

Szelektív sejtes és szinaptikus változások korai  
posztnatális és felnőtt egerek dopaminerg és  
dopaminoceptív agyterületein prenatális valproát  
kezelés hatására

Doktori tézisek

**Finszter Cintia Klaudia**

Semmelweis Egyetem  
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Ádám Ágota, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Adorján István, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. László Kristóf, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Dávid Csaba, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Alpár Alán, az MTA doktora, egyetemi tanár  
Tagok: Dr. Tóth Zsuzsanna, Ph.D., tudományos főmunkatárs  
Dr. Kovács Krisztina, Ph.D., tudományos tanácsadó

Budapest  
2024

## **1. Bevezetés**

### **Autizmus spektrum zavar**

Friss adatok alapján, az autizmus spektrum zavar (ASD) világszerte kb. 1%-os előfordulást mutat és a férfiaknál gyakrabban fordul elő, mint a nőknél (3:1). Az ASD magas és növekvő előfordulási gyakorisága miatt, ez a rendkívül összetett idegrendszeri fejlődési szindróma állt a vizsgálatunk középpontjában. Az autizmus specifikus biológiai okait a mai napig nem sikerült egyértelműen meghatározni. Bár a genetikai tényezők jelentős szerepet játszanak, valószínűsíthető, hogy az okok komplexek, és az idegrendszer fejlődésére ható környezeti tényezők, valamint a gén-környezet kölcsönhatásai is közreműködnek az állapot kialakulásában. Különböző tényezők különböző kombinációi és egymásra gyakorolt hatásai vezetnek a klinikai tünetek sokféleségéhez. Mivel az autizmus alapvetően egy sajátos (atipikus) fejlődés eredménye, így élethosszig tartó állapotnak felel meg. Az ASD jelen tudásunk szerint nem gyógyítható, de intenzív fejlesztéssel az állapot javítható. A jelenleg érvényes DSM-V két fő tartományra osztja az autizmus spektrumát. Az első a szociális interakció nehézségeit írja le. Az érintett személyeknek hiányosságai vannak a szociális érzelmi kölcsönösségben, nem értik a nonverbális kommunikációt vagy nem képesek kapcsolatokat kialakítani és fenntartani. A második tartományba tartoznak a korlátozott és ismétlődő viselkedési és cselekvési mintázatok; az autista személyek bizonyos pillanatokban ismétlődő sztereotip mozdulatokat tesznek, és rendkívüli szorongást tapasztalnak, ha a rutinjukat megváltoztatják, valamint hiper- vagy hiporeaktivitást is mutathatnak szenzoros ingerekre.

### **VPA kezelés, mint az autizmus modellje**

A nátrium-valproát (VPA) egy gyakran használt antiepileptikum, mely blokkolja a nátrium-, és kalcium csatornákat, valamint GABA transzamináz inhibitoroként működik. Ezen terápiásan is kihasználható hatása mellett azonban figyelembe kell venni, hogy erős teratogén mellékhatásai lehetnek.

Hogy a VPA teratogén hatása molekuláris szinten hogyan hozható összefüggésbe az autizmusra specifikus defektusokkal, még nem teljesen érthető, mindenesetre a beavatkozás időablaka kritikus kérdés. Az irodalomban megtalálható korábbi vizsgálatok az ideális időperiódust a VPA beadására prenatális E12-15 nap közé teszik egerek esetében. A 12. nap előtti VPA kezelés nem specifikus teratogén hatások által vetélést okoz, míg a 15. nap után

nincs közvetlen hatás. Ez azt jelzi, hogy a 12. és a 15. nap között olyan fejlődési folyamatok zajlanak, amelyeket jelentősen befolyásolhatnak epigenetikai és környezeti tényezők.

Figyelemre méltó, hogy a VPA adminisztráció optimális időablaka egybeesik a dopaminerg sejtek megjelenésével (amit a tirozin-hidroxiláz (TH) segítségével mutattak ki) az agytörzsben, valamint a későbbi mesotelencephalicus (tegmentostriatalis) pályát alkotó dopaminerg axonok korai fejlődésével. Joggal feltételezhetjük, hogy a VPA zavarhatja ezt a folyamatot, és ezáltal a mesotelencephalicus útvonal célterületeinek fejlődését és mintázatát.

## **Dopaminerg rendszer anatómiája, fejlődése és szerepe**

Már korábban felmerült annak lehetősége, hogy az ASD összefüggésbe hozható a dopaminerg rendszer hibás fejlődésével. Jelen eredményeink megerősíteni látszanak ezt a felvetést, kimutatva az egerek dopaminerg rendszerében az anyai VPA kezelés által kiváltott egyértelmű neuroanatómiai és neurokémiai változásokat.

A dopamin szintézisének nagy része közvetlenül tirozinból történik, de a dopamin közvetetten fenilalaninból is szintetizálható, mivel az L-fenilalanin tirozinná alakítható fenilalanin-hidroxiláz által. A dopamin szintézise két lépésben zajlik a citoplazmában. Először a tirozin-hidroxiláz (TH) a tirozint levodopává (L-DOPA) alakítja. Az L-DOPA-ból ezután dopamin keletkezik DOPA dekarboxiláz által.

A középagyú dopaminerg neuronok egyik csoportja a ventrális tegmentális areából (VTA) a mesocorticalis útvonalon keresztül a prefrontális kéregbe (PFC), valamint a mesolimbicus útvonalon keresztül a nucleus accumbensbe (NAc) vetül. Ezek a pályák együtt alkotják a mesocorticolimbicus rendszert, amely szerepet játszik a jutalmazásban és a motivációban. Ezen felül, ugyancsak a VTA régióból indulnak azok a dopaminerg pályák, amelyek az amygdalába, hippocampusba, a gyrus cinguli-ba és a szaglógumóba vetítenek.

