a mintákat 3 órán át szobahőmérsékleten. A membránban lévő fehérjéket speciális előhívó oldat

segítségével (Supersignal West Dura Extended Duration Substrate Kit, Thermo Fisher Scientific) UV lámpa alatt vizualizáltuk.

3. táblázat. A kísérletekben használt másodlagos antitestek.

Név	Gazda	Hígítás	Előállító	Katalógusszám
Anti-Nyúl Alexa 488	Szamár	1:400	Jackson ImmunoReserach Ltd	711-545-152
Anti- Nyúl Alexa 594				711-585-152
Anti-Egér Alexa 488				715-545-150
Anti- Egér Alexa 594				711-585-150
Anti- Egér Alexa 647				715-605-150
Anti-Kecske Alexa 488				705-545-147
Anti- Kecske Alexa 594				705-545-147
Anti- Kecske Alexa 647				705-605-147
Anti- Nyúl CF568				
DAPI	-	1:2000	Millipore	508741
Anti-Nyúl IgG, HRP-kötött ellenanyag	Kecske	1:3000	Cell Signaling	7074
Alexa Fluor 568 Phalloidin	-	1:500	Thermo Fisher Scientific	A12380

3.11. Anyai alkohol fogyasztási modell

Heterozigóta tenyésztést használva az alkohol kezelés egyenlő mértékben hatott az egy méhben található Abhd4 vad típusú és génkiütött testvérekre. A szubkrónikus modellben, az embrionális fejlődés 13.5 napjától két napon át kontroll vagy 2.5g/kg etanol/fiziológiás sóoldat IP injekciót kaptak a vemhes egerek, majd E16-ban az embrionális agyakat lefixáltuk. Az akut modell során egy 5g/kg kontroll vagy etanol injekciót kaptak az egéryanák, majd az embriókat 12 órával később fixáltuk. Az anyai véralkoholszintet enzimatis reakcióval állapítottuk meg, mely során az anyai vért (0.1 ml) azonnal 0.9 ml 6.25% triklórecetsavval kevertük össze és centrifugáltuk le. A felülúszóból egy az alkohol mérésre specifikusan kialakított oldatba tettünk (Synchron System Ethanol Assay, Beckman) majd spektrofotométerben 340 nm-en mértünk a minták fényelnyelését. A mérési standardokat előre kiszámolt alkohol koncentrációk alapján készítettük el (0,1 ‰; 0,5 ‰; 1 ‰; 1,5 ‰; 2‰). A szubkrónikus modellben 0,5 ‰-1 ‰; míg a krónikus modellben 1,5 ‰-2‰ anyai véralkoholszintet mértünk.

3.12. Képpalkotás és szerkesztés

In situ hibridizáció során készült mintákat Nikon DS-Fi1 CCD kamerával ellátott Nikon Eclipse Ti80 mikroszkóppal vagy AxioCam Hrc digitális kamerával Zeiss AxioScope készülékkel fotóztuk. A fluoreszcens minták képpalkotását Nikon NIS-Elements AR szoftver

vezérelte Ti-E inverz alapon lévő Nikon A1R konfokális lézeres pásztázó mikroszkóp rendszerrel végeztük. A korrelált konfokál és STORM szuper-rezolúciós felvételeket CFI Apo TIRF 100x objektíven (1.49 NA) keresztül készítettük, mely egy inverz Nikon Ti-E mikroszkópban található, amihez Nikon C2 szkennelő fej és egy Andor iXon Ultra 897 EMCCD kamera csatlakozik. A rendszer Nikon N-STORM modullal irányítható a NIS-Elements AR szoftveren belül. A képképzés előtt a metszeteket speciális szuper-rezolúciós mikroszkópiához kialakított médiummal fedtük le, ami 0.1 M merkaptotilamint és az oxigén megkötéshez szükséges vegyületeket: 5 m/v% glükózt, 1 mg/ml glükóz oxidázt, valamint 2.5 µl/ml katalázt tartalmazott. A képképzés már a korábban lepublicált módon zajlott, lásd Dudok és mtsai. 2015 vagy Barna és mtsai. 2016. A képelemzés és szerkesztés mindig megegyező beállításokkal történtek az egy kísérlethez tartozó genotípusok vagy csoportok között. Az ábrákat és képszerkesztést Photoshop CS5 (Adobe) programban végeztük.

3.13. Statisztikai elemzés

A kísérleti eredmények analízisét Statistica 13.0 (TIBCO) és Prism (Graphpad) programokkal készítettük. Minden kísérletet minimum három alkalommal ismételtünk meg, 3 különböző állaton. Shapiro-Wilk normalitási tesztet, vagy alacsony elemszám esetén Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk a minták normál eloszlásának felmérésére. A minták egy kondícióon belüli összevonhatóságát Kruskal-Wallis tesztel ellenőriztük. Két minta és normál disztribúció esetén kétmintás t-próbát, míg nem parametrikus eloszlásoknál Mann-Whitney U tesztet használtunk. Több minta összehasonlításakor nem parametrikus Kruskal-Wallis tesztet futtatunk, Dunn-féle többszörös összehasonlító post hoc eljárással. A statisztikai szignifikancia szinteket standard osztályozási rendszerrel tüntettük fel az ábrákon (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).

