

Nanoszkópiás képalkotási eljárások alkalmazása az idegrendszer molekuláris plaszticitásának vizsgálatában



Csapóné Miczán Vivien

PhD disszertáció

Témavezetők:

Prof. Katona István

Dr. Horváth András

PÁZMÁNY PÉTER KATOLIKUS EGYETEM
INFORMÁCIÓS TECHNOLÓGIAI ÉS BIONIKAI KAR
ROSKA TAMÁS MŰSZAKI ÉS TERMÉSZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Budapest, 2020.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni a témavezetőimnek, Dr. Katona Istvánnak a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Intézetéből (MTA-KOKI) és Dr. Horváth Andrásnak a Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai és Bionikai Karáról (PPKE-ITK) a rengeteg odafigyelést, tanácsot, tapasztalatot és tudást, amit az évek során kaptam tőlük, és azt, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért. Szemléletformáló volt számomra az, ahogyan végzik a kutatásaikat, és foglalkoznak a diákjaikkal.

Köszönöm a rengeteg technikai segítséget Pintér Balázsnak és Tischler Erikának, valamint, hogy sokat tanulhattam tőlük a kísérletek precíz elvégzéséről. A mikroszkópos képek elkészítésében és az eszközök használatának magabiztos elsajátításában az MTA-KOKI Nikon Mikroszkóp Központjának munkatársai, Dr. Barna László és Dr. Pongor Csaba voltak a segítségemre, valamint a Nikon Európa, a Nikon Ausztria és az Auro-Science Consulting Kft. munkatársai biztosították a háttértámogatást.

Köszönöm az MTA-KOKI Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriumában dolgozó kollégáim dolgozatban tárgyalt projekteken nyújtott segítségét: Dr. László Zsófiának az RNAscope kísérletekben vállalt úttörő szerepét, Barti Benjáminnak, Dr. Kenesei Katának és Dr. Kisfali Máténak az egyedi sejtek töltését és az elektrofiziológiai elvezetéseket. Továbbá köszönettel tartozom az útmutatásért, motivációért, eltanult praktikákért: Dr. Lele Zsoltnak, Balla Gyulának, Zöldi Miklósnak, Dr. Ana Bernalnak, Dr. Horváth Eszternek, Fodor Bálintnak, Dr. Prokop Susannának, Mógor Fruzsínának, Dr. Katona-Urbán Gabriellának, Dr. Stephen Woodhamsnek, Dr. Marco Ledrinek, köztük külön köszönettel Dr. Dudok Barnának, aki TDK hallgatói időszakom alatt a konzulensem volt, valamint a kutatócsoportban az ott töltött éveim alatt megforduló további kollégáimnak, hallgatóknak és vendégkutatóknak is. Turbucz Sándortól (MTA-SZTAKI) sokat tanultam a programozásról és a projektorientált szemléletről.

Hatalmas köszönettel tartozom azoknak a tudományos diákköri hallgatóknak, akiknek a képzésében konzulensként részt vehettem: Dr. Kelemen Krisztinának a Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetemről és Glavinics Judit Rékának a Pázmány Péter Katolikus Egyetemről. Képzésük alatt én is rengeteget tanultam, mind tudományos, mind emberi tekintetben, és remek érzés volt látni, ahogy egyre jobban be tudtak kapcsolódni a kutatómunkába önálló kísérletekkel, ötletekkel, valamint a kari és országos Tudományos Diákköri Konferenciákon is szép eredményeket értek el munkájuk bemutatásával.

Szeretném megköszönni külföldi kollaborátoraink segítségét, köztük kiemelten Dr. Miriam Melisnek, akivel az anyai kannabisz hatás projektben dolgoztunk együtt, és ez alatt rendkívül sokat tanultam tőle küzdésről, kitartásról, motivációról; mind szakmailag, mind

emberileg kitűnő mentornak bizonyult. Egyúttal szeretném megköszönni mindenkinek a munkáját, aki a kutatási témában valamilyen formában dolgozott: Roberto Frau, Francesco Traccis, Valeria Serra, Silvia Fanni és Mauro Congiu a viselkedési kísérletekben, Pierluigi Saba és Paola Devoto az agyi mikrodialízis mérésekben, Claudia Sagheddu, Valeria Serra és Sonia Aroni a kísérleti állatok kezelésében, Sonia Aroni és Joseph F. Cheer a DREADD kísérletekben vettek részt.

Hálával gondolok azokra az emberekre, akik valahogyan hozzájárultak ahhoz, hogy a kutatói pályát válasszam: általános- és középiskolai tanárimra, akik mindig motiváltak és segítettek céljaim elérésében. Külön köszönöm Dr. Bondár Elek munkáját, aki az első tudományos projektem mentora volt és néhai osztályfőnökömnek, Kuzskó Sándornak, hogy mindig hitt bennem és támogatott.

Köszönöm a Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola vezetőinek, tagjainak, hogy részt vehettem a képzésben, az egyetem munkatársainak, akik segítségével ez nem valósulhatott volna meg, különös tekintettel Dr. Vida Tivadarnéra, valamint köszönöm a PPKE-ITK és MTA-KOKI PhD hallgatóinak is a motiváló közeget.

Hálával tartozom férjemnek, kisfiamnak, családomnak és barátaimnak, hogy átsegítettek a nehezebb pillanatokon, és támogattak a doktori képzés minden percében.

A jelen dolgozatban bemutatott projektekhez a következő szervezetek nyújtottak anyagi támogatást: az Emberi Erőforrások Minisztériumának Új Magyarország Kiválósági Programja (ÚNKP-18-3), a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (VKSZ_14-1-2015-0155), a Magyar Tudományos Akadémia Lendület programja (LP2013-54), a Nemzeti Agykutatási Program (2017-1.2.1-NKP-2017-00002), és a Nemzetgazdasági Minisztérium (VEKOP-2.2.2-15-2016-00013). Külföldi kollaborátoraink részéről a Cagliari Egyetem (RICCAR 2017, 2018), Fondazione Banco di Sardegna (F71117000200002), European Molecular Biology Organization (ASTF 371-2016), Fondazione Zardi Gori, National Institute of Health (R01DA022340, R01NS099457, R01DA044925) finanszírozták a kutatást.

Kivonat

Az agy működésének megértése, sejtjeinek bonyolult kapcsolatrendszere, diverzitása, a szinapszisok sokfélesége és változékonysága, és az ezen funkciók mögött meghúzódó fehérjék változatossága miatt egy hihetetlenül kockázatos vállalkozásnak ígérkezik. Azonban korunkban egyre több és több új, hatékony módszer áll rendelkezésünkre, hogy vizsgálni tudjuk ezt a rendkívüli komplexitást. Csoportunkban korábbi munkánk során kifejlesztettünk egy olyan mikroszkópiás módszert, mellyel egyszerre vagyunk képesek egyedi sejtípusok, sejtek, sejtservecskék jelölésére, és azokon belül tudjuk vizsgálni egy-egy kiválasztott fehérje mennyiségét, nanoskálájú elhelyezkedését. Az így megvalósított korrelált konfokális és szuper-rezolúciós mikroszkópia tehát arra ad eszközt a kezünkbe, hogy ezen molekuláris adatok alapján következtethessünk a vizsgált fehérjék sejtben belül betöltött szerepére. Dolgozatomban két olyan tudományos kutatást mutatok be, ahol kihasználtuk ennek a korrelált módszernek az előnyeit.

Az első munkában az egér hippocampusz, a bazolaterális amygdala és a szomatoszenzoros kéreg területén található, a kannabinoid receptor 1-es típusát (CB₁) kifejező gátló idegsejt csoport karakterisztikus kalciumkötő fehérjéit kerestük. Abban bízunk, hogy hasonlóan a többi interneuron típushoz, ezzel egy széles körben használható markerre teszünk szert, valamint ezen fehérjék ismeretével közelebb kerülhetünk annak a megértéséhez, hogy hogyan alakulnak ki a CB₁-es interneuronok különleges élettani tulajdonságai, mely alapján betöltik nélkülözhetetlen hálózati szerepüket. Egy számítógépes egysejt-mRNS szekvenálási adatbázisból indultunk ki, és azt találtuk, hogy az N-terminális EF-kéz kalciumkötő fehérje 1-es és 2-es típusa (NECAB1 és NECAB2) jó jelöltek lehetnek a további kutatásokhoz. A továbbiakban az adatbázis alapján nyert információkat kísérletesen is megerősítettük, először mRNS-szinten, majd fehérje szinten populációs és egyedi sejt vizsgálatokkal. Ezután pedig nanoskálájú méréseket végeztünk korrelált konfokális és szuper-rezolúciós mikroszkópia segítségével, melynek során kimutattuk a két fehérje mennyiségi és eloszlásbeli különbségeit az idegsejtek különböző részeiben.

A második kutatási témában Δ^9 -tetrahydrokannabinollal (THC) kezelt patkány anyák utódjaiban vizsgáltuk a vegyület hatását a dopaminerg jutalmazó rendszerre. Megmutattuk, hogy a ventrális tegmentális területen (VTA) a kezelés nem okoz a dopaminerg sejtek számában eltérést, és a CB₁ receptorok száma sem változik, azonban a dopaminerg sejtek bemenetein szinapszis-specifikus átrendeződés történik. Megváltozik a serkentő szinapszisok száma és erőssége, valamint a gátló szinapszisok erőssége is, melyet szintén a korrelált mikroszkópiával mutattunk meg. Ezután kollaborátoraink közreműködésével feltártuk ennek elektrofiziológiai és viselkedésbeli okait és következményeit, majd egy lehetséges kezelési módszert is teszteltünk a változások kivédésére.

Összességében tehát sikeresen használtuk fel az általunk kifejlesztett mikroszkópos módszer lehetőségeit, és megmutattuk, hogy hogyan tud segíteni az idegtudomány fontos kérdéseinek megválaszolásában.

Abstract

Understanding the diverse functions of the brain is hindered by its complex connectivity, the diversity and plasticity of its synapses and the thousands of proteins behind these actions. In our era neuroscientists are equipped with more and more effective tools to be able to observe this vast complexity. We have developed a method, which enables us to stain different cell types, individual cells, and even subcellular compartments, and investigate the abundance and nanoscale distribution of proteins of interest within. Correlated confocal and super-resolution microscopy thus provides means of inferring from this molecular information the function of the investigated proteins within the cell or compartment. In my dissertation, I would like to present two different scientific research projects, where we have taken advantage of this correlated method.

In the first project we were looking for the characteristic calcium binding proteins of cannabinoid receptor (CB₁) positive GABAergic neurons of the hippocampus, basolateral amygdala, and somatosensory cortex for a better understanding on the specific physiological properties of these cells. After thorough investigation of a single-cell *in silico* mRNA sequencing database we found two candidates: N-terminal EF-hand Calcium Binding Protein 1 and 2 (NECAB1 and NECAB2). Next, we performed different experiments to corroborate this finding on the mRNA level, then on the protein level with population and single-cell measurements, and lastly nanoscale investigation took place with correlated confocal and super-resolution microscopy to uncover a subcellular compartment-specific difference of protein abundance and distribution between NECAB1 and NECAB2.

In the second research project we investigated the effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) treatment of rat dams on the dopaminergic reward system of their offspring. We showed that prenatal cannabis exposure does not cause a difference in dopaminergic cell numbers or CB₁ receptor levels in the ventral tegmental area (VTA). Interestingly, a synapse-specific redistribution takes place in the inputs of dopaminergic cells: the number of excitatory synapses as well as the strength of excitatory and inhibitory synapses have both changed upon treatment which was shown with correlated confocal and super-resolution microscopy. Then, with the help of our collaborators we uncovered the reasons and consequences of these changes and proposed a possible treatment for preventing the pathological signs.

In summary, we have successfully utilized the capabilities of the correlated method and have shown how it can answer important questions in neuroscience.