A középagyú dopaminerg neuronok másik csoportját alkotják a substantia nigra pars compacta (SNc) részében lévő dopamin tartalmú neuronok, melyek a striátum területére vetítenek. Az utóbbi nigrostriatális útvonal szerepet játszik a motoros funkciók és a tanulási képességek szabályozásában. A pálya a basalis ganglionokra vetül, ahol befolyásolja a tanult mozgási mintázatok, motivált viselkedések és a kognitív rutinok szabályozását.

A tuberoinfundibuláris pályát a nucleus arcuatusból és nucleus periventricularis hypothalamiból induló dopaminerg neuronok alkotják, melyek az agyalapi mirigybe vetülnek, ezáltal szabályozva az elülső lebenyben a prolaktin kiválasztását.

Ismeretes, hogy a dopamin befolyásolja a célneuronok fejlődését és érését, amint azt a szeletkultúrákon végzett vizsgálatok igazolják. A szociális agyi hálózat részét képező ventrobazális előagy kialakulásában komplex fejlődési folyamat játszódik le, mire a dopaminerg neuronok célpontjaikhoz (dopaminoceptív neuronokhoz) jutnak és kapcsolatuk összeáll. Ha ez a folyamat a dopamin bemenet hiánya miatt az embrionális fejlődés kritikus időpontjában megghiúsul (vagy késik), az egyén gyengébb vagy nem megfelelő választ mutathat a szülés utáni szociális ingerekre.

Egérben az első dopaminerg idegsejtek E10.5 napon jelennek meg a középagy területén. Ezek a sejtek a velőcső ventrális középvezetékén található progenitor sejtekből származnak. Ezek a migráló sejtek végleges pozíciójukat nagyjából az E11.5 napra érik el, itt ketté válnak, és a laterális neuronpopuláció a substantia nigrává fejlődik, míg a helyben maradt neuronok a VTA dopaminerg sejtjeit alkotják. A sejtek az embrionális 12. napon kezdik el termelni a tirozinhidroxilázt (TH), mely segítségével a tirozinnal dopamin szintetizálódik. Nagyjából az embrionális 13. napon indul el az axonnövekedés az előagyi területek felé. A rostok először dorsalis irányba indulnak a hypothalamus felé, aztán fordulnak rostralis irányba. A striatum területét, beleértve a NAc-t, az E16-17 nap környékén érik el a rostok, míg a kérgi területeket csupán a 18-19. nap környékén.

Az ASD-ben megfigyelhető szociális hiányosságok a mesocorticolimbikus (MCL) pálya diszfunkciójának tükröződései lehetnek, tekintve annak szerepét a jutalom és a motiváció terén. A MCL pálya kialakulásában vagy működésében fellépő diszfunkció megváltoztathatja a jutalom reprezentációját és csökkentheti a jutalom keresésére irányuló motivációt.

Kutatócsoportunk által korábban leírt és közölt eredmények kimutatták, hogy az E13.5. napon a prenatális VPA expozíció finom, de jól detektálható zavart okozott a mesotelencephalicus dopaminerg (TH<sup>+</sup>) pályában a születés után, 7 napos egérkölykökben. Az előagyba vetítő pálya axonnyalábjai defasciculálódtak, a kezelt csoportban kevesebb és szórtabb nyálábokat találtak. Továbbá kimutatták, hogy a VTA területén a VPA kezelés hatására csökkent a TH immunpozitív neuronok sűrűsége, míg a SN területén inkább ellentétes változást tapasztaltak.

### **Kalciumkötő fehérjék (CaBP)**

A Ca<sup>2+</sup>-ion kulcsfontosságú és meghatározó másodlagos hírvivő szerepe nagy mértékben függ a kalciumkötő fehérjéktől (CaBP), amelyek képesek specifikus doménekben megkötni ezt az iont. A CaBP-k hozzájárulnak a Ca<sup>2+</sup> koncentrációjának szabályozásához a

citoplazmában, valamint számos sejtfunkcióban részt vesznek. A  $\text{Ca}^{2+}$  transzporter transzmembrán molekulaként a  $\text{Ca}^{2+}$  által modulált receptorként funkcionál, azaz dekódolja a  $\text{Ca}^{2+}$  jeleket. A kalcium ionok ( $\text{Ca}^{2+}$ ) számos sejtjelátviteli kaszkádban fontosak, és a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis hibái stresszhez, akár sejthalálhoz is vezethetnek. A stabil kalciumkoncentráció fenntartása és az ionok fehérjékkel való kölcsönhatásainak közvetítése érdekében számos sejt citoplazmája kalciumkötő fehérjéket tartalmaz.

Tanulmányunkban három, a központi idegrendszerben jelen lévő CaBP-re koncentrálnak: calbindin-D28k (CB), calretinin (CR) és parvalbumin (PV). Ezek különböző neuronpopulációkban expresszálódnak, és a beáramló kalcium puffereelésében játszanak szerepet, ezáltal a sejtek homeosztázisát szabályozzák. A jelenlegi irodalomban meglehetősen kevés információ van arról, hogy a kalciumkötő fehérjék összefüggésbe hozhatóak-e a dopaminerg rendszerrel az autizmusbán.