4. Eredmények

4.1. Az N-cadherin (*Cdh2*) szerepe az interneuronok tangenciális migrációja és érése során

4.1.1. *Cdh2* eltávolítása a posztmitotikus interneuronokból hatással van a tangenciális migrációra

Az N-cadherin nagy mértékben expresszál az embrionális agy különböző területein, beleértve a palliális és szubpalliális geminatív zónákat. Ahhoz, hogy felderítsük az N-cadherin szerepét az interneuronok vándorlása során, specifikusan csak a posztmitotikus interneuronokból eltávolítottuk az N-cadherint egy *Dlx5/6* gén regulációs elem és Cre-flox rendszer felhasználásával. Ennek eredményeképpen, a *Cdh2* expresszió teljes mértékben eltűnt a posztmitotikus interneuronokból és a striátális sejtekből a szubpallium területén, miközben

más régiók, mint például a szubpalliális ventrikuláris zóna, a talamusz és a palliális struktúrák változatlanok maradtak. A vándorló interneuronok nyomkövetése céljából a *Dlx5/6i-Cre/Cdh2*-floxolt állatokat egy GABAerg sejt-specifikus GAD65-GFP egérvonallal kereszteztük. Megfigyeltük, hogy ezekben az utódokban szignifikánsan kevesebb vándorló interneuron volt képes elhagyni a pallium-szubpallium határát (+/+ : n = 3, -/- : n = 3; Mann-Whitney U teszt; *** $P < 0.0001$). Ezek az adatok korábbi publikációkkal együtt egyhangúan mutatják, hogy az N-cadherin szükséges a tangenciális migrációhoz. Előzőleg, azt is bizonyították, hogy az N-cadherinnek szerepe van a proliferáció szabályozásában, ezért lehetséges, hogy hiányából adódó sejtszám különbség az osztódás megzavarása okozta. Hipotézisünk tesztelésére a mitózis M fázisának markerét a PHH3-at használtuk (phospho-histone H3). Immunhisztokémiai kísérleteink azonban megmutatták, hogy nem változott meg a szubpalliális proliferáció mértéke a genotípusok között (+/+ : n = 3, -/- : n = 3; Mann-Whitney U teszt; $P = 0.1389$). Összefoglalásul elmondható, hogy a *Cdh2* posztmitotikus interneuronokból való eltávolítása migrációs zavart okoz, míg a proliferációt nem befolyásolja.

4.1.2. A GAD65-GFP-pozitív interneuronok száma megváltozott a felnőtt génkiütött állatok szomatoszenzoros kérgében

Az előző kísérleteinkben embrionális migrációs zavart fedeztünk fel az N-cadherin hiányában, mely befolyásolhatja a felnőtt kori interneuron populációkat. Ennek felderítésére, megmértük a GAD65-GFP-pozitív sejtek mennyiségét felnőtt állatok szomatoszenzoros kérgében. Kísérleteink bizonyították, hogy szignifikánsan kevesebb interneuron található a *Cdh2* génkiütött állatokban a vad típusú testvéreikhez képest (+/+ : n = 6, -/- : n = 6; kétmintás t-próba; *** $P < 0.0001$). Elmondható tehát, hogy az embrionális korban megfigyelt migrációs probléma hatással van a felnőtt agykéreg interneuron mennyiségére.

4.1.3. N-cadherin jelenléte szabályozza a felnőtt szomatoszenzoros kéreg interneuron összetételét

Korábbi publikációkból tudjuk, hogy az interneuron populáció több altípusra osztható melyek a ganglion dombok különböző részeiről származnak. Annak érdekében, hogy feltárjuk mely interneuron típusok tűntek el a felnőtt szomatoszenzoros agykéregből az N-cadherin hiányában, különböző altípusokra jellemző markereket használva meghatároztuk azok mennyiségét. Megvizsgálva a parvalbumin- (+/+ : n = 6, -/- : n = 6; Mann-Whitney U teszt; $P = 0.8182$) illetve *reelin*-pozitív (+/+ : n = 7, -/- : n = 7; Mann-Whitney U teszt; $P = 0.2086$) sejtek számát, nem találtunk szignifikáns különbséget a genotípusok között. Meghatároztuk az *NPY* (Neuropeptide Y)- és *VIP* (Vasoactive Intestinal peptide)-pozitív sejtek mennyiségét, de egyik marker sem mutatott szignifikáns különbséget a vad típusú és génkiütött testvérek között (mindkét esetben: +/+ : n = 7, -/- : n = 7; Mann-Whitney U teszt; $P = 1$). A *VIP*-pozitív populáció

több altípusból áll, melyek közül az egyik legjelentősebb a CCK (Cholecystokinin) – pozitív sejtek, azonban ezek megjelölése a CCK széleskörű expressziója miatt kihívást jelent. Így egy másik tökéletesen átfedő mintázattal rendelkező fehérjét, a CB1 receptort (cannabinoid receptor 1) választottuk markerként. Azonban a *CBI*-pozitív interneuronok számában sem találtunk változást a testvérpárok között (+/+ : n = 8, -/- : n = 8; Mann-Whitney U teszt; $P = 0.9591$).