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés.....	9
1.1	A korrelált konfokális és szuperrezolúciós mikroszkópia	9
1.1.1	A módszer megvalósítása	12
1.2	A szuperrezolúciós mikroszkópia felhasználási lehetőségei, esettanulmányok	15
1.2.1	A CB ₁ -pozitív interneuronok kalciumkötő fehérjéinek vizsgálata	16
1.2.2	A prenatális THC kezelés hatásának vizsgálata	18
2	Anyagok és módszerek.....	23
2.1	A CB ₁ -pozitív interneuronok kalciumkötő fehérjéinek vizsgálata	23
2.1.1	Számítógépes egysejt mRNS adatbázis elemzés	23
2.1.2	Szövetelőkészítés.....	23
2.1.3	A biocytinnel töltött sejtek morfológiai elemzése	24
2.1.4	Fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció	25
2.1.5	Immunfestés.....	27
2.1.6	Konfokális mikroszkópia és képelemzés.....	28
2.1.7	Korrelált konfokális és STORM mikroszkópia, képelemzés.....	29
2.1.8	Statisztikai elemzés és ábrakészítés.....	30
2.2	A prenatális THC kezelés hatásainak vizsgálata	31
2.2.1	Állatok	31
2.2.2	Viselkedési analízis	31
2.2.3	Agyi mikrodialízis	32
2.2.4	Elektrofiziológiai elvezetés	33
2.2.5	Immunfestés.....	35
2.2.6	Konfokális képalkotás és képanalízis	37
2.2.7	Korrelált konfokális és STORM képalkotás.....	37
2.2.8	Korrelált konfokális és STORM képelemzés	38
2.2.9	Statisztikai elemzés.....	38
2.3	Egyéni hozzájárulás.....	39
3	Eredmények I: A CB ₁ -pozitív interneuronok kalciumkötő fehérjéinek vizsgálata	40

3.1	<i>In silico</i> egysejt mRNS-szekvenálási adatbázisok elemzése	40
3.2	Az RNAscope <i>in situ</i> hibridizációs technika alkalmazása.....	43
3.3	Immunfestések populációs szinten	46
3.4	A NECAB1 és NECAB2 fehérjék sejten belüli eloszlása	49
4	Eredmények II: A prenatális THC kezelés hatásának vizsgálata.....	54
4.1	A VTA-beli dopaminerg sejtek számának vizsgálata.....	54
4.2	CB ₁ receptor szintek mérése a VTA dopaminerg sejtek bemenetein	55
4.3	A dopaminerg sejtek bemeneteinek változása	56
5	Összefoglalás.....	61
5.1	Új tudományos eredmények.....	61
6	Diszkusszió és az eredmények alkalmazási lehetőségei.....	64
6.1	I. CB ₁ -pozitív interneuronok kalciumkötő fehérjéinek vizsgálata.....	64
6.2	II. A prenatális THC kezelés hatásának vizsgálata.....	65
	6.2.1 A publikáció társszerzői által a Cagliari Egyetemen végzett kísérletek rövid összefoglalása.....	65
	6.2.2 Összefoglalás és az eredmények alkalmazási lehetőségei.....	76
7	A szerző publikációi	78
8	Irodalomjegyzék	81
9	Függelék	95
10	Rövidítésjegyzék	96

1 Bevezetés

1.1 A korrelált konfokális és szuperrezolúciós mikroszkópia

Az emberi test vitathatatlanul legösszetettebb szerve az agy, mely molekulárisan, morfológiailag és funkcionálisan különböző sejtípusok százaiból áll össze, változatos agyi régiókat alkotva [1]–[4]. Az idegsejtek főképp kémiai szinapszisok útján kommunikálnak, és ezen kapcsolóállomások erősségének pontos, aktivitásfüggő szabályozása elengedhetetlen az agyi hálózatok helyes működéséhez; ennek érdekében az egyes szinapszisok molekuláris gépezetekbe rendezett fehérjék ezreit használják fel [5], [6].

Az idegtudomány egyik központi kérdése a szinaptikus jelátvitel pontos molekuláris szabályozásának megismerése, viszont az idegrendszer bámulatos szerkezeti komplexitása és a szinapszisok molekuláris sokfélesége komoly gátat jelent a kutatók számára. Azonban megismerésük kiemelkedően fontos lenne, hiszen a fiziológiás és patofiziológiás folyamatok mögött álló molekuláris változások sokszor történnek kizárólag egyes sejtípusok specifikus szinapszisaiban [7], [8]. Korábban viszont nem állt rendelkezésre olyan módszer, amely egyedileg jelölt idegsejtek szinapszisaiban tette volna lehetővé különböző fehérjék molekuláris eloszlásának kvantitatív megfigyelését.

Évtizedeken keresztül az immunarany elektron mikroszkópia (EM) volt az élettudományokban az első számú módszer a fehérjék nanoskálájú helyzetének meghatározására [9], [10]. Habár az EM rendelkezik a kellő felbontással ahhoz, hogy különböző sejtsejtszervecskékhöz képest határozza meg különböző célfehérjék helyzetét, kisfokú kísérleti rugalmassággal rendelkezik, hiszen a mintákat vízteleníteni kell, gyantába kell ágyazni, ami egyrészt a minták zsugorodását idézi elő, másrészt csökkenti a módszer szenzitivitását és a használható antitestek csoportját, így több fehérje együttes megjelenítése is igencsak nehézkessé válik. Továbbá nem valósítható meg vele élő képalkotás, így nem képes lekövetni a rendszerek dinamikáját. A fluoreszcens mikroszkópia ezzel szemben többféle kísérleti elrendezést enged meg, például genetikusan és virálisan bejuttatott jelölőanyagok, sejtípus-specifikus promóterek, kompartment-specifikus festékek, biokémiai szenzorok, antitestek akár együttes használata révén, élő vagy fixált szövetekben. A molekuláris helymeghatározásnak viszont a fluoreszcens mikroszkópiában a diffrakciós limit (1. egyenlet) szab határt, így felbontása jóval elmarad az elektronmikroszkóptól (2-300 nm laterálisan, 5-600 nm axiális irányban).

$$d = \frac{\lambda}{2n\sin\theta}$$

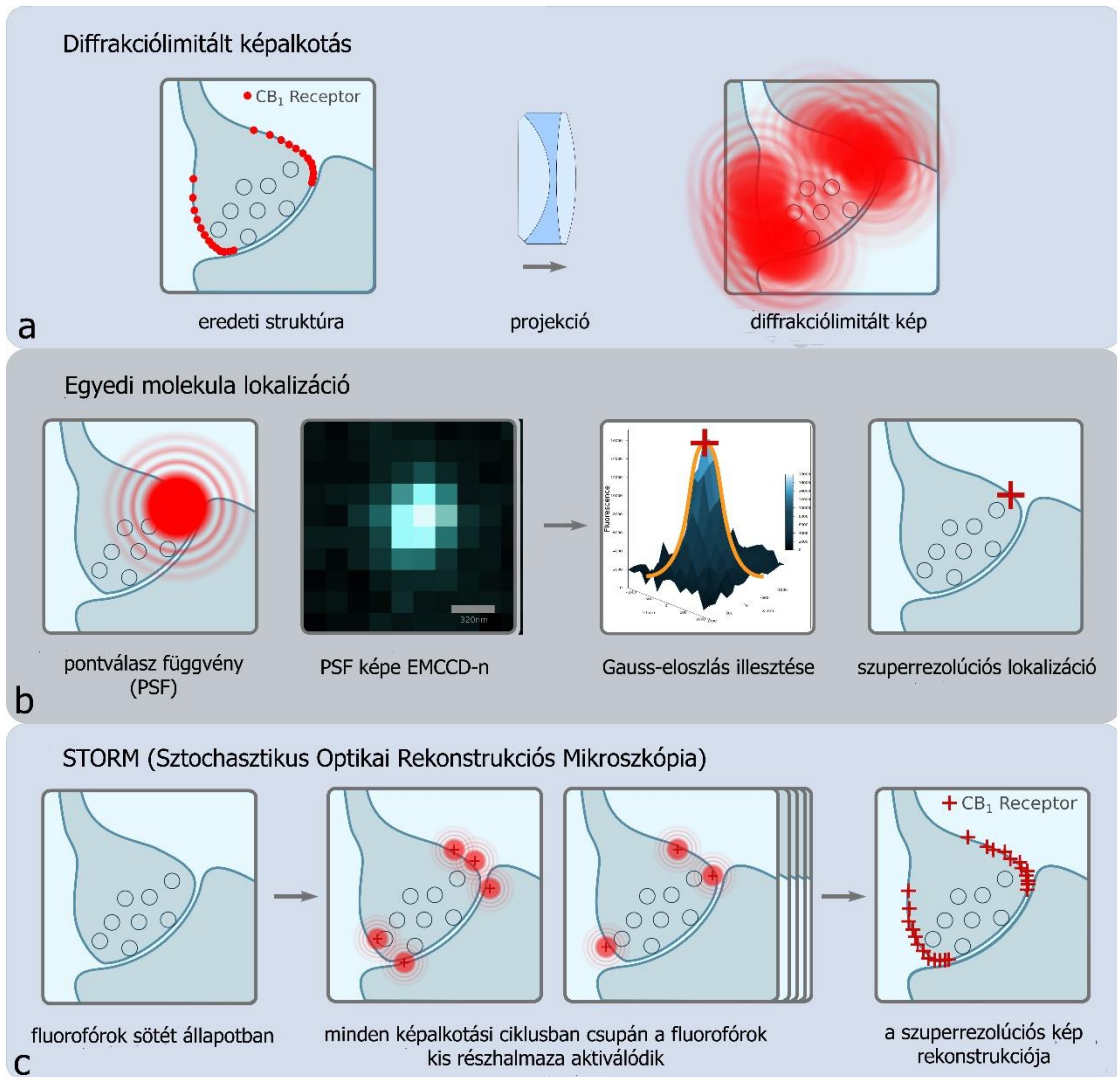
1. egyenlet Az Abbe-elv alapján meghatározott legkisebb feloldható távolság

λ : a képalkotáshoz használt fény hullámhossza, n : a közeg refraktív indexe, θ : az objektív fénylásszöge. Az $n\sin\theta$ tagot az objektív numerikus apertúrájának is nevezzük. Jó objektívek esetén ez a közeg törésmutatójához közeli érték, üvegben $\sim 0,5$. A látható fényvel végzett vizsgálatokhoz minimum 400 nm-es hullámhosszot tudunk használni, így a legkisebb feloldható távolság elviekben sem haladhatja meg a 200-250 nanométert.

A klasszikus fluoreszcens mikroszkópiával elérhető jel-zaj arány növelésére többféle módszer is létezik, például a kész képek dekonvolúciója, melynek során a mikroszkóp pontválasz függvényének ismeretében vagy becslésével (PSF: Point Spread Function - egy pontszerű fényforrás képe) próbálják visszafejteni az eredeti képen található információkat. A konfokális mikroszkópia pedig azt használja ki, hogy egy fókuszált lézer fut végig a minta pontjain, és az elméleti fókuszon kívülről érkező fotonok szűrésére egy lyukdiafragmát alkalmaznak, ezáltal javul a felbontás, de a diffrakciós limit nem legyőzhető.

A közelmúltban többféle módszer is napvilágot látott annak érdekében, hogy ez a felbontási határ legyőzhető legyen [11]–[16], és megközelíthető legyen az EM nagy felbontása a fluoreszcens mikroszkópia rugalmas lehetőségeinek megtartásával [17]. Ezeket szuperrezolúciós módszereknek nevezzük, és jelentőségüket az is tükrözi, hogy a 2014-es kémiai Nobel-díjat ezen eljárások alapjainak kidolgozásáért ítélték oda. A leggyakrabban használt eszközök két csoportra oszthatók: vagy a megvilágítás valamilyen strukturáltságát használják ki a PSF csökkentéséhez, így a felbontás növeléséhez, mint például a SIM (Structured Illumination Microscopy) [18] vagy a STED (Stimulated Emission Depletion Microscopy) [19], vagy pedig egyedi molekula lokalizáción alapulnak (SMLM: Single Molecule Localization Microscopy), ilyen például a fluoreszcens fehérjéket használó PALM (Photoactivated Localization Microscopy) [11] vagy a szerves festékekre épülő STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) [13].

Az egyedi molekula lokalizációs mikroszkópia azon alapul, hogy abban az esetben nagy pontossággal meg lehet állapítani az egyedi fényforrások helyét, ha kellően kevés van azokból egyszerre bekapcsolt állapotban egy képalkotási ciklusban, így azok olyan távol esnek egymástól, hogy képük nem olvad össze [20]. Az általunk használt SMLM módszer, a STORM [13] úgy éri el ezt az állapotot, hogy bizonyos szerves festékek azon tulajdonságát használja ki, hogy különböző fotokémiai reakciók következtében ki-be kapcsolhatóak, így képesek vagyunk egyszerre kevés festéket felvillantani, és a képalkotás ismétlésével meghatározni a festékekhez kötött antitestekkel megjelölt célfehérjék helyét (1. ábra).