## **Apoptózis**

A programozott sejthalál (apoptózis) egy fontos mechanizmus, amely meghatározza az agy méretét és formáját, valamint szabályozza a fejlődő neuronhálózatok megfelelő kapcsolódását. Kóros körülmények között az apoptotikus kaszkádok patológiás aktiválása neuroanatómiai rendellenességekhez és esetleg fejlődési fogyatékoságokhoz vezethet. Kimutatták, hogy lehetséges összefüggés van az idegsejtek halála és az autizmus között.

Az apoptózis kimutatására több fehérjecsalád is alkalmas, mint például a B-sejt lymphoma (Bcl-2), P53 transzkripció faktor, cathepsin-D lizoszómális fehérje vagy a kaszpázok. A kaszpázok olyan cisztein-aszparaginsav proteázok, melyek elengedhetetlen résztvevők az apoptózis végső stádiumában.

A jelen tanulmány kiindulópontja az a feltételezés volt, hogy a VTA dopaminerg neuronjai számának csökkenése, továbbá a mesotelencephalicus dopaminerg pálya növekedésének és axonvezérlésének zavara, amely a prenatálisan VPA-val kezelt állatoknál P7-nél megfigyelhető, megzavarhatja a dopaminoceptív célterületekben a neuronális mintázat kialakulását.

## 2. Célkitűzés

Irodalmi adatok és munkacsoportunk korábbi eredményei alapján célul tűztük ki a mesotelencephalicus dopaminerg pályarendszer kvalitatív és kvantitatív morfológiai változásainak vizsgálatát a VPA-val kezelt állatokban, a kiinduló dopaminerg magokban, valamint a dopamint fogadó (dopaminoceptív) agyterületeken.

### **A dopaminerg pályarendszer eddig ismert károsodása milyen sejtszintű változásokkal jár a VPA kezelés hatására?**

I.) Megfigyelhető-e fokozott sejtpusztulás (jelesül: apoptózis) a pályarendszer kiinduló területein, akár célterületein? Érintettek-e ebben a dopaminerg neuronok?

II.) A sejthalál érinthet-e sajátos neuron-populációt, különösképpen a kálciumkötő fehérje tartalmú neuronokat.

III.) Célul tűztük ki a prenatális VPA expozíciót követő apoptotikus és sejtszintű változások (kálciumkötő fehérjék expressziója) és a lehetséges regeneratív folyamatok időbeli követését.

IV.) A mesotelencephalicus pálya kiinduló területein megfigyelhető-e a TH<sup>+</sup> (mint dopamin-marker), valamint CR<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> (kálciumkötő fehérjék) együttes sejtszintű előfordulása (perikariális kolokalizáció)?

### **A mesotelencephalicus dopaminerg pálya redukciója okoz-e változásokat egyes subpallialis célterületek szinaptikus kapcsolataiban a prenatális VPA expozíciót követően?**

V.) Célul tűztük ki egy szinapszis-specifikus protein, a szinaptofizin, TH fehérjével korrelált változásainak vizsgálatát (a NAc és CPu területén) proteomikai (western blot) módszer alkalmazásával.

VI.) Kvantitatív morfometriai, megközelítéssel elemezni kívántuk egyes dopaminoceptív területeken (NAc, TO) a bemenő TH<sup>+</sup> dopaminerg axonok (mint preszinaptikus elem) és a

kálciumkötő fehérjét (CB, CR) tartalmazó neuronok (mint posztzinaptikus elem) közti szinaptikus kapcsolatok változásait.

### **3. Módszerek**

#### **Kísérleti állatok**

A kísérletek elvégzéséhez C57BL/6 törzsből származó egereket használtunk. A kísérletek egy részéhez előre vemhesített 6 hetes egereket használtunk (Janvier Laboratórium, Franciaország), míg a másik részéhez 10 hetes szűz nőstény egereket pároztattunk. A pároztatás során a hímeket 24 órára külön dobozokba helyeztük, majd 2-2 nőstényt helyeztünk melléjük 12 órára. A hímek eltávolítása után, többszöri súlyellenőrzést végeztünk a vemhesség bizonyítására. Az állatokat  $21 \pm 2$  °C közötti hőmérsékleti- és automatikusan szabályozott fényviszonyok (12 óra világos- és sötét ciklusok) között korlátlan hozzáféréssel táplálékhoz és vízhez. A vemhesség 13,5. napján az anyák felének 500 mg/testtömeg-kg valproinsavat (Convulex 100 mg/ml koncentrációjú 5 ml-es ampullák) (VPA-kezelt csoport), a másik felének fiziológiás sóoldatot (0,9%-os nátrium-klorid oldat) (kontroll csoport) adtunk intraperitoneálisan vagy subcutan a tarkótájékon. A születés után a kölykök az anyákkal maradtak 7 napos (P7) korukig. A hosszútávú VPA hatás vizsgálatához olyan kölyköket használtunk, amelyeket a 4. hét után választottunk el az anyjuktól, ivaronként külön tartva 60 napos (P60) korukig. Esetenként azonos kísérletben alomtársakat is használtunk.