A fent tárgyalt eredményekkel szemben markáns csökkenést fedeztünk fel a *calretinin* (*Calb2*) - pozitív sejtek számában mind RNS (+/+ : n = 7, -/- : n = 7; kétmintás t-próba; $***P < 0.0001$), mind fehérje szinten is a felnőtt génkiütött állatok szomatoszenzoros kérgében. Ráadásul, nem csak a *Calb2*-populáció volt érintett az N-cadherin hiányában, de még a *szomatosztatin* (*SST*) -pozitív sejtek számában is csökkenést tapasztaltunk (+/+ : n = 11, -/- : n = 11; Mann-Whitney U teszt; $**P = 0.0041$). Mivel korábbi tanulmányok bizonyították, hogy létezik egy *Calb2*/*SST*-pozitív interneuron altípus is, kettős immunhisztokémiával megvizsgáltuk ezen sejtek számát az S1 agykéregben. A korábbi csökkenések a kettősen pozitív sejtek esetében is kimutatható volt (+/+ : n = 6, -/- : n = 6; Mann-Whitney U teszt; $**P = 0.0024$). Összeségében elmondható, hogy az N-cadherin hiánya befolyásolja a posztmitotikus interneuronok fejlődését, ráadásul sejttípus-specifikus módon.

4.1.4. Az N-cadherin hiánya migrációs zavart okoz a posztnatális szomatoszenzoros agykéregben

Az előzőekben felfedeztünk egy embrionális korban történő migrációs késést és ezzel összhangban interneuron altípus-specifikus sejtszám csökkenést felnőtt korban. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk pontosan mikor és mi történik ezekkel a sejtekkel az embrionális és felnőtt kori fenotípusok között, megmértük a GAD65-GFP - pozitív sejtek mennyiségét a posztnatális fejlődés 8. napján. Kísérleteink során a felnőtt kori jelenséggel egyhangúan kevesebb GAD65-GFP-pozitív GABAerg sejtet találtunk a génkiütött állatokban (+/+ : n = 4, -/- : n = 4; Mann-Whitney U teszt; $***P < 0.0001$). Azonban nem csak a sejtszám mutatott változást a genotípusok között, hanem a megmaradt GAD65-GFP-pozitív sejtek agykérgen belüli eloszlása is megváltozott. Sejt disztribúciós analízist végezve felfedeztük, hogy egy markáns eltolódás található a sejtek lokalizációját illetően a génkiütött állatokban, a felsőbb kérgi rétegek felelől a mélyebb rétegek felé. Azaz a migráló interneuronok egy nagy hányada megtorpant a posztnatális szubventrikuláris zóna területén (+/+ : n = 4, -/- : n = 4; Bin4 and Bin10: Mann-Whitney U teszt; $***P < 0.0001$). Lehetséges azonban, hogy maga a sejtszám változás nem a sejtek hiányával hozható összefüggésbe, hanem a migrációs útvonal megváltozásával. Hipotézisünk tesztelésére két másik régióban is leszámoltuk a GAD65-GFP-pozitív sejteket, ahol az előzőekhez hasonló csökkenést fedeztünk fel (+/+ : n = 4, -/- : n = 4; Mann-Whitney U teszt; másodlagos szomatoszenzoros area (S2): $***P < 0.0001$; striátum $***P = 0.0002$).

Konklúzióként elmondható, hogy az N-cadherin hiányában az interneuron összetétel különböző régiókban megváltozik, valamint a szubpalliális posztmitotikus interneuronok megragadnak a posztnatális fejlődés elején a palliális SVZ-ben, valószínűsíthetően a lamináris eloszlás kezdetén.

4.1.5. A posztnatális szubventrikuláris zónában megtorpant interneuronok sorsa

A posztnatális fejlődés első hetében bekövetkező kritikus periódusban (P7-10) a piramis sejtek aktivitása meghatározza környező interneuronok túlélését, miszerint az adott gátló sejt képes lesz beintegrálódni a neuronális hálózatban vagy aktivitás hiányában elpusztul. Így tehát lehetséges, hogy a *Cdh2* génkiütött állatokban megfigyelt felnőttkori interneuron csökkenést a megtorpant sejtek aktivitás hiánya és egyben eliminálódása okozza. Azonban az sem kizárható, hogy már embrionális korban a nem megfelelő migrációs képességük miatt pusztulnak el a sejtek. Hipotézisünk tesztelésére sejthalált vizualizáló TUNEL festést végeztünk. Elsőként az embrionális fejlődés 14 napján vizsgáltuk meg a szubpalliális germinatív zónákat, illetve a leendő striatális areát, azonban analízisünk nem mutatott különbséget a genotípusok között (+/+ : n = 3, -/- : n = 3; Mann-Whitney U teszt; CGE $P = 0.7535$; striátum $P = 0.5429$). Ezzel szemben a posztnatális fejlődés 8. napján markáns TUNEL-pozitív sejszám növekedést fedeztünk fel a *Cdh2* génkiütött állatok szomatoszenzoros kérgében (+/+ : n = 5, -/- : n = 5; kétmintás t-próba; *** $P < 0.0001$). Továbbá, megfigyeltünk egy TUNEL-pozitív sejtek számában megjelenő eloszlásbeli különbséget is a genotípusok között, ugyanis a legtöbb elpusztult sejt a már említett palliális SVZ területén volt a génkiütött állatokban (+/+ : n = 5, -/- : n = 5; Bin1 and 10: Mann-Whitney U teszt; *** $P < 0.0001$). Így tehát elmondható, hogy az *Cdh2* posztmitotikus interneuronokból való eltávolítását követően a sejtek migrációs defektust szenvednek a posztnatális SVZ -ben, ahol a fejlődés előrehaladtával elpusztulnak.