1. ábra A STORM szuperrezolúciós mikroszkópia működésének elvi alapjai egy preszinaptikus membrán receptor, a CB_1 példáján bemutatva (ábra: Dr. Barna László)

a) Ahhoz, hogy meg tudjuk jeleníteni a célfehérjénket, azokhoz több lépcsős immunfestés segítségével szerves festékekhez kötött antitesteket kapcsolunk. Azonban, ha ezekből sok található egymás mellett, és egyszerre világítanak, az egyes pontválasz függvények összeolvadnak, és egy diffrakciólimitált képet kapunk.

b) Ha azonban el tudjuk érni megfelelő hullámhosszú lézertény segítségével és egy ki-be kapcsolható fluorofórok alkalmazásával, hogy egyszerre csak kevés fényforrás legyen bekapcsolt állapotban, akkor az egyes fényforrások egy szenzitív kamera detektorán, például EMCCD-n (Electron Multiplying Charge Coupled Device) megjelenő intenzitás képeire Gauss-eloszlást illesztve nagy pontossággal meghatározható azok helyzete.

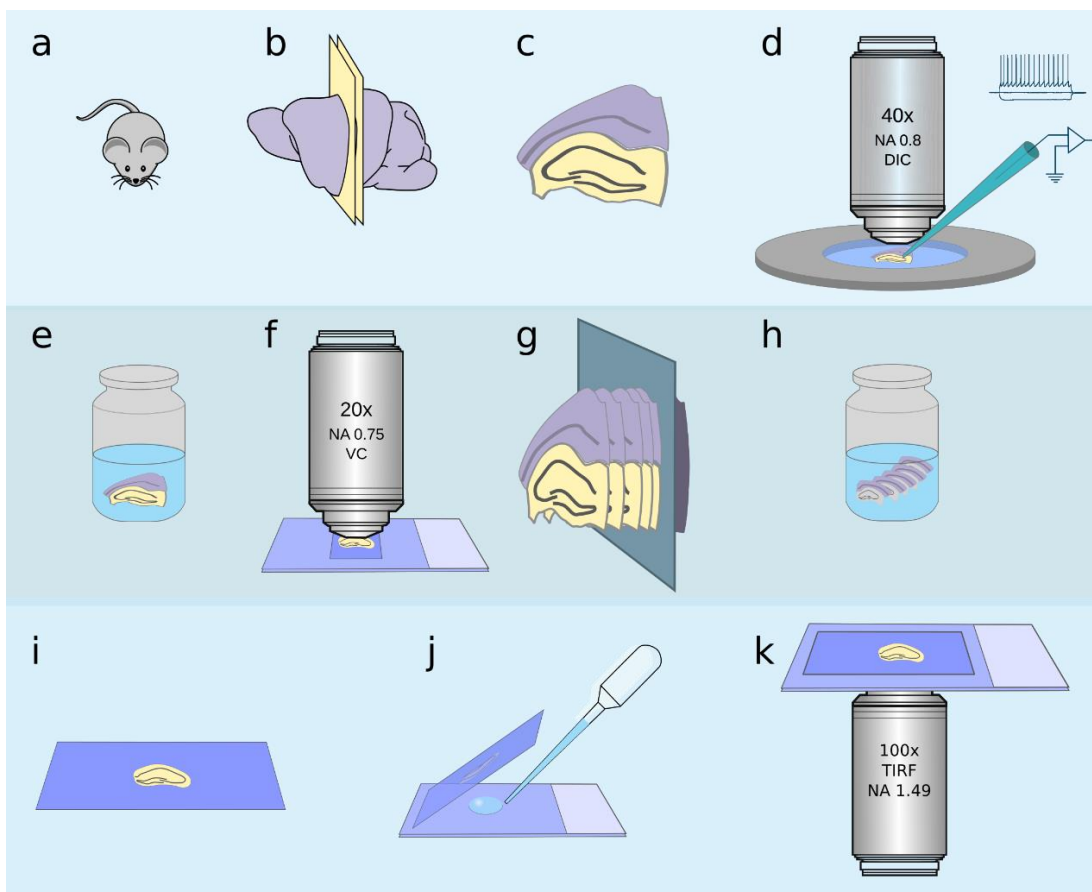
c) A képalkotás ismétlésével rekonstruálható a teljes struktúra, és akár néhány nm-es laterális, valamint 30-40 nm-es axiális felbontás is elérhető.

Felmerült az igény több csatornás detekcióra is, hogy több fehérje egymáshoz viszonyított helyzete is mérhető legyen, viszont jelenleg a többcsatornás STORM képek készítése egymáshoz közeli sejtalkotókban és szövetben egyelőre nem maradéktalanul megoldott. Az egycsatornás STORM kísérletek hátránya, hogy a sejtes és szubcelluláris környezet nélkül biztosítanak számunkra molekuláris információt, ami az adatok funkcionális értelmezését igencsak megnehezíti. Ezért egy másik mikroszkópiás technikával tanácsos ötvözni, hogy a nanoskálájú helymeghatározásnak sejt-specifikus kontextust tudjunk biztosítani, ezáltal elősegítsük a kvantitatív molekuláris kutatásokat. Ennek érdekében

fejlesztettünk ki egy új módszert, melyben a sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópiát kombináltuk a konfokális mikroszkópiával, és ezt különböző idegsejt-típusokban alkalmaztuk az egéragyban létrejövő molekuláris változások megfigyelésére [21]. A konfokális detekció előnye, hogy a felhasználható festékek köre igen széles, és kidolgozott módszerek állnak rendelkezésre a pixel alapú képek elemzésére is.

1.1.1 A módszer megvalósítása

A korrelált STORM és konfokális mikroszkópiás módszerünkkel a kiválasztott fehérjék molekuláris elhelyezkedésének vizsgálatára nyílik tehát lehetőség adott környezetben, többek közt elektrofiziológiai elvezetés során biocytinnel töltött egyedi sejtek jelölésével (2. ábra) [21]–[24]. Egy, fixált agyi minták STORM mikroszkópiás vizsgálatára alkalmas módszerből indultunk ki [25], és úgy módosítottuk azt, hogy maximalizáljuk az antitest kötés specificitását és szenzitivitását. Képesek voltunk elérni, hogy ugyanazon látótérről először konfokális képet alkossunk (hogy vizualizáljuk az egyedi jelölést), majd STORM mikroszkópiával nanoskálájú molekuláris eloszlás adatokat vegyünk fel egy kereskedelmileg elérhető mikroszkóp segítségével. Ezáltal egér agyszeletben 5 μm -es mélységében 6 nm-es lokalizációs pontosságot tudtunk elérni a laterális, és 41 nm-t az axiális dimenzióban. Azt is bebizonyítottuk, hogy a STORM lokalizációs pontok száma jól jellemzi a fehérjék egymáshoz viszonyított mennyiségét.



2. ábra Az egyedileg jelölt sejtek és a molekuláris információ együttes vizsgálatára alkalmas módszer technikai megvalósítása (ábra: Dr. Barna László)

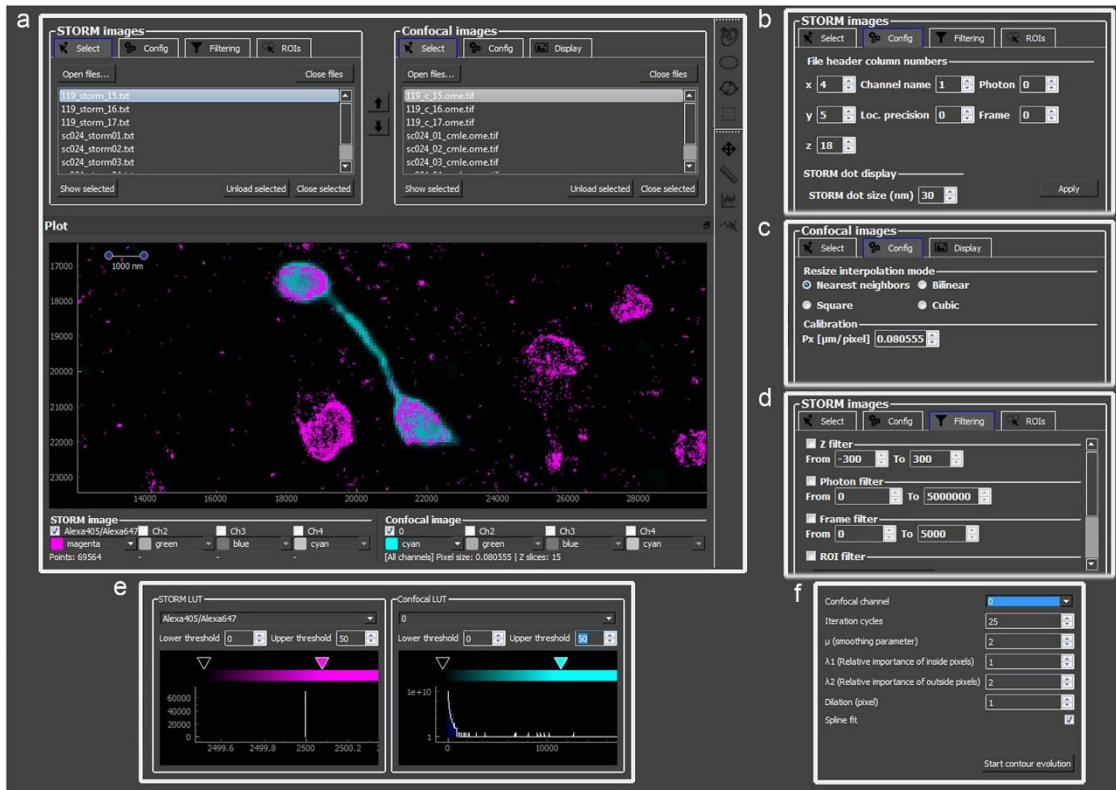
- a) Egéragy eltávolítása a koponyából fixálás nélkül.
 b-c) Vibratóm segítségével 300 μm -es agymetszetek készítése, a vizsgálni kívánt régió kiválasztása.
 d) Egyedi sejtek biocytinnel való töltése elektrofiziológiai elvezetés közben, DIC (Differential Interference Contrast) optika segítségével.
 e) Az egyedi jelölés előhívása Alexa488-kapcsolt sztreptavidinnel.
 f) Konfokális képalkotás a jelölt sejtekről, azok rekonstrukciója, a sejtípus megállapítása.
 g) A minta újrametszése 10-20 μm vastag szeletekre vibratóm segítségével.
 h) Immunfestés kivitelezése a célfehérjék fluoreszcens jelölése érdekében.
 i) A minta fedőlemezre való kirakása és szárítása.
 j) A minta lefedése közvetlenül a képalkotás előtt speciális STORM képalkotó közeggel.
 k) Korrelált konfokális és STORM képalkotás.

Elkészítettük a képpárok korrelált analíziséhez szükséges első szoftvert is (3. ábra), amit VividSTORM-nak neveztünk el. Ez egy grafikus felhasználói felülettel rendelkező, önállóan telepíthető program, mellyel megnyithatunk, vizualizálhatunk és analizálhatunk egymáshoz tartozó konvencionális pixel alapú mikroszkópos képeket és a fluorofór molekulák koordinátáinak listáit. Kiválaszthatóak az egyes jelölt sejthez vagy sejt szervecskéhez tartozó lokalizációs pontok, ezeken további kvantitatív mérések végezhetőek, például a számuk, a sűrűségük, a távolságeloszlásuk, a 3D felületen vett sűrűségük, klasztereződési tulajdonságaik és internalizációjuk vizsgálható [26]. A szoftver szabadon használható Python programnyelvben íródott könyvtárak felhasználásával készült, és nyílt forráskódú kódként elérhetővé tettük, így mások számára is lehetőség nyílik arra, hogy hozzáadjanak új

vizualizációs vagy analízis eszközöket. Eddig több, mint hatszázan töltötték le a projekt oldaláról (<https://sourceforge.net/projects/vividstorm/>, 2020.02.23.)