#### **Hisztológiai előkészítés**

Az állatok altatását 50 mg/ml ketamin- és 20 mg/ml xilazinból készült altatókoktéll (2:1 keverék; állatoként 0,2 ml) intraperitoneális injekciójával biztosítottuk. Ezt követően transzkardiális perfúziót végeztünk; átmostuk az állatok érrendszerét 20 ml PBS-sel, majd 4 °C-os 4%-os paraformaldehid-oldattal (PFA) fixáltuk a szöveteket. Az agyak egy részét a metszést megelőző 2 napban 0,1%-os Na-azidos PBS-ben kihígított 30%-os cukoroldatba helyeztük. Az üveg aljára süllyedt agyakból 30 µm vastagságú koronális metszeteket készítettünk Leica SM2000R fagyasztó szánka mikrotóm segítségével. Egy másik részét felszálló alkoholsorban víztelenítettük, majd kiöntőformába helyezve kitöltöttük paraffinnal. Az így létrejött paraffin-blokkokat Leica RM2235 manuális rotációs mikrotóm segítségével 10 µm vastagságú koronális vagy szagittális metszeteket készítettünk, melyeket tárgylemezre húztunk fel.



## A minták festése

A metszeteket tárgylemezeken történő deparaffinálását követően megfestettük. 3x10 percig PBS-ben mostuk a metszeteket, majd 0,3%-os PBS-ben kihígított H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldattal kezeltük 20 percen át. A 3x10 perces mosás után, az antitestek aspecifikus bekötődését megelőzve, blokkoltuk a mintákat PBS-ben hígított 5%-os NGS-ben. Ezt követően 0,1%-os Triton-X-100-as PBS-ben kihígított primer antitestekkel (a-TH és a-NF) inkubáltuk a metszeteket 2 órán keresztül. A primer eltávolítása után a metszeteket 3x10 percig PBS-ben mostuk, majd PBS-ben hígított szekunder antitestekben inkubáltuk. Az 1 órás inkubációt követően 2x10 percig PBS-ben, majd 1x 10 percig TRIS-ben mostuk a tárgylemezeket. A metszetekre ezután 1:500 arányban TRIS-ben hígított avidin-biotin komplexet (ABC-komplex) helyeztünk egy órára. Az immunjelölés előhívó oldata TRIS-ben kihígított 3-diaminobenzidin-t (DAB) és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazott. Bizonyos metszeteken az immunhisztokémiai festés után Nissl-festést is alkalmaztunk.

A 7 napos egerek koronális metszeteit az apoptózis kimutatására alkalmas Casp-3 antitesttel kezeltük. Ezt kombináltuk calretinin (CR), calbindin-28K (CB) és dopamin- és cAMP által szabályozott foszfoprotein 32000 (DARPP-32) antitestekkel is, kettős immunhisztokémiai elemzéshez. A P7 napos egerek koronális metszeteit TH antitesttel is megfestettük, kombinálva az ebben a korban jól kifejeződő CR és CB antitestekkel. A hosszútávú hatások vizsgálatához a 60 napos egerek esetében szintén elvégeztük a CB és a parvalbumin (PV) egyszeres immunhisztokémiát.

Mindegyik esetben hasonló volt az alkalmazott technikai eljárás. A szabadon úszó metszeteket 3x 10 percig mostuk PBS-ben, majd 20 percig 0,3%-os PBS-ben kihígított H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldattal kezeltük. Újabb 3x 10 perc mosás után 30 percig blokkoltunk a metszeteket 5%-os normál kecskeszérummal (NGS) elkerülve az antitestek aspecifikus kötődését (a DARPP32 és a TH festéseknél ehelyett normál lószérumot (NHS) használtunk az egész eljárás során). Ezután a megfelelő kombinációjú primer antitestekkel inkubáltuk a metszeteket 24 órán keresztül PBS-ben oldott 0,3%-os Triton-X-100-ban (növelve a membrán permeabilitását) és 1%-os NGS-ban (NHS-ban). Másnap 3x 10 perces PBS mosást követően 1 órára PBS-ben kihígított, megfelelő kombinációjú fluoreszcens szekunder antitestekkel inkubáltuk a metszeteket, sötétben tárolva. A metszeteket átmostuk PBS-ben 3x 10 percig, majd tárgylemezre húztuk. PBS-ben oldott glicerinnel (1:1) lefedtük, majd felhasználásig sötétben tároltuk.

## **Immunreaktív perikarionok vizsgálata**

A megfestett metszeteket Nikon Eclipse E800 fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk és fényképeztük 10x, 20x vagy 40x nagyítású objektívvel. Az immunreaktív perikarionok megoszlását manuális számolással állapítottuk meg az Aperio ImageScope szoftver segítségével. Csak azokat a jelöléseket fogadtuk el sejtestnek, melyek átmérője meghaladta az 5  $\mu\text{m}$  hosszúságot vagy szélességet. A kapott sejtszámokat a terület méretére ( $\text{mm}^2$ ) normalizáltuk. Az elemzéseket vakon, a kezelési csoportok ismeretének hiányában végeztük el. A számlálást egy koronális metszetre eső mindkét oldali agyfélben elvégeztük, viszont az értékeket nem átlagoltuk, mivel esetenként előfordult, hogy az egyik oldal sérült volt.

## **Volumetriás denzitás és térbeli elrendeződés**

A preparátumok befotózásához Zeiss Jena, LSM 780 konfokális lézer mikroszkóp segítségével Z-stack képeket készítettünk 40x nagyítású objektívvel (Z koordináta kezelési csoportonként megegyező, ám területenként eltérő vastagságú (10-20  $\mu\text{m}$  között), egyes optikai síkok között egységesen 2  $\mu\text{m}$  távolsággal). A képeket HP Z4 vezérlőrendszerű Imaris 9.9.1. verziójú szoftvercsomaggal elemeztük. A  $\text{TH}^+$  axonok (mint preszinapszisok) és a  $\text{CR}^+$  vagy  $\text{CB}^+$  sejtestek és dendritjeik (mint posztszinapszisok) közötti felületi érintkezésének kvantitatív elemzéséhez már korábban leírt módszereket alkalmaztuk. A vizsgált területeken megegyező méretű mérőkeretet helyeztünk el a koronális metszetek mindkét oldalán. Az Imaris program lehetővé tette a vizsgált régió belüli minták immunreaktív sejtjeinek 3D-s rekonstrukcióját.