4.2. A rendellenesen bekövetkező delamináció következménye az agykéreg fejlődése során

4.2.1. *In vivo* cadherin alapú adherens junkció szétkapcsoló modell

Az N-cadherin szerepe a pallium fejlődése során intenzíven kutatott terület. Azonban kevésbé ismert a funkciója patofiziológiás körülmények között, például agykérgi fejlődési rendellenességek során. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a patofiziológiásan kialakuló delamináció következményét, létre hoztunk egy *in vivo* cadherin szétkapcsoló modellt az embrionális agykéregben. Az N-cadherin a fő sejtkapcsoló molekula az adherens junkcióban, mely a radiális glia sejteket egymáshoz rögzíti, így létrehozva a ventrikuláris felszínt. *In utero*, azaz méhen belüli elektroporációt alkalmazva domináns-negatív (Δ nCdh2-GFP) N-cadherin

felhasználásával sikeresen megszüntettük az adherens junkciókat a radiális glia sejtek körül, elkerülve az esetleges funkcionális redundanciát az N- és E-cadherin (Cdh1) között. A modell sikerességét kiválóan indikálta a fibrilláris aktin marker (phalloidin) jel hiánya a Δ nCdh2-GFP elektroporáció után egy nappal. Ezt követően STORM szuper-rezolúciós mikroszkópiával megvizsgáltuk a radiális glia sejtek nyúlványainak épséget. A nestin intermedier filamentumok szerkezetének nanoskálán való rekonstrukciója nem mutatott semmilyen eltérést a Δ nCdh2-GFP elektroporációt követően. Korábbi eredmények alapján tudjuk, hogy a piális felszínen lévő laminin-integrin kötések megbomlása befolyásolja a progenitor sejtek morfológiáját és túlélését. Ezért LAMA1 (laminin subunit alpha 1) immunhisztokémiai festést alkalmazva megfigyeltük, hogy a bazális-radiális glia végtalp kapcsolatok nem szenvedtek károsodást az adherens junkciók szétbomlása után. Azonban a sejt-sejt kapcsolatok megszűnése az elektroporációt követő második napon a ventrikuláris zónát alkotó PAX6-pozitív sejtek kiszóródását okozta az SVZ-be (n = 3 a Δ nCdh2-GFP és a GFP kontroll esetében is; Mann-Whitney U teszt; Bin4: *** $P = 0.0004$; Bin5: *** $P = 0.0003$). Összeségében elmondható, hogy a ventrikuláris zónában a sejt kapcsolatokért felelős N-cadherin eltávolítása a radiális glia sejtek rendellenes delaminációját okozza.

4.2.2. Rendellenes delamináció apoptózist és migrációs zavart indukál az embrionális agykéregben

Korábbi publikációk alapján, miszerint a szöveti környezetből abnormálisan kiszakadó epiteliális sejtek sejthalál útján eliminálódnak a patofiziológias események megelőzése végett, feltételeztük, hogy egy nagyon hasonló preventív mechanizmus létezik a fejlődő agykéregben abnormálisan delaminált progenitor sejtek eltávolítására is. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk ezt a hipotézist TUNEL-festést végeztünk az elektroporált embriók agymetszetein. Két nappal az Δ nCdh2-GFP elektroporáció után körülbelül kétszeresére növekedett a sejthalál az elektroporált területen a kontrollhoz képest. Ezzel szemben az általános kaszpáz inhibitor, Z-VAD-FMK együttes injektálásával meg tudtuk menteni a kiváltott sejthalált (GFP és GFP + Z-VAD-FMK n = 3-3; Δ nCdh2-GFP és Δ nCdh2-GFP + Z-VAD-FMK 4-4 állat; Kruskal-Wallis teszt post hoc Dunn-féle többszörös összehasonlító teszttel; *** $P < 0,0001$: Δ nCdh2-GFP vs bármelyik kontroll, kontrollok között $P \approx 1$). Mindazonáltal nem csak a sejthalált, de korábbi adatoknak megfelelően az adherens junkciók megszakításával egy radiális migrációs defektust is tapasztaltunk, melyet az általános kaszpáz inhibitorral szintén sikerült kivédnünk (n = 3 mindegyik csoportban; Kruskal -Wallis teszt Dunn-féle többszörös összehasonlító teszttel, Bin1 és 4: GFP vs Δ nCdh2-GFP, Δ nCdh2-GFP vs Δ nCdh2-GFP + Z-VAD-FMK *** $P < 0,0001$; Bin2: GFP vs Δ nCdh2-GFP ** $P = 0,0002$; Δ nCdh2-GFP vs Δ nCdh2-GFP + Z-VAD-FMK ** $P = 0,0031$; Bin5: GFP vs Δ nCdh2-GFP,

$\Delta nCdh2$ -GFP vs $\Delta nCdh2$ -GFP + Z-VAD-FMK: $P = 0,0001$). Ezek az eredmények megerősítik azt a hipotézisünket, miszerint létezik egy kaszpáz függő sejthalál mechanizmus, amely eltávolítja a nem megfelelően delaminálódott sejteket a fejlődő agykéregben.