A korrelációs módszer általánosítható: így az egyedi sejt jelölésen túl genetikailag kódolt fluoreszcens próbák, virális vektorok injektálása vagy *in utero* elektroporáció [27] is alkalmazható a sejttípus- vagy régió-specifikus jelölésre, és a konfokális mikroszkópia mellett strukturált megvilágításon alapuló mikroszkópia (SIM) [18] vagy stimulált emissziós depléciós (STED) [19] mikroszkópia is használható. Az immunfestésen túl a molekuláris jelölés elérhető genetikailag kódolt fluoreszcens címkével, SNAP-taggel vagy intrabody-val is, a detekció pedig a hagyományos STORM mellett más egyedi molekula lokalizációs módszer is lehet, például fotoaktivált lokalizációs mikroszkópia (PALM) [11], fluoreszcens PALM (fPALM) [12] vagy direkt STORM (dSTORM) is [28].

A STORM módszer alkalmas többcsatornás képalkotásra [29], [30], akár élő sejtekben jelölt fehérjék detektálására [31], [32], membrán festésre [33] és fluoreszcens fehérjék láttatására is [34], ezen kívül a STORM és a PALM is alkalmazható sejt kultúrában [35]–[37]. A STORM kombinálható EM-val [38] is, így mind a korrelált módszer, mind pedig a szoftver alkalmazási területe kiterjeszhető, ezért hasznosnak mutatkozhat a jövőben több kutatócsoport számára is.



3. ábra A VividSTORM program lehetőségeinek összefoglalása (ábra: Barna és mtsai.[26], módosítva)

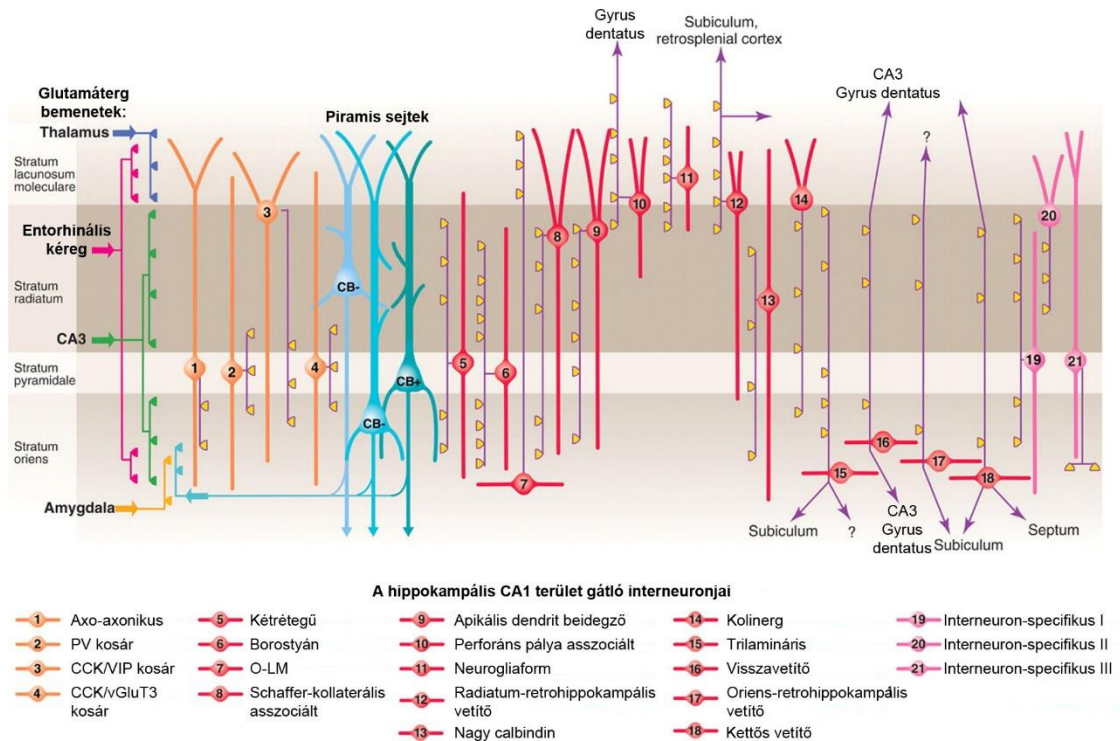
- a) A program elindításával három ablak nyílik meg. A molekula listákat a „STORM images”, a pixel alapú képeket a „Confocal images” ablakba tudjuk betölteni. A „Plot” ablak jelenti meg a kiválasztott csatornák egymásra vetített képeit. A felhasználó mozgatni, közelíteni és távolítani tudja a megjelenített képet, ki tudja választani a kívánt csatornákat, és szint is tud hozzájuk választani.
- b) A molekula lista szinte bármilyen tabulátorral elválasztott fájlból készíthető a STORM képek „Config” ablaka segítségével.
- c) A konfokális képek „Config” ablaka segítségével megválasztható a pixelek közötti interpoláció módja és a konfokális kép kalibrációja is.
- d) A STORM lokalizációs pontok különböző feltételek (z-pozíció, érzékelt fotonok száma, helyi sűrűség) szerint való szűrésére van lehetőség a „Filtering” ablakban. Csak azok a lokalizációs pontok jelennek meg később az analízisben, melyek minden szűrési feltételnek megfeleltek.
- e) A STORM és konfokális csatornák megjelenésének intenzitása változtatható a „LUT” ablakban.
- f) Lehetőség van arra, hogy az aktív kontúr alapú szelekciós eszköz [39] automatikusan körülhatároljon jelölt részleteket a konfokális képen, így azok a lokalizációs pontok szerepeljenek csak a további analízisben, melyen erre a területre esnek.

1.2 A szuperrezolúciós mikroszkópia felhasználási lehetőségei, esettanulmányok

A disszertációm további részében szeretnék bemutatni két olyan tudományos kutatási projektet, melyben sikeresen alkalmaztuk az általunk kidolgozott korrelált konfokális és szuper-rezolúciós mikroszkóp módszert. Az érthetőség jegyében nem csupán az ezzel a módszerrel történt méréseket, hanem más logikai lépéseket is szeretnék részletesen leírni, hiszen ezek szolgálják a mélyebb megértést, de hangsúlyozom, hogy a szuperrezolúciós módszer alkalmazása milyen értékes plusz felfedezésekhez juttatott minket.

1.2.1 A CB₁-pozítív interneuronok kalciumkötő fehérjéinek vizsgálata

A gátló idegsejtek sokfélesége már hosszú évtizedek óta foglalkoztatja a kutatókat. Fejlődésbiológiai eredetük, elektrofiziológiai tulajdonságaik, bemenő és kimenő kapcsolataik, morfológiájuk és eltérő mRNS, valamint fehérje mintázatuk alapján legalább 21 féle interneuron (IN) típust azonosítottak csak a hippokampuszban (4. ábra) [4], [40]–[43], mely réteges szerkezete és viszonylag egyszerű hálózati viszonyai miatt az egyik legintenzívebben kutatott agyterület. Az egyedi sejt mRNS szekvenálás segítségével nemrégiben lehetőség nyílt majdnem 50 hippokampális IN osztály leírására [44]. Habár a hippokampális sejtpopulációnak csupán 7-10%-át jelentik az interneuronok [40], olyan sejtcompartment-specifikus és agyi állapotfüggő ritmikus serkentetőség változásokat generálnak, melyek a hálózati működés hatékony befolyásolását teszik lehetővé [42]. Az interneuronok ezen funkcióihoz elengedhetetlen, hogy precízen szabályozzák a sejten belüli kalcium jelátvivő koncentrációját, mely főleg a kalcium csatornákon, a mitokondrium, az endoplazmatikus retikulum és különböző kalciumkötő fehérjék (calcium binding protein, CaBP-k) közreműködésével valósul meg [45]–[48]. Vannak olyan kalciumkötő fehérjék, melyek annyira fontos szerepet játszanak a sejtek molekuláris hovatartozásának és szerepének meghatározásában, hogy különböző neurontípusok markereivé váltak (például a parvalbumin, a calbindin, a calretinin és a secretagogin) [49]–[51].



4. ábra A hippokampusz CA1 régiójának gátló interneuron típusai (ábra: Klausberger és Somogyi, módosítva [4])

A CB₁ kannabinoid receptort és kolecisztokinint (CCK) egyaránt tartalmazó interneuron csoport a hippocampusz gátlósejtjeinek 13,9%-át teszi ki [40], és fontos szerepet játszik a hálózati ritmus finomhangolásában. Érdekes módon viszont mindeztől nem írtak le ezekben a sejtekben specifikus kalciumkötő fehérjét, amely megmagyarázná a többi típustól eltérő elektrofiziológiai tulajdonságaikat, és általános markerként szolgálhatna a sejtípus számára. Ugyanis mind a CB₁, mind a CCK kifejeződése alacsony a sejtek számájában, mely megnehezíti az azonosításukat; valamint mindkettő megtalálható kis mennyiségben az agyterületek principális sejtjeiben is, így akadályozza olyan génmódosított állattörzsek létrehozását, melyekben specifikusan jelölt a CB₁/CCK interneuron csoport. Ezen sejtípus molekuláris tulajdonságainak mélyebb megértésére viszont nagy szükség volna, hiszen olyan fiziológiai és patofiziológiai mechanizmusokban érintettek, mint például az epilepsziás kórképek [7]. Ezért az volt a célunk, hogy azonosítsuk a CCK/CB₁ interneuron populáció által kifejezett kalciumkötő fehérjéket.

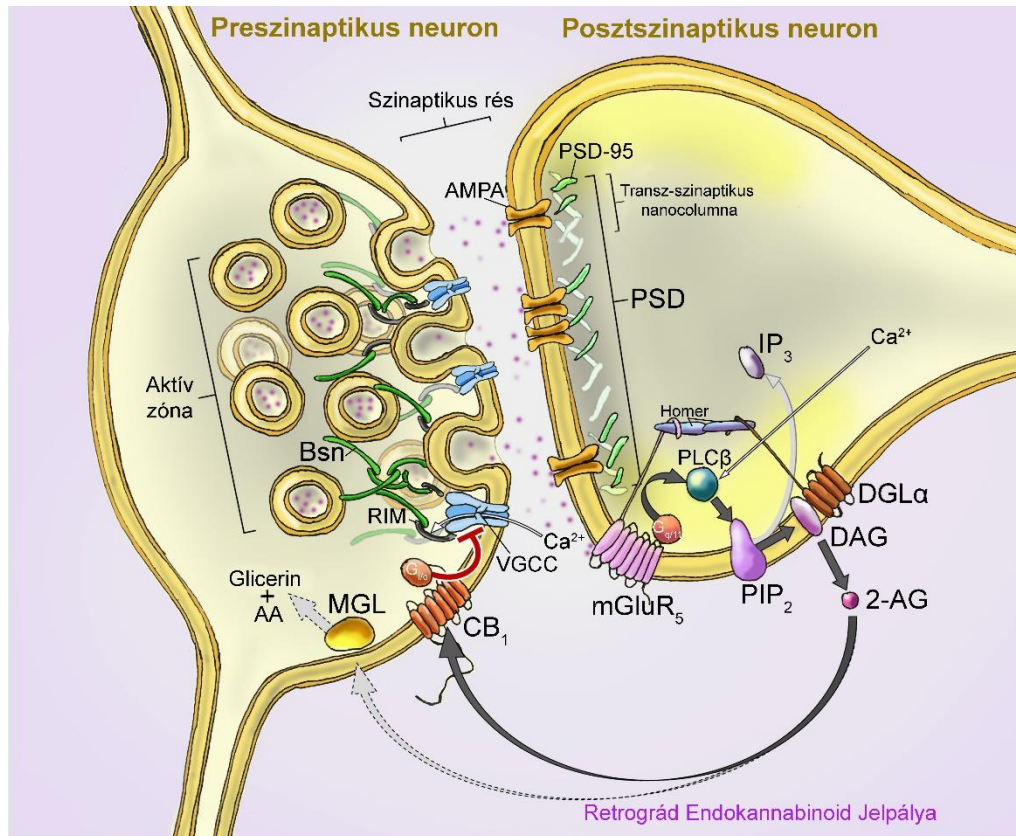
Egy egyedi sejt mRNS-szekvenálási adatbázisból indultunk ki, melynek vizsgálata során azt találtuk, hogy az N-terminális EF-kéz kalciumkötő fehérje 1-es és 2-es formája (NECAB1 és NECAB2) megtalálható a hippocampális és kortikális CB₁/CCK+ interneuron csoportban. Majd ezt az *in silico* predikciót erősítettük meg kísérletes eszközökkel mRNS és fehérje szinten populációs és egyedi sejt, sejtkompartment-specifikus mérésekkel, ezek részletezésére az Eredmények fejezetben térünk majd ki.