Az Imaris szoftverben elérhető 2 lehetséges megközelítést alkalmaztunk a kvantitatív elemzésekhez. Az első módszerünk esetében a  $\text{CR}^+/\text{CB}^+$  és a  $\text{TH}^+$  szerkezeti elemek burkoló felületének térbeli hálózatát vizsgáltuk, ahol a renderelt felszínek közötti távolság 0  $\mu\text{m}$  volt. Ahhoz, hogy egységesen összehasonlíthatóak legyenek a minták, a fluoreszcens küszöbértéket a legoptimálisabb érzékelhetőségre állítottuk be, egységesen 11%-ra. Az érintkező felületek által a teljes térfogat százalékában kifejezett térfogatot automatizált 3D számítással mértük. Az automatizált számítás konzisztenciáját ellenőrizve, a  $\text{TH}^+$  axonok mellé rendeltük a  $\text{CR}^+/\text{CB}^+$  struktúrákat, majd ezt megfordítva, a  $\text{CR}^+/\text{CB}^+$  sejtestek és dendritek mellé rendelve a  $\text{TH}^+$  struktúrákat azonos értékeket kaptunk.

A második módszer során egy 'spot' detektáló funkciót alkalmaztunk a preszinaptikus  $\text{TH}^+$  axonok azonosítására. Csak azokat az immunpozitív jeleket vettük figyelembe, melyek elérték vagy meghaladták az 1  $\mu\text{m}$  átmérőt, egységesen 5,5%-os fluoreszcencia intenzitás

küszöbérték mellett. A program automatikusan leszámolta a kritériumoknak megfelelően generált pontszerű elemeket. A TH<sup>+</sup> axonok ('spot') és a CR<sup>+</sup> vagy CB<sup>+</sup> sejtestek, illetve dendritjeik 3D-s rekonstrukcióval renderelt felszínek közötti juxtapozíciók kvantifikálásához közvetlen vagy perem-érintkezést feltételezve, a felületek közötti távolságot 0 µm-re vagy 1 µm-re állítottuk be.

Az azonos sejten belüli kolokalizáció (koexpresszió) kimutatására az Imaris szoftver 'Coloc' funkcióját alkalmaztuk. Ez a módszer lehetővé tette a kolokalizált voxelek leszámolását, ezáltal százalékosan meghatározhattuk a TH<sup>+</sup> és CR<sup>+</sup> vagy TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> jelölések együttes kifejeződését az adott mintavételi ablakban.

### **Agyminták disszekciója**

Az immunoblothoz 22 vegyes ivarú, P7 napos egérkölyköt használtunk fel. A fixálatlan agyakat egy acél agymátrixba helyeztük, melynek segítségével megközelítőleg azonos területről, nagyságrendileg azonos vastagságú (1 mm) koronális metszeteket készítettünk. A szeletek további preparálását jeget tartalmazó alumínium dobozon végeztük sztereomikroszkóp segítségével. 10-20 mg tömegű szövetmintákat vettünk bilaterálisan a NAc és a CPu területéről. Az eltávolított NAc szövetblokkok fő részét a nucleus accumbens core és shell része tette ki, de mellette tartalmazta még a septum, a bed nucleus of stria terminalis és a nucleus entopeduncularis egy részét, a substantia innominata-t, a tuberculum olfactorium-ot és a commissura anterior-t. A CPu-ként eltávolított szövetblokk továbbá tartalmazta még a pallidum externum egy részét a capsula interna rostjaival. A disszekált mintákat előre mérlegelt Eppendorf csövekbe helyeztük, a bilaterális mintákat egyként kezelve, majd felhasználásig száraz jégen, azt követően pedig -80 °C-os fagyasztó hűtőben tároltuk.

### **Western blot és immunfestés**

A mintákat 4 °C-os, pH 8.0 lizáló pufferben (150 mM NaCl, 1%-os 4-nonilfenil-polietylén-glikol (NP40), 0,5%-os nátrium-dezoxikolat, 0,1%-os nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 50 mM Tris) homogenizáltuk. Ezt követően 10 percig 4 °C-on 1200 fordulatszámon centrifugáltuk a mintákat, hogy a fehérjetartalom szétváljon a nehezebb sejtes alkotóktól, közte a mag-frakciótól. A felülúszót átpipettáztuk új Eppendorf csövekbe, majd 15000 fordulatszámon újra centrifugáltuk 20 percen keresztül, 4 °C-on. A durva szinaptoszóma-frakciót tartalmazó üledéket oldottuk fel és használtuk fel a továbbiakban. Ezt követően az

összes mintát azonos fehérjekoncentrációra hígítottuk (1,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), amit a Bio-Rad iMark Microplate Reader segítségével állítottunk be. A mintákat Laemmli pufferben (Sigma-Aldrich) oldottuk fel, majd 5 percen át, 96 °C-on hevítettük. Felhasználásig -80 °C-os hűtőben tároltuk. Bio-Rad Mini Protean III függőleges elektroforézis és blotrendszerrel segítségével a mintákat először 8%-os akrilamid gyűjtőgélre futattuk 30V feszültségnél 20 percen keresztül. Ezt követően 150 V-re növeltük a feszültséget, 1-1,5 órára, amíg a 13%-os feloldógélen kellően elkülönültek a mintasávok. Ezután a szétválasztott mintákat 0,45  $\mu\text{m}$  pólusméretű, Bio-Rad nitrocellulóz membránra transzferáltuk 90 V feszültségen, 2 órán keresztül.