4.3. A patofiziológiásan bekövetkező delamináció hatására kialakuló sejthalál mechanizmusának feltérképezése

4.3.1. Potenciális molekuláris szereplők a cadherin kapcsolatok elvesztésével járó apoptózisban

A sejt-sejt kapcsolatok által kiváltott sejthalálban részt vevő molekulák feltárása céljából a rendelkezésre álló expressziós adatbázisok és az egy sejtből származó RNS szekvenálások *in silico* elemzését készítettük el. Főleg olyan endokannabinoid rendszerhez tartozó fehérjéket kerestünk, melyeknek ventrikuláris zónára korlátozott expressziójuk van. Egér, emberi és az agyi organoidokból készült elemzések során rátaláltunk az úgynevezett *Abhydrolase domain containing 4* (*Abhd4*) szerin hidrolázra, amit korábban anandamid (N-arachidonoyl-ethanolamide) szintetizáló enzimként írtak le. Kromogén *in situ* hibridizációs kísérleteink bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy az *Abhd4* mRNS specifikusan az embrionális telencephalon germinatív zónáira korlátozódott expressziót mutat az agykéreg fejlődése során. *Abhd4* génkiütött alomtársakból azonban hiányzott ez a specifikus mintázat. Szövetminták immunoblottal való elemzésével kimutattuk, hogy az *Abhd4* fehérje szinten is jelen van a fejlődő agyban.

A fejlődő agy germinatív zónái nagyon aktív, folyamatosan osztódó területek, ahol gén expressziót vizsgálni sejt specifikus módon kihívást jelent. Ahhoz, hogy pontosan meg tudjuk állapítani, hogy az *Abhd4* mely sejt típusokban expresszál membránok megjelölésére szolgáló *in utero* elektroporációt végeztünk, melyet fluoreszcens egyedi mRNS detektálással az úgynevezett RNAscope-al kombináltuk. Kísérleteink során az *Abhd4* expresszió pozitív korrelációt mutatott a *Glast1* (*Slc1a3* gén) radiális glia markerrel. Ezzel szemben fordított, azaz negatív korrelációt figyeltünk meg a *Tbr2* (Eomes gén) intermedier progenitor sejtekre jellemző markerrel ($n = 4$ egér; Spearman féle rangkorreláció, *Abhd4* / *Glast1*: $R = 0,48$, $***P < 0,0001$; *Abhd4* / *Tbr2*: $R = -0,27$, $P = 0,0086$). Mivel ezek a germinatív zónák tranziensek a fejlődés során, megvizsgáltuk, változik-e az *Abhd4* előfordulása születést követően. Megfigyeltük, hogy az *Abhd4* expressziós mintázat a kortikális fejlődés során a proliferációs zónákra korlátozódott, születés után a proliferáló progenitorok számával párhuzamosan csökkent. Érdekes, hogy a két fő sejt képzésért felelős terület a felnőtt agyban, az agykérgi SVZ és a hippokampusz szubgranuláris zónája (SGZ) szintén kifejezte az *Abhd4*-et.

4.3.2. Az *Abhd4* génkiütött állatok karakterizálása

A radiális glia sejtek a kortikális fejlődés során két fő funkciót látnak el. Szaporodó idegi őssejtek, melyek hosszú piális felszínhez kapcsolódó nyúlványukkal állványzatot biztosítanak a posztmitotikus neuroblasztok migrációjához. Az előző fejezetben bizonyítékot mutattunk arra, hogy az *Abhd4* a *Glast1*-pozitív radiális glia sejtekben expresszál, így a következőkben megvizsgáltuk, hogy kritikus szerepet játszik-e a fent említett funkciókban. Azonban meglepő módon sem az osztódás S fázisát jelölő BrdU (bromodezoxiuridine), sem az M-fázist indikáló PHH3 (phospho-histone H3) antitestekkel végzett immunhisztokémiai kísérleteink nem mutattak mennyiségi különbségeket a genotípusok között (BrdU: +/+ : n = 6; -/- : n = 4; kétmintás t-próba, $P = 0,323$; PHH3, +/+ : n = 3; -/- : n = 3; kétmintás t-próba, $P = 0,6882$). A radiális glia nyúlványok által kialakított állványzat nanoskálájú architektúrájának elemzéséhez STORM szuper-rezolúciós mikroszkópiát használtunk majd rekonstruáltuk a nestin intermedier filamentumok szerkezetét. Azonban az *Abhd4* testvérpárokból származó mintákon nem találtunk különbséget sem a nestin lokalizációs pontok számában, sem a nestin köteg méretében (Nestin NLP, +/+ : n = 3; -/- : n = 3; kétmintás t-próba, $P = 0,297$; FWHM, +/+ : n = 3; -/- : n = 3; Mann-Whitney U teszt, $P = 0,6882$). Ezen felül az adherens junkciók vizsgálatára, Alexa568-phalloidin festés végeztünk, de nem fedeztünk fel változást az *Abhd4* vad típusú és génkiütött embriók között.