A NECAB fehérjék az EF-kéz kalciumkötő fehérje családba tartoznak, és mind az egér mind az emberi fehérje egy darab EF-kéz kalciumkötő motívumot tartalmaz az N-terminálisán. A szekvencia középső részén egy NECAB homológia domént találunk, a C-terminálisán pedig egy valószínűsíthetően antibiotikum bioszintézisért felelős monooxigenáz domént [52], [53]. A NECAB1 fehérjét a preszinaptikus kalciumérzékelőként működő synaptotagmin-1 kölcsönható párjaként fedezték fel, de később megmutatták, hogy fiziológiai körülmények között ez valószínűleg nem egy valós kölcsönhatás [52], míg a *Necab2* gént az emlős retinális primordium fejlődésében szerepet játszó PAX6 célpontjaként mutatták meg [54]. Maga a NECAB2 fehérje kölcsönhat az adozin A_{2A} receptorral [55] és a metabotróp glutamát receptor 5-ös típusával [56]. Korábbi adatok alapján tudható, hogy a fehérjéknek egyedi expressziós mintázata van, és a NECAB1 és a NECAB2 nem feltétlenül ugyanazokban a sejtekben fejeződnek ki, mind az egér hippocampuszban, mind a gerincvelőben [57]–[59]. Leírták őket CCK+ szeptális idegsejtekben is [60].

Célunk volt tehát ezen fehérjék kifejeződésének vizsgálata CB₁+ előagyi interneuronokban, és a molekuláris eloszlásuk vizsgálatával szeretnénk volna közelebb jutni azok funkciójának megértéséhez.

1.2.2 A prenatális THC kezelés hatásának vizsgálata

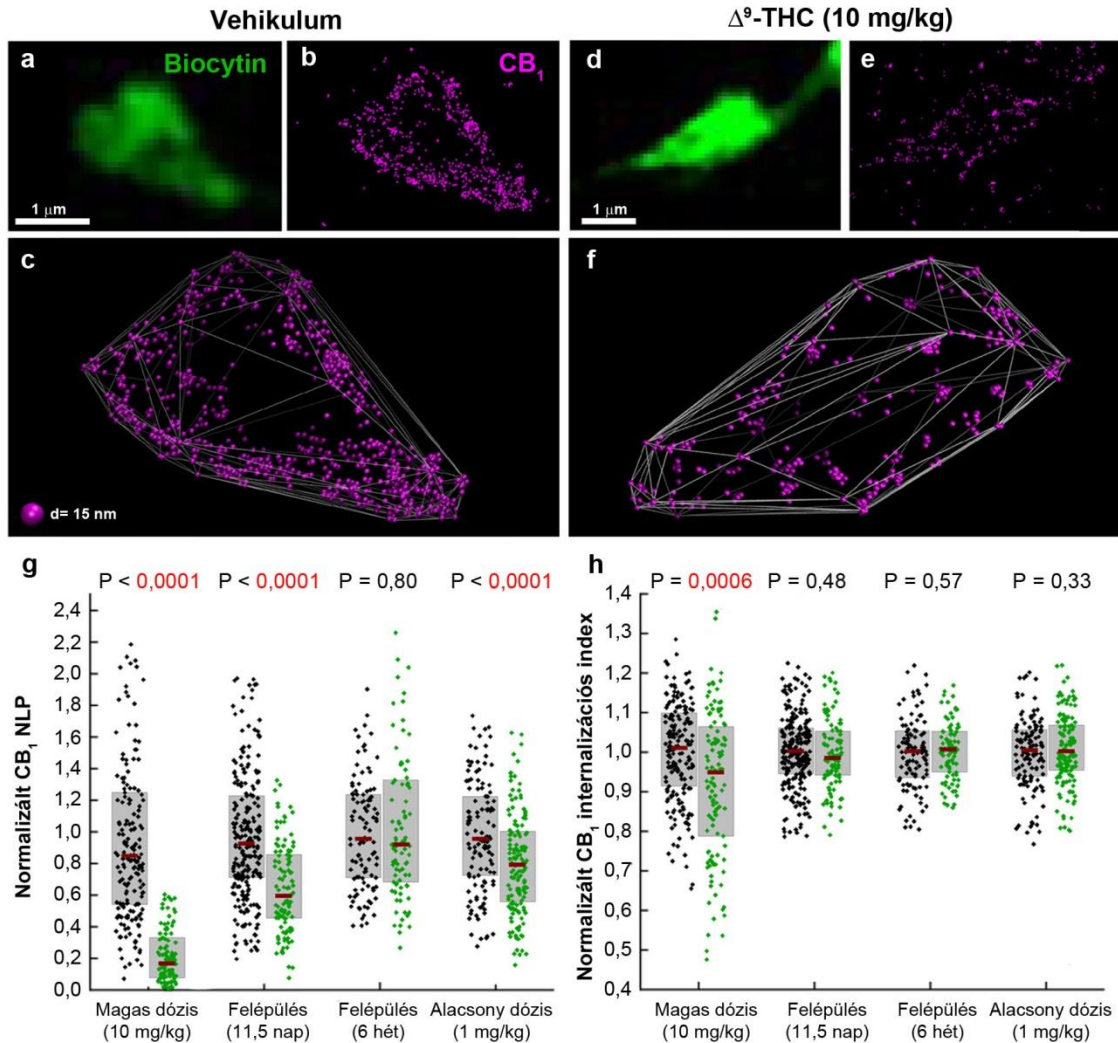
A szinaptikus endokannabinoid jelpálya az egyik legfontosabb retrográd jelátviteli útvonal, mely szabályozza a szinapszisok aktivitását az agy különböző területein, és kóros preszinaptikus túlműködés esetén megvédi a posztzinaptikus idegsejtet a túlzott serkentéstől (5. ábra) [61]. Olyan patológiás változásokban is szerepet játszik, mint a stressz-indukálta analgészia [62], az epilepszia [7], illetve más pszichiátriai és neurológiai kórképek (Parkinson-kór, Huntington-kór, krónikus neuropátiás fájdalom, sclerosis multiplex) [63]. Számos terápiás lehetőség látszik a betegségek kezelésére az endokannabinoid rendszerbe való beavatkozás által, és egyes országokban már meg is kezdődött a CB₁ receptorra ható szerek (pl. THC, CBD: kannabidiol) kontrollált formában történő gyógyászati célú alkalmazása is, emellett pedig növekszik az ezeket tartalmazó kannabisz növény rekreációs célú felhasználása és legalizációja is. Fontos tehát a rendszer kiterjedt vizsgálata, hiszen a kannabisz legfőbb pszichoaktív hatóanyaga, a THC hosszú távon toleranciát és bizonyos kognitív funkciók hanyatlását okozhatja [64].



5. ábra Az endokannabinoid jelpálya működése (ábra: Barti Benjámint)

A preszinaptikus sejt ingerületbe jötte után azon akciós potenciál érzék, mely hatására megnyílnak a feszültségfüggő kalciumcsatornák. A beáramló kalcium elősegíti a neurotranszmitterrel telt szinaptikus vezikulák ürülését a szinaptikus részbe, melyek a posztzinaptikus oldalon a posztzinaptikus denzitásban (PSD) található ionotróp receptoraikhoz kapcsolódnak (pl. glutamát az AMPA receptorokhoz). Ha túl sok ingerület érkezik a preszinaptikus sejtre, akkor több vezikula ürülése figyelhető meg, és a neurotranszmitter kidiffundál a szinaptikus részből, és a periszinaptikusan megtalálható metabotróp receptorához kötődik (például glutamát esetén az mGluR5-höz). Itt egy összetett jelátviteli útvonal indul be, a foszfolipáz-C- β (PLC- β) foszfatidilinozitol-biszfoszfátot (PIP₂) hasít inozitol-triszfoszfáttá (IP₃) és diacilglicerollá (DAG), mely később a diacilglicerol-lipáz- α (DGL- α) enzim segítségével 2-arachidonoilglicerollá (2-AG) alakul, amely egy fontos endokannabinoid molekula. Ez a posztzinaptikus sejtől átkeül a preszinaptikus sejthez egyelőre nem maradéktalanul tisztázott módon, ahol kötődik a kannabinoid receptor 1-es típusához (CB₁), és azt aktiválva G_i fehérje közbeiktatásával bezáródnak a feszültségfüggő kalciumcsatornák, így csökken a szinaptikus jelátvitel intenzitása. A jelátviteli rendszert a posztzinaptikus oldalon elhelyezkedő monoacil-glicerol-lipáz (MGL) enzim terminálja, mely arachidonsavra és glicerinnre bontja a 2-AG-t.

Egy korábbi kutatásban csoportunk korrelált konfokális és szuper-rezolúciós mikroszkópiával vizsgálta a THC hatását felnőtt rágcsháló agyban, és arra a következtetésre jutott, hogy adagolása dózisfüggő módon csökkenti a CB₁ receptorok számát a hippocampális gátló interneuronok axonterminálisaiban a receptor internalizációján keresztül, és ez a hatás akár több hétig is fennmarad (6. ábra) [21].



6. ábra A krónikus THC-kezelés dóziszfüggő módon hosszú távú CB₁ receptorszám-csökkenést okoz a hippocampális gátló axonterminálisok membránjában (ábra: Dudok, Barna és mtsai. [21], módosítva)

a, d) Periszomatikus interneuronok axonterminálisainak dekonvulált konfokális képe vehikulummal vagy 6,5 napig napi két intraperitoneális THC injekcióval kezelt állatból.

b, e) A STORM képalkotással fény derült a CB₁ receptorok számának THC-okozta csökkenésére.

c, f) A CB₁ receptorok 3 dimenziós megjelenítése azt mutatta, hogy a THC-kezelt állatokban több lokalizációs pont található az axonterminálisok belsejében.

g) Krónikus 10 mg/kg THC bevitelt követően a CB₁ lokalizációs pontok (NLP= number of localization points) 74%-kal csökkentek (n=185 és 117 axonterminális N=3 és 2 állatból, Mann-Whitney U-teszt). 11,5 nap THC nélküli periódus után a CB₁ receptorok 53%-a visszatért, de az NLP-különbség még szignifikáns volt (n=283 és 113 axonterminális N=3 és 3 állatból, Mann-Whitney U-teszt). Hat hét után viszont már nem találtunk különbséget a CB₁ receptorok számában (n=113 és 92 axonterminális, N=2 és 3 állatból, Mann-Whitney U-teszt). Kisebb mértékű, 1 mg/kg-os THC dózissal végzett kezelés hatására kisebb NLP-csökkenés volt megfigyelhető (n=129 és 153 axonterminális, N=2 és 3 állatból, Mann-Whitney U-teszt).

h) A megmaradó CB₁ lokalizációs pontok az axonterminális közepe felé mozdultak el magas dózisu THC-kezelés hatására (párosítatlan t-próba), ám 11,5 nap, illetve 6 hét THC nélküli periódus után vagy alacsony dózisu THC-kezelést követően nem találtunk ilyen változást.

Az adatok mediánja bordó vonallal, a 25-75%-os tartomány szürke téglalappal van jelölve az ábrákon.

Szerettünk volna a kutatásainkban továbblépni, és nem csak felnőtt, hanem fejlődő agyon is tanulmányozni a THC kezelés hatását.

A kannabiszt használó várandós anyák aránya egyre növekszik, akár 3-16% prevalencia arányt is elérhet a nyugati társadalmakban [65]–[68]. Ennek következtében, hogy a szer egyre szélesebb körben ismert, és általánosan biztonságosnak gondolják az emberek, gyakran

ajánlják várandós nőknek a „reggeli rosszulléteik” csillapítására [69]. Habár az Amerikai Egyesült Államok több tagállamában elismert az orvosi kannabisz hányinger és hányás kezelésére, terhesség alatti használatára nincs figyelmeztetés vagy külön jogi kitétel [70], és maguk az orvosok, valamint az egyéb egészségügyi személyzet is ritkán tér ki a várandósság alatti kannabiszhasználat kockázataira a várandósgondozás során [71], [72].