A nitrocellulóz membránokat 7,4 pH-jú 0,05 M TBS-T (Tris-puffer sóval 0,1 %-os Triton-X-100-zal) pufferben kihígított 5%-os zsírszegény tejben inkubáltuk 1 órán át 22 °C-os hőmérsékleten. Ezt követően  $\alpha$ -syn,  $\alpha$ -TH és  $\alpha$ - $\beta$ -aktin primer antitestek keverékével inkubáltuk a membránokat 24 órán át 4 °C-on, melyet 1%-os zsírszegény tejben kihígítottunk ki. Másnap 3x10 percig mostuk a membránokat PBS-ben. A mosást követően 1 órára szekunder antitestek keverékében inkubáltuk. A blotokat lumineszcens detektálórendszerrel (Bio-Rad ChemiDoc MP) kvantifikáltuk, majd az adatokat  $\beta$ -aktinra standardizáltuk. Az analízist az ImageLab szoftver segítségével végeztük.

## **Statisztikai analízis**

Az eredmények statisztikai elemzéséhez a koronális metszetek bilaterálisan leszámolt vagy lemért adatait dolgoztuk fel a R Studio statisztikai program segítségével. A két oldal értékeit nem átlagoltuk (így a grafikonokon is külön adatpontokként jelenítettük meg), mert előfordult, hogy a koronális metszet egyik oldala sérült volt. Az analízis során az azonos metszet két oldalán mért adatokat nem kezeltük statisztikailag függetlenként. Esetenként azonos kísérletben, azonos kezelési csoportban (kontroll vagy VPA) alomtársak is szerepeltek, melyeket az állatazonosítók mellett szintén random faktorként illesztettük a modellbe az elemzés során. Mivel az adatpontok eloszlása az adott területeken nem egyenletes, a kezelés hatásainak meghatározásához negatív binominális regresszió alapuló általánosított lineáris kevert modell-t (generalized linear mixed model) alkalmaztunk, az adatok logaritmikus transzformációját követően.

## 4. Eredmények

### Dopaminerg rendszerben bekövetkező változások

Kimutattuk és megerősítettük, hogy a mesotelencephalicus dopaminerg pálya immunjelölése jelentősen csökkent a 7 napos egérkölyökben a prenatális VPA kezelés hatására. Mivel a neurofilamentum festés nem mutatott eltérést a kezelési csoportok között, így kizárhatjuk annak a lehetőségét, hogy az agypályák általános károsodásáról lenne szó. Tehát a megfigyelt jelenség valószínűsíthetően a TH immunreaktív rostok szelektív csökkenésének tudható be. Ezt alátámasztja kutatócsoportunk korábbi eredménye, ahol iDISCO módszerrel TH-val festett teljes agyak kvantitatív elemzése során jelentős csökkenést figyeltek meg a mesotelencephalicus dopaminerg axon-nyalábok számában. A pályarendszer fejlődésének a megfelelő időablakban beadott prenatális VPA hatására észlelt zavarából kiindulva, logikus lépésként megvizsgáltuk a dopaminerg kiinduló- és a dopaminoceptív célterületek változásait. A VTA területén a TH<sup>+</sup> sejtek száma lecsökkent a VPA kezelés hatására, míg a SN területén ezzel inkább ellentétes változást figyeltünk meg. Ennek oka lehet, hogy a VTA és a SN területén található dopaminerg neuronok eltérő fejlődést mutatnak, mely indokolhat különböző válaszreakciókat a prenatális VPA kezelés hatására.

### Apoptózisbeli változások

A mesotelencephalicus pálya és a VTA dopaminerg neuronjainak redukciója indokolta az apoptózis vizsgálatát. Az eredményeink arra utalnak, hogy a VPA kezelés hatására általános apoptózis-növekedés lép fel mind a pallialis (anterior cingulate cortex (ACC), retrosplenial cortex (RSC)), mind a subpallialis (CPU, lateral septum (LS), bed nucleus of stria terminalis (BNST)) területeken. A mesotelencephalicus pálya egyik fontos célterületén (NAc) nem tapasztaltunk szignifikáns apoptózis-növekedést, habár a változás iránya nem mondott ellent az általános trendnek. Ennek egy lehetséges oka, hogy P7 napos egerek apoptózis szintje általánosan magas, hiszen ilyenkor zajlik a központi idegrendszer második posztnatális apoptotikus hulláma. Ezen felül, P7 napos kontroll egérben éppen a NAc területén a legnagyobb a Casp-3 immunpozitív neuronok sűrűsége, így a magas alapértékhez képest már nem tudunk szignifikáns változást kimutatni.

## **Kálciumkötő fehérjék változásai**

A kálciumkötő fehérjék közül a CR és CB immunpozitív neuronok sűrűségét és eloszlását vizsgáltuk P7 napos egérkölyökben. A CR vizsgálata során a pallialis területeken találtunk szignifikáns csökkenést (ACC, posterior cingulate cortex (PCC), RSC), míg a subpallialis területeken nem tapasztaltunk változást (NAc, CPU, LS, BNST). A mesotelencephalicus pálya eredő területein a kálciumkötő fehérjéket tartalmazó neuronok a VTA területén nagy mértékben, míg a SN területén kis mértékben koexpresszálódtak a TH fehérjével. Továbbá, mindkét vizsgált régióban, a CR<sup>+</sup> sejtek fokozott expressziót mutattak a VPA kezelés hatására, ám ez a tirozin-hidroxilázzal koexpressziót mutató sejteket nem érintette.