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az *Abhd4* génkiütött állatok kortikális szerkezetének lehetséges változásait, meghatározzuk a sejtek számát és eloszlását különböző sejtípus markerek alapján. A ventrikuláris zónában lévő osztódó progenitorok PAX6 markere azonos eloszlást és mennyiséget mutatott mindkét genotípusba (+/+ : n = 4; -/- : n = 4; kétmintás t-próba, $P = 0,2598$). Ezenkívül sem a TBR1, amely a kortikális lemez posztmitotikus idegsejtjeinek markere, sem a TBR2, az SVZ-ben elhelyezkedő intermedier progenitor sejtek által kifejezett fehérje nem mutatott szignifikáns változást az embrionális testvérpárok között (TBR2: +/+ : n = 3; -/- : n = 3; kétmintás t-próba, $P = 0,1942$; TBR1: +/+ : n = 3; -/- : n = 3; Mann-Whitney U teszt, $P = 0,0741$). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az *Abhd4* nem vesz részt a klasszikus radiális gliára jellemző sejtfunkciókban.

4.3.3. Az *Abhd4* jelenléte elegendő a kaspáz függő sejthalál kiváltásához

Előzetes kísérleteinkben, nem találtunk látható fenotípust a génkiütött állatokban, de figyelembe véve az enzim specifikus expresszióját, feltételeztük, hogy az *Abhd4* funkciója a ventrikuláris zónára korlátozódik mielőtt a posztmitotikus lánysejtek megkezdénék radiális migrációjukat. Hipotézisünk tesztelésére *in utero* elektroporációt végeztünk *Abhd4* tartalmú erős promoterral rendelkező plazmid felhasználásával, így a ventrikuláris zónán kívül is aktív expressziót adva, illetve hosszú ideig képesek voltunk követni az *Abhd4* hatását a fejlődés során. Három nappal a műtétet követően markáns migrációs defektust figyeltünk meg az

Abhd4-GFP elektroporált mintákban a kontroll GFP-hez képest ($n = 4$ állat; Kruskal-Wallis-teszt post hoc Dunn-féle többszörös összehasonlító teszttel; Bin1, 2, 4, 5: *** $P < 0,0001$). Annak bizonyítására, hogy az Abhd4 enzimatis funkciója felelős a talált migrációs zavarért, az enzim konzervált hidroláz doménjében lévő katalitikus szerint glicinné mutáltuk, így létrehozva egy funkcionálisan inaktív Abhd4-et. Az inaktív Abhd4-GFP expressziója nem befolyásolta a piramis sejtek migrációját, bebizonyítva, hogy az Abhd4 enzimatis funkciója szükséges a vándorlás megzavarásáért ($n = 3$; Kruskal-Wallis teszt post hoc Dunn-féle többszörös összehasonlító teszttel; Bin1, 2, 5: *** $P < 0,0001$; Bin4: ** $P = 0,0063$). Ráadásul az Abhd4-GFP expressziója jellegzetes morfológiai változásokat is indukált a fejlődő agykéregben, sejt zsugorodást, a nyúlványok elvesztését és lekerekített sejthalakot figyeltünk meg. A sejteket két fő morfológiai állapota (bipoláris és lekerekített) alapján analízisünk rámutatott, hogy az Abhd4-GFP hatására csökkent a bipoláris, vándorló sejtek száma a kontroll mintákhoz képest ($n = 3$ mindkét csoportban; Kruskal-Wallis-teszt post hoc Dunn-féle többszörös összehasonlító teszttel, Abhd4-GFP vs GFP vagy inaktív Abhd4-GFP: *** $P < 0,0001$; GFP vs inaktív Abhd4-GFP: $P \approx 1$). Az előzőekben említett morfológiai változások a kezdeti sejthalál folyamatának manifesztációját jelenthetik, ezért a következőkben TUNEL tesztet végeztünk az elektroporált agyszeleteken. Két nappal az elektroporációt követően szignifikánsan nagyobb TUNEL-pozitív sejtűrűséget találtunk az Abhd4-et expresszáló mintákban, míg az inaktív Abhd4-GFP, illetve az általános kaszpáz inhibitor használatával ez a jelenség kivédhető volt (GFP; GFP + Z-VAD-FMK és az inaktív Abhd4-GFP: $n = 3$; Abhd4-GFP és Abhd4-GFP + Z-VAD-FMK $n = 4$; Kruskal-Wallis teszt post hoc Dunn-fél többszörös összehasonlító teszttel, Abhd4-GFP vs. kontrollok *** $P < 0,0001$; kontrollok között $P \approx 1$ kivéve az Abhd4-GFP + Z-VAD-FMK kezelést és az inaktív Abhd4-GFP között $P = 0,607$). Összességében ezek az eredmények bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az Abhd4 expressziója kaszpáz függő apoptózist és radiális migrációs defektust vált ki az egér embrionális agykéregében.

4.3.4. Az Abhd4 által kiváltott sejthalál mechanizmusa

Az általános kaszpáz inhibitorral folytatott kísérleteink arra utalnak, hogy az Abhd4-mediált sejthalál a hagyományos intracelluláris apoptotikus útvonalon haladhat tovább. Ennek a hipotézisnek a teszteléséhez két fő apoptózis markert (Cytocrome C: CytC és Cleaved Caspase-3: CC3) választottuk *in vitro* vizsgálatainkhoz. Korrelált konfokális és STORM szuper-rezolúciós mikroszkóp segítségével elsőként felfedeztük, hogy a TOM20 mitokondriális külső membránfehérje pixelintenzitása szignifikánsan csökkent az Abhd4 transzfekció után az inaktív Abhd4-hez képest ($n = 4$ kísérlet; Mann-Whitney U teszt, *** $P < 0,0001$). Ezzel párhuzamosan a CytC STORM lokalizációs pontjainak száma alacsonyabb volt az Abhd4