A kannabisz fő pszichoaktív hatóanyaga, a Δ^9 -tetrahidrokannabinol hat az endokannabinoid rendszerre, mely a fejlődő agyban nagy szerepet játszik a progenitor sejtek proliferációjában és idegsejtté történő differenciációjában, az axonok növekedésében, a szinapszisok keletkezésében és eltávolításában [67], [72]–[74]. Így nem meglepő, hogy több, egymástól független hosszú távú klinikai vizsgálat is megmutatta, hogy a perinatális kannabisz használat (PCE: perinatal cannabis exposure) viselkedési és kognitív károsodások széles skáláját okozhatja, mint a hiperaktivitás, a megnövekedett impulzivitás, a hosszan tartó figyelem hiánya, a kábítószerre való megnövekedett fogékonyság [75]–[77] és a fokozott hajlam a pszichózisra [78]. Ezekben a neuropszichiátriai rendellenességekben a hatások nagy része a dopaminerg jelpálya hibás működésére vezethető vissza [79], [80]. Míg a felnőtt és serdülőkori akut vagy krónikus kannabiszfogyasztás következménye több korábbi vizsgálatnak is tárgya volt [81]–[83], a prenatális kannabiszfogyasztás hatása a ventrális tegmentális terület (VTA) dopamint tartalmazó idegsejtjeire – melyek kulcsszereplői a motivációnak, a jutalmazórendszernek és a megismerésnek [84] – még nem tisztázott.

A pszichiátriai betegségeket olyan modellel szokták magyarázni, mely feltételez egy „első hatást”, úgy, mint rendellenes genetikai hátteret vagy egy negatív környezeti behatást, mely olyan irányba tereli az agy fejlődését, hogy fogékonnyá váljon egy későbbi „második behatásra”, amely előidézi a pszichiátriai tüneteket. Ezek az első hatások vezethetnek endofenotípusok kialakulásához, mint például viselkedési problémákhoz [85], [86], és ezek karakterizálása segíthet abban, hogy az agyi hálózatok fejlődésének megváltozott útjait nyomon követhessük, különös tekintettel azokra, melyek növelik a fogékonyságot későbbi inzultusokra [86], [87]. Ezek ismeretében lehetőség nyílna a neuropszichiátria betegségek egy részének megelőzésére is. A közelmúltban több tanulmányban megmutatták, hogy a PCE „első hatásként” játszhat szerepet az endokannabinoid rendszer fejlődéstani funkcióinak megváltoztatásában [67], [73], [87], így különösen aktuálisnak ígérkezik a téma.

A hosszú távú vizsgálatok azt mutatták, hogy a PCE-nek olyan, már korai csecsemőkorban kimutatható viselkedési hatásai vannak, melyek emelkedett impulzivitást mutatnak, magasabb kockázatvállalást, a pszichózisra való fokozott hajlamot és későbbi életkorban a kábítószerre való fokozott fogékonyságot [75], [76], [78]. Ezen túl sejthető, hogy a prenatális THC által okozott endofenotípussal élő gyermekek aránya valószínűleg még magasabb lehet a társadalomban, mint azt a felmérések igazolják [88], [89], de az emberi populációban előforduló kontrollálhatatlan genetikai, környezeti és szocioökonómiai faktorok

jócskán megnehezítik az ok-okozati összefüggés kimutatását. Ez a tény kiemeli az állatkísérletes modellek előnyeit, melyek specifikus genetikai és környezeti tényezőket biztosítanak.

A kutatás során azt a hipotézist teszteltük, hogy a PCE molekuláris és szinaptikus változásokat okoz-e a ventrális tegmentális területen, mely zavart eredményez-e a dopaminerg sejtaktivitásban, és ez további viselkedési változásokhoz vezet-e. A kutatás során kiemelt figyelmet fordítottunk a nanoskálájú adatok gyűjtésére, és szinapszis-specifikusan vizsgáltuk a CB₁-receptorok, illetve egy szinaptikus állványfehérje (synaptic scaffolding protein), a bassoon molekuláris mennyiségét és eloszlását, ezáltal kihasználtuk a korrelált konfokális és szuperrezolúciós mikroszkópia által nyújtott lehetőségeket.

2 Anyagok és módszerek

2.1 A CB₁-pozitív interneuronok kalciumkötő fehérjéinek vizsgálata

2.1.1 Számítógépes egysejt mRNS adatbázis elemzés

Egy szabadon hozzáférhető egysejt mRNS adatbázist [2] használtunk, hogy vizsgálhassuk a hippokampusz CA1 régiójában, illetve a szomatoszenzoros kéregben elhelyezkedő CB₁-pozitív gátló neuronok kalciumkötő fehérjéit. Első lépésben kiválogattuk az interneuronokat az adatkészletből a szerzők által megadott annotációs címkék alapján, majd az egyes mRNS típusok darabszámait normalizáltuk az adott sejtben megtalált összes mRNS számra, hogy ezáltal elkerüljük az egyes elemek közötti különböző minőségű mRNS-detekcióból adódó különbségeket. Azokat a sejteket tekintettük CB₁-pozitívnak, melyekben a *Cnr1* mRNS tartalom (a *Cnr1* a CB₁ fehérjét kódoló génről átíródó mRNS neve) meghaladta az agyterületenkénti maximális *Cnr1*-tartalmú sejt 10%-át, hogy ezáltal elkerüljük a hamis pozitív elemeket, melyek óhatatlanul is előfordulnak egy ilyen mRNS szekvenálási adatbázisban a módszer jellegéből adódóan. Ezután megvizsgáltuk ezekben a kiválasztott sejtekben a kalciumkötő fehérjék mRNS-einek kifejeződését. Ebben a lépésben minden olyan gént figyelembe vettünk, amely a Gene Ontology (GO) [90]–[92] adatbázis alapján kalciumkötéssel összefüggésbe hozható (az adatbázis 2017.02.23-i állapota szerint).

Az elemzésben részt vett: Csapóné Miczán Vivien.

2.1.2 Szövetelőkészítés

Az állatkísérleteket a Magyar Állatorvosi Kamara Etikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszám: MÁB 2018/1), és az Állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998. (XII. 31.) kormányrendeletnek megfelelően zajlottak. A lehető legkevesebb számú állatot áldoztuk fel, és törekedtünk fájdalmaik minimalizálására.

2.1.2.1 Transzkardiális perfúzió

Felnőtt (50-60 napos) hím C57BL/6 egereket (N=3) fixáltunk transzkardiális perfúziós módszerrel. Rövid izoflurános (Aesica Queenborough Ltd, B506) bódítás után 0,4-0,8 mL 1,25%-os Avertint (2,2,2-tribróm-etanol, Sigma, T48402; 2-metil-2-butanol, Sigma, 152463 vizes oldata) fecskendeztünk be intraperitoneálisan a mély altatás elérése érdekében, majd először 2 percig 0,9%-os sóoldattal (NaCl, Molar Chemicals, 07220-101-190), majd 20 percig foszfát pufferben (PB, pH=7,4; Na₂HPO₄, Sigma, 71500 és NaH₂PO₄, Sigma, 71500 vizes oldata) oldott 4%-os paraformaldehid (PFA, TAAB, P001) oldattal, megközelítőleg 5 mL/perces pumpasebességgel mostuk át az ereiket. Ezután óvatosan eltávolítottuk az agyakat a koponyából, és 2 órán keresztül 4%-os PFA oldatban utófixáltuk, majd PB oldatban

50 µm vastag koronális szeleteket vágunk belőlük egy Leica VT-1000S vibratóm segítségével a fluoreszcens immunfestések kivitelezéséhez.

A kísérletben részt vett: Csapóné Miczán Vivien, Kelemen Krisztina és Glavinics Judit.

2.1.2.2 Egyedi sejt töltés és immerziós fixálás

Az egyedi sejtes kísérletekhez felnőtt (28-35 napos) hím egereket (N=24) dekapitáltunk izoflurános altatás alatt, majd az agyakat gyorsan eltávolítottuk a koponyából, és jéghideg, szacharózos mesterséges agy-gerincvelői folyadékban (szacharóz-ACSF: 75 mM NaCl, 75 mM szacharóz (Sigma, S7903), 2,5 mM KCl (Sigma, P3911), 25 mM glükóz (Sigma, G8270), 1,25 mM NaH₂PO₄, 4 mM MgCl₂ (Sigma, M2670), 0,5 mM CaCl₂ (Sigma, 223506), 24 mM NaHCO₃ (Sigma, S5761)) 300 µm-es szeleteket vágunk egy Leica VT-1000S vibratóm segítségével. Ezután a szeleteket 1 óráig 34 °C-on szacharóz tartalmú ACSF-ben előinkubáltuk, mielőtt egy hagyományos ACSF oldatot (2,5 mM KCl, 10 mM glükóz, 126 mM NaCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃) tartalmazó mérőkamrába helyeztük volna azokat, eközben 95%-os O₂ és 5% CO₂ elegyét buborékolattunk át az oldaton a sejtek oxigénellátásának biztosítására. Az elektrofiziológiai mérések 33 °C-on történtek, a szeleteket infravörös differenciál interferencia kontraszt optikával (DIC) felszerelt Nikon Eclipse FN1 mikroszkóppal figyeltük meg. Boroszilikát üvegapilláris segítségével (3-4 Ω) teljes sejt patch-clamp elvezetés történt a hippocampusz CA1 régiójának radiatum rétegében található sejttestekből, a következő anyagokat tartalmazó intracelluláris oldattal: 126 mM K-glükonát (Sigma, G4500), 4 mM KCl, 10 mM HEPES (Sigma, H4034), 4 mM MgATP (Sigma, A9187), 0,3 mM Na₂GTP (Sigma, 51120), 10 mM PO-kreatinin (Sigma, P7936) és 0,2% biocytin (Sigma, B4261); pH 7,2; 270-290 mOsm. Minden kiválasztott sejt akkomodáló, reguláris tüzelési mintázattal és multipoláris morfológiával rendelkezett, ami CB₁+ interneuron fenotípusra enged következtetni [93]. Az elvezetéshez MultiClamp 700B (Molecular Devices) erősítőket használtunk, a jelet 3 kHz-es Bessel-szűrővel szűrtük, és 10 kHz-en digitalizáltuk egy Digidata analóg-digitális átalakító (Molecular Devices) segítségével. Az analízishez Clampfit 10 (Molecular Devices) programot használtunk. Körülbelül 30 perces elvezetés után a szeleteket 4%-os PFA oldatban fixáltuk 24 órán keresztül 4 °C-on.

A kísérletben részt vett: Barti Benjámín, Kenesei Kata és Kisfali Máté.

2.1.3 A biocytinnel töltött sejtek morfológiai elemzése

A biocytinnel töltött sejteket tartalmazó szeleteket többször alaposan átmostuk PB oldattal, majd 30 percig 0,5%-os Triton X-100 (Sigma, T98787) PB-oldatban inkubáltuk őket a sejtmembránok átjárhatóságának növelése érdekében, ezután a biocytin töltést Alexa-488 fluorofórral kapcsolt sztreptavidinnel (50 µL/mL, Jackson, 016-540-08) hívtuk elő. Több

mosási lépés után a szeleteket üveg tárgylemezre tettük ki, majd Vectashield (Vector Laboratories, H-1000-10) mikroszkópos oldat használatával fedőlemezzel fedtük le, ezután azt körömlakkal rögzítettük. Ezt követően konfokális képeket alkottunk róluk, hogy meghatározhassuk a morfológiai sejttypusukat.

Konfokális z-tömböket vettünk fel ($2048 \times 2048 \times 150$ voxel, voxel méret: $0,3 \times 0,3 \times 1 \mu\text{m}$) egy NIKON-C2 mikroszkóp segítségével 488 nm hullámhosszú megvilágítással, majd maximális intenzitás projekciót (MIP) készítettünk, hogy megjelenítsük az axonfelhő eloszlását. A bouton eloszlás index (BDI) számértéket a korábbiakhoz hasonlóan [21] (2. egyenlet) számoltuk ki: a $\text{BDI} > 1$ értékkel rendelkező sejteket periszomatikus sejteknek, a $\text{BDI} < 0,5$ sejteket dendritikus sejteknek kategorizáltuk. Ezen csoportok között az a morfológiai különbség, hogy míg az előbbi típus axonfelhője inkább a CA1 régió piramisrétegében helyezkedik el, és a piramis sejtek sejttesteinek beidegezésében játszik szerepet, addig az utóbbi a radiatum és oriens rétegben található dendriteken ad szinaptikus kapcsolatokat. A $0,5 < \text{BDI} < 1$ sejteket az egyértelműség kedvéért kizártuk az analízisből.