Ami a kálciumkötő fehérjék és az apoptózis között fennálló kapcsolatot illeti, általában elmondhatjuk, hogy nem találtunk ilyen korrelációt sem a CR, sem a CB esetén, az általunk vizsgált agyterületeken. Egyetlen kivételképpen, a CB immunpozitív neuronok szelektíven csökkentek a VPA kezelés hatására a P7 napos állatok CPU-ja területén. Itt, a CB<sup>+</sup> neuronok csökkenése negatívan korrelál van a Casp-3 pozitív sejtek számának növekedésével, ami jelentheti azt, hogy kevesebb CB expresszió több apoptózishoz vezetett az érintett neuronokban. Ez tükrözheti az optimális Ca<sup>2+</sup>-szint neuroprotektív hatását, amelyben a CaBP-ek akár kulcsfontosságúak is lehetnek a sejtek túléléséhez. Úgy tűnik, hogy terhesség alatti VPA expozíció hatására károsodott Ca<sup>2+</sup>-homeosztázis a striatumban P7 napos korban még kimutatható. Ezzel szemben, a fiatal felnőtt, 60 napos korra, ez a változás kompenzálódik. Ez az észlelet azért jelentős, mert a VPA által okozott elváltozás regenerációjának lehetőségét (legalábbis a CPU régió megnövekedett ellenálló képességét) jelezheti, mellyel a korai sejtkárosító hatások helyreállíthatók.

Ezt az elképzelést látszik megerősíteni a PV látszólagos stabilitása, amely nem reagál a prenatális VPA expozícióra 60 napos egerekben. Hangsúlyozni kell, hogy 7 napos egerekben még nem expresszálódik a PV.

## **Szinaptikus változások a dopaminoceptív területeken**

Az előagyi célterületekre vetülő mesotelencephalicus dopaminerg pálya fejlődésének kezdete a VPA expozíció időablakával esik egybe, ám az axonok végső arborizációja és a szinapszisok kialakulása a posztnatális 7 napos korban még nem fejeződik be. Ez alapján

következtettünk arra, hogy a dopaminoceptív célterületek szinapszisai jelentősen érintettek lehetnek a VPA kezelés hatására.

Proteomikai méréseink során, a prenatális VPA kezelést követő TH fehérje csökkenést csak nem szignifikáns trendként tudtuk kimutatni a NAc-ben (CPu-ban nem volt változás). Azonban amikor a TH értéket a szinapszis-specifikus protein (szinaptofizin) párhuzamosan mért (önmagában nem csökkenő) értékével normalizáltuk, a TH csökkenése a VPA-val kezelt állatokban már szignifikánsan kimutatható volt. Ezt úgy értékelhetjük, hogy a TH<sup>+</sup> axonok erős redukciót szenvednek a rendelkezésre álló szinaptikus helyekhez viszonyítva. Tehát, a TH<sup>+</sup> axonok szinaptizációs valószínűsége a NAc-ben (különösen, hogy a western blot minta 'NAc'-nek nevezett része a TO-t is tartalmazta) szemmel láthatóan csökkent.

A másik kvantitatív hisztológiai módszerrel megállapított juxtapozíció-változások közvetve az adott szinaptikus kapcsolatok sűrűségének hasonló változásaira utalnak.

### **A dopamin tartalmú axonok és a kalciumkötő fehérje-tartalmú neuronok kapcsolatai a dopaminoceptív célterületeken**

Joggal merül fel a kérdés, hogy a mintázat kialakulásában és a szinaptikus szerveződésben megfigyelt változások milyen mértékben tulajdoníthatók a limbikus előagy redukált dopaminerg bemenetének. Ezen kérdés megválaszolása érdekében, megvizsgáltuk a NAc és a TO célterületeken a TH tartalmú axonok és CR-t vagy CB-t expresszáló sejtestek és dendritek kapcsolatait.

A NAc core területén a TH<sup>+</sup> és CR<sup>+</sup> struktúrák közti juxtapozíciók jelentősen csökkentek a VPA-val kezelt csoportban, míg a TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> struktúrák közti juxtapozíciókban nem figyeltünk meg hasonló változást. A CB<sup>+</sup>, CR<sup>+</sup> elemek teljes értékében sem mutatkozott változás a felület-rendereléses módszerrel. Korábban más mérési technikával is hasonló eredményeket kaptunk, miszerint nem észleltünk változást a CB<sup>+</sup> vagy CR<sup>+</sup> perikarionok mennyiségében a P7 egerekben.

A TO striatum és ventralis pallidumhoz legközelebb eső III. rétegében vizsgálatunk a P7 napos egérben található CB<sup>+</sup> neuronokra irányult. A NAc-ben tapasztaltakkal szemben, a TO területén TH<sup>+</sup> és a CB<sup>+</sup> elemek között lényegesen kevesebb juxtapozíciót figyeltünk meg a VPA-kezelt csoportban.