jelenlétében (n = 4 kísérlet; Mann-Whitney U teszt, *** $P < 0,0001$). A STORM szuperrezolúciós képalkotás teljes kihasználásával külön-külön meghatároztuk az intra- és extramitokondriális CytC lokalizációs pontok eloszlását egy egyedi Phyton szkripttel. A CytC lokalizációs pontok szintje magasabb volt a citoplazmában az Abhd4 transzfekció után, mint a kontroll mintákban, ahol CytC a mitokondriumokban helyezkedett el (n = 4 kísérlet; Mann-Whitney U teszt, *** $P = 0,0003$). Ezen felül megvizsgáltuk a CC3 szintjét Abhd4 jelenlétében és azt találtuk, hogy a CC3 és a GFP kettős pozitív sejtek aránya nagyobb volt ezekben a mintákban, mint az inaktív Abhd4-GFP transzfektált sejtekben (n = 3 kísérlet; Mann-Whitney U-teszt, *** $P < 0,0001$). Fontos azonban megjegyezni, hogy a GFP-negatív CC3-pozitív sejszám nem változott, így elmondható, hogy az Abhd4 által indukált sejthalál sejt autonóm jelenség (n = 3 kísérlet; kétmintás t-próba, $P = 0,5972$). Összefoglalva megállapítottuk, hogy az Abhd4 képes kiváltani az apoptózis intracelluláris formáját, melyet a CytC mitokondriumokból történő felszabadulása és a végső effektor, a kaszpáz-3 aktiválása közvetít.

4.3.5. Az Abhd4 szükséges az adherens junkciók megbomlásával járó sejthalál kialakításához

Figyelembe véve, hogy az Abhd4 génkiütött állatokon nem tapasztaltunk fenotípusos változást, azonban nagyon specifikus ventrikuláris zónai expressziót mutat és a fehérjének erősen sejthalál indukáló szerepe van *in vivo* és *in vitro* is, feltételeztük, hogy az Abhd4 részt vehet a sejt-sejt kapcsolatok megbomlásával kialakuló sejthalál mechanizmusában. Kísérleteink során elsőként megmutattuk, hogy a $\Delta nCdh2$ -GFP elektroporáció ugyan olyan PAX6-pozitív sejt kiszóródással jár mindkét genotípusban, mint ahogyan azt előzőekben is tapasztaltuk, így a delamináció jelensége nem függ az Abhd4-től (n = 3 mindkét genotípusban; Mann-Whitney U teszt, nincs szignifikáns különbség a genotípusok között). Ezzel szemben az N-cadherin alapú kapcsolatok elvesztése miatt kialakuló sejthalál szignifikánsan alacsonyabb volt az Abhd4 hiányában, mint a vad típusú állatok agykérgében (n = 4 mindkét genotípus; Kruskal-Wallis teszt post hoc Dunn-féle többszörös összehasonlító teszttel, *** $P < 0,0001$). Ráadásul, ha az Abhd4 génkiütött állatokban történt műtét során visszapótoltuk az Abhd4-et ko-elektroporációval ismét markánsan megemelkedett a sejthalál (n = 4; Kruskal-Wallis teszt post hoc Dunn többszörös összehasonlító teszttel, Abhd4 -/- vs +/+ és a ko-elektroporáció *** $P < 0,0001$; Abhd4 +/+ vs ko-elektroporáció $P \approx 1$).

A sejthalál fontos szabályozó elem a progenitor sejtek mennyisége és a végső kortikális sejszám egyensúlyának megteremtésében. Korábban bebizonyítottuk, hogy az Abhd4 kulcsszerepet játszik a delamináció által kiváltott sejthalálban, ezért feltételeztük, hogy hasonló funkciója van a fejlődés során bekövetkező sejthalál mechanizmusokban. Embrionális és

posztnatális fejlődés 3. napján megvizsgáltuk az Abhd4 vad típusú és génkiütött állatok agykérgében alapvetően bekövetkező sejthalál szintjét, azonban nem találtunk különbséget a genotípusok között sem E16.5-ben (n = 5 mindkét csoport, Mann-Whitney U teszt, $P = 0,834$), sem P3-ban (+ / +: n = 6; - / -: n = 5; Mann-Whitney U teszt, $P = 0,792$). Végül megvizsgáltuk a felnőtt állatok agykérgét sejtpopulációs markerek segítségével, azonban sem a vGlut1 által jelölt serkentő neuronok, sem a Gad67-pozitív gátló interneuronok és a Glast1 által jelölt asztrociták eloszlásában sem találtunk szignifikáns különbséget az Abhd4 +/+ és -/- egyedek között (n = 3 mindkét genotípusban, kétoldalas Mann-Whitney U teszt, $P > 0,05$ minden paraméter között). Adataink tehát megmutatták, hogy az Abhd4 molekuláris szerepet játszik az N-cadherin kapcsolatok megbomlása által kiváltott sejthalálban, de nem szükséges a normál, fejlődés során bekövetkező sejthalál folyamatokhoz.