A sejttypus meghatározása után a $300 \mu\text{m}$ vastag szeleteket többszöri PB mosás követően 2%-os agarózba (Sigma, A9539) ágyasztuk, és $10, 20 \mu\text{m}$ (a STORM kísérletekhez) vagy $50 \mu\text{m}$ (a kizárólag konfokális mikroszkópos kísérletekhez) vastagságúra metszettük újra vibratóm segítségével, hogy növeljük az antitestek penetrációjának esélyét az immunfestés közben.

A kísérletben részt vett: Csapóné Miczán Vivien, Kelemen Krisztina és Glavinics Judit.

$$\text{BDI} = \frac{0,5}{|M|(Q3 - Q1)}$$

2. egyenlet A bouton eloszlási index magyarázata.

A sejtek egyes axonterminálisainak relatív távolságát számoljuk ki a piramisréteg közepéhez képest, ahol a réteg közepének mérőszáma 0, széleinek pedig 1. M ezen értékeknek a módusza, $Q3 - Q1$ pedig az eloszlás interkvartilis terjedelme.

2.1.4 Fluoreszcens *in situ* hibridizáció

Az mRNS-ek kimutatására az RNAscope többcsatornás *in situ* hibridizációs technológiát alkalmaztuk, mely egyedülálló jelerősítést tesz lehetővé a háttérjelek csendesítésével kiegészítve, így akár egy-egy mRNS molekulát is tudunk azonosítani a szöveti környezet megőrzése mellett.

Felnőtt (60-70 napos) C57BL/6 egereket dekapitáltunk, ezután a koponyából eltávolított agyakat rövid időn belül jégen elmetstettük, majd szárazjég felett izopentánban (Sigma, 277258) fagyasztottuk le 20 másodpercig. OCT (Optimal Cutting Temperature, Tissue-Tek, 4583) gélben kriosztátba (Thermo Scientific, Microm GmbH, HM550) helyeztük, ahol $16 \mu\text{m}$ -es koronális metszeteket készítettünk $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on. A szeleteket Superfrost Ultra Plus

tárgylemezre (ThermoFisher, J488AMNZ) fixáltuk 10%-os pufferelt formalin oldattal, majd vízmentesítési lépések sorozatát hajtottuk végre rajtuk 50%-os, 70%-os és 100%-os etanol (Molar Chemicals, 02910-101-340) segítségével. A szeletek egymástól való elválasztását a kisebb reakcióterfogat érdekében víztaszító tollal (ImmEdger Hydrophobic Barrier, Vector Laboratories) biztosítottuk. Ezután a szeleteket az RNAscope előkészítő oldattal kezeltük, hogy átjárhatóvá tegyük a sejtmembránokat, és elérhetővé tegyük a cél mRNS-eket, majd 2 órás 40 °C-os kezelés következett 150 mL térfogatú specifikus RNAscope próbával (1. táblázat) egy HybEZ hibridizációs inkubátorban (ACDBio). Az egyes lépések között 1×-es mosó pufferes mosások történtek. 150 mL detekciós reagenst használtunk (AMP1, AMP2, AMP3, AMP4), hogy felerősítsük a jelet, majd 30 perces 1:1000 koncentrációjú DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid, Calbiochem, 508741) TBS oldatával (Tris-buffered saline, pH=7,4; Trizma hidroklorid, Sigma, T3253, Trizma bázis, Sigma, T1503 és NaCl) kezeltük a szeleteket, hogy megjelöljük a sejtmagokat. A mintákat Hardset Vectashield (Vector Laboratories, H-1400-10) mikroszkópiás oldattal fedtük le, és körömlakkal rögzítettük a fedőlemezt.

1. táblázat. A dolgozatban használt RNAscope próbák

Cél mRNS	Katalógusszám	Fluoreszcens erősítés
<i>Necab1</i>	428541	Alexa 488
<i>Necab2</i>	467381-C3	Atto 647
<i>Cnr1</i>	420721-C2	Atto 550

Egyes esetekben az RNAscope fluoreszcens *in situ* hibridizációt fluoreszcens immunfestéssel társítottuk, hogy ellenőrizhessük az antitestek festődési mintázatait. Így az RNAscope lépéseinek befejezése után a szeleteket 4% PFA oldatban fixáltuk 10 percig, majd Triton X-100 0,1%-os TBS-oldatában tovább növeltük a membránok átjárhatóságát az antitestek számára, majd a nem specifikus kötőhelyeket 5%-os normál szarum (NDS, Sigma, D9663) TBS oldatával kötöttük le. Ezután a szeleteket az elsődleges antitestek (2. táblázat) és DAPI TBS-oldatában áztattuk egy éjszakán keresztül 4 °C-on, majd a következő nap TBS mosások után 1 órás inkubáció következett a fluoreszcens másodlagos antitestek TBS oldatában (2. táblázat). Újabb mosási lépések után Hardset Vectashield oldattal fedtük le a szeleteket, és a fedőlemezt körömlakkal rögzítettük.

A kísérletben részt vett: Kelemen Krisztina, László Zsófia és Csapóné Miczán Vivien.

2. táblázat. A korrelált *in situ* hibridizációhoz és immunfestéshez használt RNAscope próbák és antitestek listája

	NECAB1 RNAscope + immunfestés	NECAB2 RNAscope + immunfestés
Specifikus RNAscope próbák	<i>Necab1</i> - 428541	<i>Necab2</i> - 467381-C3
Elsődleges antitestek	Nyúl anti-NECAB1 1:500, Atlas Antibodies, HPA023629	Nyúl anti-NECAB2 1:500, Atlas Antibodies, HPA013998
Az RNAscope csatorna fluoreszcens amplifikációja	Alexa 488	Atto 647
Szekunder antitest	Szamar anti-nyúl Alexa-597, 1:400, Jackson, 711-585-152	Szamar anti-nyúl Alexa-488 1:400, Jackson, 711-545-152

2.1.5 Immunfestés

Fluoreszcens immunfestéseket használtunk az egyes fehérjék agyszeleten belüli eloszlásának a felderítésére. A kísérletek menete hasonló volt a korábbiakhoz [26]. A szeletek a reakciók alatt szabadon úsztak 24-lyukú sejttenyésztő edényekben (Greiner Bio-One CELLSTAR edény szuszpenziós kultúrához, 662 102), 500 µL-es reakciótérfogatban folyamatos rázatás közben (Biosan OS-10 rázó gép). Az edényeket TBS-ben oldott 1%-os szarvasmarha szérum albuminnal (BSA, Sigma-Aldrich, A2153) előkezeltük, hogy megakadályozzuk a szeletek letapadását. PB-ben és TBS-ben való mosások után a szeleteket 5%-os NDS és 0,1%-os Triton X-100 TBS oldatában kezeltük 45 percig, hogy lekössük a nem specifikus kötőhelyeket, és növeljük a membránok átjárhatóságát az antitestek számára. Ezután a szeleteket egy éjszakára az elsődleges antitestek (3. táblázat) TBS oldatába helyeztük szobahőmérsékleten. A következő nap a TBS mosási lépések után a fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestek (3. táblázat) TBS oldatában történő 4 órás inkubációja következett. Végül újabb TBS és PB mosások után a STORM mikroszkópiával vizsgálandó szeleteket 10 percig 4% pufferezt PFA oldatban utófixáltuk, majd fedőlemezre szárítva tároltuk, míg a konfokális mikroszkópiára szánt szeleteket DAPI-val kevert Vectashield mikroszkópos oldatban (Vector Laboratories, H-1200-10) fedtük le, és a fedőlemezeket körömlakkal rögzítettük.

A kísérletben részt vett: Csapóné Miczán Vivien, Kelemen Krisztina és Glavinics Judit.

3. táblázat. A kísérletekhez használt elsődleges és másodlagos antitestek

Antitest típus	Cél	Faj	Koncentráció	Forrás
Elsődleges antitestek	Anti-CB ₁	Tengerimalac	1:2000	[94]
	Anti-NECAB1	Nyúl	1:300	Atlas Antibodies, HPA023629
	Anti-NECAB2	Nyúl	1:500	Atlas Antibodies, HPA013998
	Anti-CCK	Egér	1:3000	CURE, 39161
Másodlagos antitestek	Anti-tengerimalac, Alexa 488-konjugált	Szamár	1:400	Jackson, 706-545-148
	Anti-nyúl, Alexa 597- konjugált	Szamár	1:400	Jackson, 711-585-152
	Anti-egér, Alexa 488- konjugált	Szamár	1:400	Jackson, 715-545-150
	Anti-tengerimalac, Alexa-597-konjugált	Szamár	1:400	Jackson, 706-585-148
	Anti-nyúl, Alexa 647-konjugált	Szamár	1:400	Jackson, 711-605-152

2.1.6 Konfokális mikroszkópia és képelemzés

2.1.6.1 Az *in situ* hibridizációs minták képkészítése és képelemzése

Egy 60×-os nagyítású olaj-immersiós objektívvel felszerelt NIKON-A1R konfokális mikroszkópot használtunk a fluoreszcens *in situ* hibridizációs minták fotózásához, így nagy felbontású (80 nm/pixel) képeket készíthettünk a hippocampusról (HC), a szomatoszenzoros kéregről (SS-CTX) és a bazolaterális amygdaláról (BLA). NIS Elements AR analízis szoftver segítségével kézi kijelöléssel választottuk ki a kívánt ROI-kat (region of interest=kiválasztott régió, jelen esetben a vizsgált sejtekre illeszthető terület) a *Cnr1* RNAscope és a DAPI jel alapján; majd a ROI-kban található jelintenzitásokat normalizáltuk a háttér (sejtmentes terület) átlag konfokális intenzitására képenként, így az egyes sejtek háttérhez viszonyított relatív jeldúsulását kaptuk meg. Az egyes sejteket ezután „erős-CB₁” és „gyenge-CB₁” kategóriákba soroltuk a relatív jeldúsulás értékek eloszlása mentén megállapított küszöbérték alapján.

A jeldúsulás adatok küszöbértékei agyterületenként a következőknek adódtak: HC-CA1: 2, HC-CA3: 4,5, HC-DG: 3, SS-CTX: 3, BLA: 5. Az egyes agyterületek topológiai információit is figyelembe véve arra a következtetésre jutottunk, hogy az „erős-CB₁” sejtek nagy valószínűséggel a lehetséges gátló interneuronok, míg a „gyenge-CB₁” sejtek az agyterületek principális sejtjei közül kerülnek ki. Például a hippocampusban a principális sejtek viszonylag tömött sejtisorokban helyezkednek el, így azonosításuk ez alapján is megtörténhet. A piramisrétegben elhelyezkedő egyéb sejtek általában szignifikáns morfológiai eltéréseket mutatnak a piramissejtektől. A *Necab1* és *Necab2* jeldúsulási értékeket is kiszámoltuk a vizsgált sejteknél, és a *Necab1*, valamint a *Necab2* tartalom szerint kategorizálva jelenítettük meg a grafikonokon, hogy képet kapjunk arról, hogy a CB₁⁺ sejtek hány százaléka fejezi ki a *Necab1*-et és a *Necab2*-t.

A kísérletben részt vett: Kelemen Krisztina és Csapóné Miczán Vivien.

2.1.6.2 *A fluoreszcens immunfestések képalkotása és képelemzése*

Egy 20×-os és 60×-os nagyítású objektívekkel felszerelt NIKON A1R mikroszkópot használtunk, hogy nagy felbontású z-tömböket készítsünk a hippocampusban, a szomatoszenzoros kéregben, illetve a bazolaterális amygdalában készült fluoreszcens immunfestésekről a perfundált állatokban. A képeken ezután a CB₁⁺ sejttesteket az immunfestés alapján manuálisan választottuk ki, és bennük vizsgáltuk a NECAB1 és NECAB2 immunjelet.