Megjegyzendő, hogy a CaBP-t expresszáló sejtestek reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos képeken korábban alkalmazott denzitásmérését kiegészítettük az összes CB<sup>+</sup> szövetelem mérésével, felület-renderelés alapján. Figyelemre méltó, hogy míg a TO területén a

CB<sup>+</sup> perikarionok számolása esetén nem találtunk különbséget, a felület-rendereléses módszer jelentős CB csökkenést mutatott a VPA-val kezelt állatokban. Ez az eredmény arra utalhat, hogy nem maga a perikarion-szám, hanem a CB<sup>+</sup> neuronok nyúlványrendszere redukálódott, ami megmagyarázná az általunk megfigyelt TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> közti juxtapozíciók csökkenését. Ám ezt a változást az is indokolhatja, hogy a VTA felől érkező TH<sup>+</sup> axonok mennyisége szintén csökkent a kezelt P7 napos egerek TO-jában, míg a NAc core-ban a felület-rendereléses módszerrel mérve, ezek nem mutattak szignifikáns változást a kezelés hatására.

Észleleteink, miszerint jelentősen csökkentek a TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> közti juxtapozíciók az TO-ban, valamint a TH<sup>+</sup> és CR<sup>+</sup> közti juxtapozíciók a NAc-ben, alátámasztják azt a feltevést, hogy csökken azon dopaminerg rostok előfordulása, amelyek szinaptikus kapcsolatokat hoznak létre (jelen esetben különböző kalciumkötő fehérjékkel), a ventrobazalis előagy legalább két dopamin-recipiens régiójában a NAc-ben és a TO-ban.



## 5. Következtetések

- I. A VPA kezelés hatására fokozott apoptózist figyeltünk meg számos vizsgált régióban, beleértve a mesotelencephalicus pálya kiinduló területeit (VTA, SN), valamint a fogadó területek közül kérgi (ACC, RSC) és szubkortikális (CPu, BNST, LS) régiókat. A változások nem érintik szelektíven a dopaminerg neuronokat.
- II. A CaBP-k közül a CR expressziója csökkent a vizsgált pallialis régiókban, legjelentősebben a retrosplenialis kéregben (RSC), míg a subpallialis területeken nem változott P7 napos egereknél. A VPA-val kezelt állatoknál P7 korban a CB expressziója szelektíven csökkent a CPu területén míg a többi vizsgált területen nem változott. A parvalbumin (PV) sejtek nem mutattak jelentős választ a VPA kezelésre 60 napos korban. A CaBP-immunreaktív neuronok és az apoptotikus (Casp-3<sup>+</sup>) sejtek között nem találtunk kolokalizációt.
- III. Míg a CB P7 korban szelektíven csökkent a CPu-ban a VPA-val kezelt állatoknál, ez a különbség P60 korra eltűnt, ami lehetséges regeneratív mechanizmusra utal.
- IV. A kalciumkötő fehérjéket tartalmazó neuronok a VTA területén nagy mértékben, míg a SN területén kis mértékben koexpresszálódtak a TH fehérjével. Mindkét közepagyti magban fokozott expressziót mutattak a CR<sup>+</sup> sejtek VPA kezelés hatására, ám ez a TH-val koexpressziót mutató sejteket nem érintette.
- V. A proteomikai eredmények a TH csökkenését jelzik a NAc-ban, de a CPu-ban nem, anélkül, hogy a szinaptikus fehérje, a szinaptofizin egyidejű csökkenése megfigyelhető lenne, ami a dopaminerg szinapszisok szelektív károsodására utal.
- VI. A VPA-val kezelt egerekben a NAc-ban a TH<sup>+</sup> és CR<sup>+</sup>, míg a TO-ban a TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> közti juxtapozíciók redukciót szenvedtek, továbbá a TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> elemek térfogataránya is jelentősen csökkent.

A ventrobasisalis előagyai célterületek megváltozott dopaminerg bemenete a késői embrionális fejlődés során valószínűleg megzavarja a neurális és szinaptikus architektúra fejlődését és megszilárdulását. A neuronális mintázatban bekövetkező tartós változások (amelyeket itt egyes dopamin-recipiens interneuronok csökkent szinaptikus bemeneteként észleltünk) éppen azokban a ventrobasisalis előagyai régiókban jönnek létre, amelyek különösen a motiváció és jutalmazás szempontjából fontosak.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

**Finszter CK**, Kemecei R, Zachar G, Ádám Á, Csillag A. Gestational VPA exposure reduces the density of juxtapositions between TH+ axons and calretinin or calbindin expressing cells in the ventrobasal forebrain of neonatal mice. *Front Neuroanat.* 2024 doi: 10.3389/fnana.2024.1426042.

**Finszter CK**, Kemecei R, Zachar G, Holtkamp S, Echevarría D, Adorján I, Ádám Á, Csillag A. Early cellular and synaptic changes in dopaminergic forebrain regions of juvenile mice following gestational exposure to valproate. *Front Neuroanat.* 2023 doi: 10.3389/fnana.2023.1235047.

### A disszertációtól független közlemények:

Bruzsik B, Biro L, Zelena D, Sipos E, Szevik H, Sarosdi KR, Horvath O, Farkas I, Csillag V, **Finszter CK**, Mikics E, Toth M. Somatostatin Neurons of the Bed Nucleus of Stria Terminalis Enhance Associative Fear Memory Consolidation in Mice. *J Neurosci.* (2021) 41(9):1982-1995. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1944-20.2020.

Adorjan I, Tyler T, Bhaduri A, Demharter S, **Finszter CK**, Bako M, Sebok OM, Nowakowski TJ, Khodosevich K, Møllgård K, Kriegstein AR, Shi L, Hoerder-Suabedissen A, Ansorge O, Molnár Z. Neuroserpin expression during human brain development and in adult brain revealed by immunohistochemistry and single cell RNA sequencing. *J Anat.* (2019) 235(3):543-554. doi: 10.1111/joa.12931.