4.3.6. Magzati alkohol expozíció Abhd4-függő sejthalált okoz az embrionális agykéregben

A várandós hölgyek körében az egyik legveszélyesebb és leggyakrabban használt teratogén az alkohol. Korábban kimutatták, hogy az alkohol bevitel a terhesség alatt nem csak az agy fejlődését befolyásolja, hanem negatív, hosszú távú károkat is okoz. Az embrionális kéregben az alkohol expozíció rendellenes delaminációt, kérgi migrációs zavarokat és fokozott sejthalált okozhat. Ezért megvizsgáltuk, hogy szerepe van-e az Abhd4-nek az embrionális kori alkohol okozta változásokban. A szubkrónikus, 3 napos kezelés következtében markáns sejthalál növekedést tapasztaltunk az Abhd4 vad típusú állatok agykérgében, míg az Abhd4 génkiütött állatokban a sejthalál a kontrollok szintjére esett vissza (kontroll +/+ : n = 5; kontroll -/- : n = 4; EtOH +/+ : n = 4; EtOH -/- : n = 3; Kruskal-Wallis teszt post hoc Dunn-féle többszörös összehasonlító tesztel, az Abhd4 +/+ vs -/-, illetve kontrollok *** $P < 0,0001$; Abhd4 -/- vs kontroll csoportok $P \approx 1$). Meglepő módon, még egyszeri alkohol bevitel is, az előzőekhez hasonlóan, megnövelte a sejthalál szintjét a fejlődő kéreg ventrikuláris zónájában, ám az Abhd4 hiánya ezt is a kontroll csoportok szintjéig csökkentette (n = 3 minden genotípusban és kezelésben; Kruskal-Wallis teszt post hoc Dunn-féle többszörös összehasonlító tesztel, az Abhd4 +/+ vs -/-, illetve kontrollok *** $P < 0,0001$; Abhd4 -/- vs kontroll csoportok $P \approx 1$). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az Abhd4 elengedhetetlen az anyai alkohol expozíció által kiváltott sejthalál közvetítéséhez az embrionális agykéregben.

5. Konklúzió

Az alábbi Ph.D. disszertáció betekintést nyújt az N-cadherinhez kapcsolódó jelátviteli útvonalak fontos szabályozó mechanizmusába az agykéreg fejlődése során.

Létrehoztunk egy genetikailag módosított egérvonalat, melyben megvizsgáltuk az N-cadherin funkcióját az interneuronok migrációja és érése során. Eredményeink megmutatták,

hogy a *Cdh2* szelektív eltávolítása a posztmitotikus interneuronokból azok migrációs zavarát okozza az embrionális agykéregben. Ezek a vándorló neuroblasztok a posztnatális fejlődés során megragadnak az agykéreg szubventrikuláris zónájában, ahol a fejlődés során meghalnak. Ennek következtében az interneuron összetétel a génkiütött állatok felnőtt kori szomatoszenzoros kérgében sejtípus specifikusan megváltozott. Bizonyítottuk, hogy a *szomatosztatin (SST)* – és *calretinin (Calb2)* – pozitív sejtek száma csökkent míg más interneuron populációk nem sérültek. Végül, megmutattuk, hogy egy speciális szubpopuláció, az SST és Calb2 kettősen pozitív sejtek száma is lecsökkent a génkiütött állatok szomatoszenzoros agykérgében.

Az abnormális delamináció során az N-cadherinhez kötött szignalizáció megismeréséhez *in utero* electroporációt alkalmaztunk, mely során megszakítottuk az adhézions junkciókat az apikális radiális glia sejtek között. Bizonyítékot szolgáltatunk arról, hogy az N-cadherin mediált kötések szelektív eltávolítása migrációs zavart és kaszpáz függő sejthalált okoz a fejlődő agykéreg ventrikuláris és szubventrikuláris zónáiban. Ezen felül, azonosítottunk egy molekuláris szereplőt ebben a folyamatban az úgynevezett Abhydrolase domain containing 4-et (*Abhd4*), mely specifikus expressziót mutat az oldalsó és harmadik agykamra germinatív zónáiban és pozitív ko-expressziót mutat a radiális glia sejt marker *Glast1*-el. Megmutattuk továbbá, hogy az *Abhd4* ektópikus expressziója radiális migrációs defektust és sejthalált okoz. Mindazonáltal, az *Abhd4* enzimatisz aktivitása a mitokondriumokból való citokrómmal c felszabadulást és az aktivált kaszpáz-3 megjelenését indukálja, *in vitro*. Továbbá kísérletesen bizonyítottuk, hogy az *Abhd4* hiánya kivédi az patofiziológiás delamináció során kialakuló sejthalált. Végezetül megállapítottuk, hogy az akut és szubkrónikus alkohol kezelés *Abhd4* függő sejthalált okoz az embrionális agykéreg ventrikuláris zónájában.

6. Publikációk

A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk:

László ZI¹, Bercsényi K¹, Mayer M, Lefkovich K, Szabó G, Katona I, and Lele Z. (2019) *N-cadherin (Cdh2) Maintains Migration and Postmitotic Survival of Cortical Interneuron Precursors in a Cell-Type-Specific Manner*. **Cerebral Cortex** 30, 1318-1329.

Barna L¹, Dudok B¹, Miczán V, Horváth A, László ZI, and Katona I. (2016) *Correlated confocal and super-resolution imaging by VividSTORM*. **Nature Protocols** 11, 163–183.

¹ megosztott első szerzők