A biocytinnel töltött egyedi sejteken külön szeleteken vizsgáltuk a CB₁ tartalmat az axonterminálisokban, majd a NECAB1 és NECAB2 fehérjék elhelyezkedését elemeztük a szomatikus, dendritikus és axonális sejtrészekben.

A kísérletben részt vett: Csapóné Miczán Vivien, Kelemen Krisztina és Glavinics Judit.

2.1.7 **Korrelált konfokális és STORM mikroszkópia, képelemzés**

A fedőlemezre szárított 10 µm vastag mintákat a szuperrezolúciós képalkotás előtt 25 µL speciális képalkotó oldattal fedtük le (Abbelight Smart Buffer), majd körömlakkal a tárgylemezhez rögzítettük. A képalkotáshoz NIKON Ti-E invertált mikroszkópot használtunk, melyhez NIKON N-STORM rendszer, C2 szkennervej és egy Andor iXon Ultra 897 EMCCD kamera csatlakozott. A képeket egy Apo TIRF 100×-os nagyítású, 1,49-es numerikus apertúrájú objektívvel készítettük. A képalkotást egy N-STORM modulussal kiegészített NIKON NIS-Elements AR szoftver vezérelte. A STORM-hoz szükséges megvilágítást egy 300 nW-os (VFL-P-300-647, MPB Communications), valamint egy Melles Griot 56RCS/S2780 lézer biztosította. A feldolgozni kívánt területeket (a biocytinnel töltött sejtek axonterminálisait és dendritjeit) 488 nm-es megvilágítással jelöltük ki az élő képen, majd konfokális z-tömböket (512 × 512 × 15 voxel, 80 × 80 × 150 nm voxelméret) készítettünk 488 nm-es és 647 nm-es

megvilágítással. Ezután a NECAB1 és NECAB2 festésekről direkt STORM képalkotással készítettünk képeket 5000 megvilágítási cikluson keresztül 30 ms-os expozíciós idővel egy STORM (far-red, long pass) filterkocka segítségével. A látótér szükséges ferde megvilágítását egy teljes visszaverődésen alapuló fluoreszcens világítóeszköz (TIRF) biztosította. A három dimenziós STORM képeket egy hengeres lencse segítségével értük el [95], illetve a képalkotás stabilitását egy Perfect Focus System (PFS) biztosította.

A konfokális z-tömböket a Huygens 4.2.1 program (SVI, Hollandia) alkalmazásával dekonvolváltuk, melyhez klasszikus maximum likelihood becslő (CMLE) algoritmust és elméleti pontválasz függvényt (PSF) használtunk 100 iterációval. A képelemzést a z-tömb három középső eleméből létrehozott maximális intenzitás projekciós képein végeztük, hogy ezáltal biztosítsuk a STORM képalkotási térfogattal megegyező régiót.

A nyers STORM képekből a NIS-Elements AR program N-STORM modulja segítségével generáltunk molekuláris koordinátákat a 3D-DAOSTORM csúcsetektáló algoritmus segítségével [96], [97].

A korrelált konfokális és STORM képanalízist az általunk készített VividSTORM program segítségével végeztük [26]. Először manuálisan illesztettük a konfokális képeket a STORM koordináták egymásnak megfelelő csatornáira (NECAB1, illetve NECAB2), majd objektív módon kiválasztottuk a további analízishez használni kívánt régiókat az élnélküli morfológiai aktív kontúr (MACWE) [39] algoritmus segítségével. Ezután kiválasztottuk csak azokat a STORM pontokat, amelyek a sejtöltés konfokális képe alapján a kívánt régióba tartoztak, majd a STORM pontok sűrűségét származtattuk a pontok száma (NLP=Number of Localization Points) és a kiválasztott területek nagyságának hányadosából. A régiók STORM NLP értékeit normalizáltuk a képenkénti átlagos lokalizációs pont sűrűsége, hogy ezáltal elkerüljük a STORM képalkotási változékonyságból fakadó hibákat.

A Ripley L függvények kiszámítását egy általunk R programnyelvben írt kódrészlettel kiviteleztük. A rendelkezésre álló spatstat könyvtár [98] Lest függvényét használtuk izotrópiás határkorrekcióval, és 1000 nm maximális sugárral. A korábban kiválasztott NECAB1-axonterminális/NECAB1-dendrit/NECAB2-axonterminális/NECAB2-dendrit területeket a maximális sugár távolságán kívül helyeztük el egymástól, és így számítottuk ki a Lest függvény értékét, hogy együtt tudjuk elemezni az egyes kategóriák adatait.

A kísérletben részt vett: Csapóné Miczán Vivien és Glavinics Judit.

2.1.8 Statisztikai elemzés és ábrakészítés

Az adatok statisztikai elemzése a STATISTICA 13.4 szoftverrel (TIBCO Data Science) történt. A szükséges elemszámokat korábbi kísérletes tapasztalatok alapján határoztuk meg, és megfelelnek a kutatási területen általánosan használt irányelveknek. Az adatok eloszlásának normalitását Kolmogorov–Smirnov teszttel végeztük, ahol nem találtuk normális eloszlásúnak

az adatokat, ott nem paraméteres tesztek végeztünk. Az egy csoportba tartozó különböző kísérleti állatokhoz tartozó adatokat a Kruskal–Wallis teszttel ellenőriztük, hogy szignifikánsan különböznek-e egymástól, ha igen, akkor az állatok átlag értékeit vizsgáltuk, ha nem, akkor összevontuk őket, és az egyedi adatpontokat jelenítettük meg. Az egyes csoportok közötti különbséget Mann–Whitney U-teszttel vizsgáltuk. Az adatok minden esetben megfeleltek az alkalmazott statisztikai módszer kritériumainak. Az ábrákat Photoshop CS5 (Adobe Systems) program segítségével készítettük el. Az egy ábrán található különböző mintákból származó képeken csakis azonos módosításokat hajtottunk végre az összehasonlíthatóság megtartásának érdekében.

A statisztikai analízisben és ábrakészítésben részt vett: Csapóné Miczán Vivien, Kelemen Krisztina és Glavinics Judit.

2.2 A prenatális THC kezelés hatásainak vizsgálata

2.2.1 Állatok

Az állatkísérletes minták ebben a kutatási projektben a Cagliari Egyetemről (Olaszország) származtak, és minden kísérletet jóváhagyott az egyetem állatetikai bizottsága, valamint az olasz Egészségügyi Minisztérium (engedélyszám: 659/2015-PR és 725/2019-PR), és megfeleltek az Európai Unió 2010/63-as irányelveinek. Törekedtünk az állatok számának és fájdalmuknak minimalizálására.

Először szülő nőtény Sprague Dawley (Envigo) patkányokat normál hímekekkel pároztattunk, és a vemhesség során egyedül tartottunk. Az 5. gestációs naptól (GD) a 20. napig napi 1 darab Δ^9 - tetrahidrokannabinol (2 mg/kg) vagy vehikulum szubkután injekciót kaptak az anyák. Az utódokat a születésük utáni 21. nap környékén választottuk el, és hagyományos körülmények között tartottuk (21 °C, 60%-os páratartalom, normál 12 órás fény / sötétség ciklus és *ad libitum* hozzáférés az ételhez és a vízhez). Egy alomból maximum 2 hímot használtunk fel egy-egy kísérlethez, hogy kiküszöböljük a minta torzítását.

A kísérletben részt vett: Claudia Sagheddu, Valeria Serra és Sonia Aroni.

2.2.2 Viselkedési analízis

2.2.2.1 A megriadási reflex és pre-pulzus gátlás mérése

A megriadási reflexet és a szenzorimotoros gátlást (PPI: pre-pulse inhibition) a korábban leírtakhoz hasonlóan mértük [99], vagyis a mérési összeállítás (Med Associates) négy hagyományos ketrecből állt, amelyeket hangszigetelt helyiségben helyeztünk el, ventilátoros levegőztetéssel. Minden ketrec magában foglalt egy plexiüvegből készült, 5 cm átmérőjű hengert, mely egy piezoelektromos gyorsulásmérőhöz és egy analóg-digitális átalakítóhoz csatlakozott. Két különböző hangszóróból háttérzaj és éles hanghatások (acoustic bursts) szólaltak meg, és ezeket úgy állítottuk be, hogy a ketrec minden pontján legfeljebb

1 dB-es szórást mutassanak. Mind a hangszórókat, mind a ketreceket összekötöttük egy számítógéppel, mely egy speciális szoftver segítségével rögzítette az adatokat. Minden kísérlet előtt kalibráltuk az akusztikus stimulusokat és a mechanikus visszajelzéseket a Med Associates által biztosított eszközökkel.

A kísérletek alatt 70 dB-es háttérzajt használtunk 5 percen keresztül a hozzászoktatási periódusban, majd három teszt fázis következett. Az első és a harmadik teszt fázisban öt, csak egy jelből álló próba során 115 dB-es hangot mutattunk a patkányoknak, míg a második fázisban 50 próba pseudo random sora következett, mely 12 csak jelből, 10-10 olyan jelből, melyet megelőzött egy 74, 78 vagy 86 db-es megelőző hang és 8 stimulus nélküli próbából állt, melynek során csak a háttérzaj szólt. A próbák közötti intervallum 10 és 15 másodperc között random változott. A prepulzus gátlás (PPI) %-os értékét a következő képlet alapján számoltuk ki:

$$100 - \left[\left(\frac{\text{a megriadás átlagos amplitúdója a megelőző hangos próbákban}}{\text{a megriadás átlagos amplitúdója a csak jelből álló próbákban}} \right) * 100 \right]$$

A különböző hangerejű megelőző hangos próbák eredményeit összevontuk, mert nem találtunk szignifikáns különbséget köztük.

A kísérletekben részt vett: Roberto Frau, Francesco Traccis, Valeria Serra, Silvia Fanni és Mauro Congiu.

2.2.2.2 Lokomotoros aktivitás

A kísérletben résztvevő Sprague Dawley patkányokat egy számukra ismeretlen nyílt terep (42 × 42 × 30 cm) közepére helyeztük, és 40 percig figyeltük a tevékenységüket, melyet Omnitech Digiscan rendszer segítségével elemeztünk. Ez magában foglalta a teljes megtett úthossz (cm), és azt, hogy mennyi időt töltöttek az állatok a terület közepén (egy 20 × 20 cm-es négyzet alakú területen közepén) és szélén (a falaktól 20 centiméteres sávban).

A kísérletekben részt vett: Roberto Frau, Francesco Traccis, Valeria Serra, Silvia Fanni és Mauro Congiu.

2.2.3 Agyi mikrodialízis

A patkányokat Equithesin segítségével altattuk, majd egy Kopf sztereotaxiás készülékben rögzítettük, ezután egyedileg tervezett vertikális mikrodialízis próbákat (AN 69-HF membrán, Hopal-Dasco; 40.000 Dalton, 3 mm dializáló membrán hossz) ültettünk a nucleus accumbens shell részébe (AP: +1,5, L: +/-0,7, V: -7,0 a bregmától számítva sztereotaxiás atlasz koordinátákat [100] használva), empirikus korrekcióval. A patkányok antibiotikus kezelést kaptak (enrofloxacin, Bayer HealthCare), és a saját ketrecükben lábadoztak a tesztelés idejéig. A próba beültetése utáni napon egy CMA / 100-as

mikroinjekciós pumpa (Carnegie Medicine) segítségével mesterséges agy-gerincvelői folyadékot (ACSF: 147 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 6-6,5) pumpáltunk a dialízis próbán keresztül 1,1 µL/perces állandó sebességgel. 20 percenként vettünk mintát, és azonnal mértük a dopamin szinteket egy nagyhatékonyságú folyadékkromatográf (HPLC) segítségével elektrokémiai detekció alkalmazásával a korábban leírtak szerint [101]. Stabil alapszint elérése után (három egymást követő minta 15%-nál kisebb szórással rendelkező) intraperitoneálisan THC-t adtunk az állatoknak (2,5 mg/kg, 2 mL/kg), és további két órán keresztül folytattuk a mintagyűjtést. Az adatgyűjtés után a patkányokat Equithesinnel túlaltattuk, majd az agyak eltávolítása után azokat Leica CM3050 típusú kriosztát segítségével 40 µm vastag szeletekre vágtuk, hogy validáljuk a dialízis próbák anatómiai elhelyezkedését.

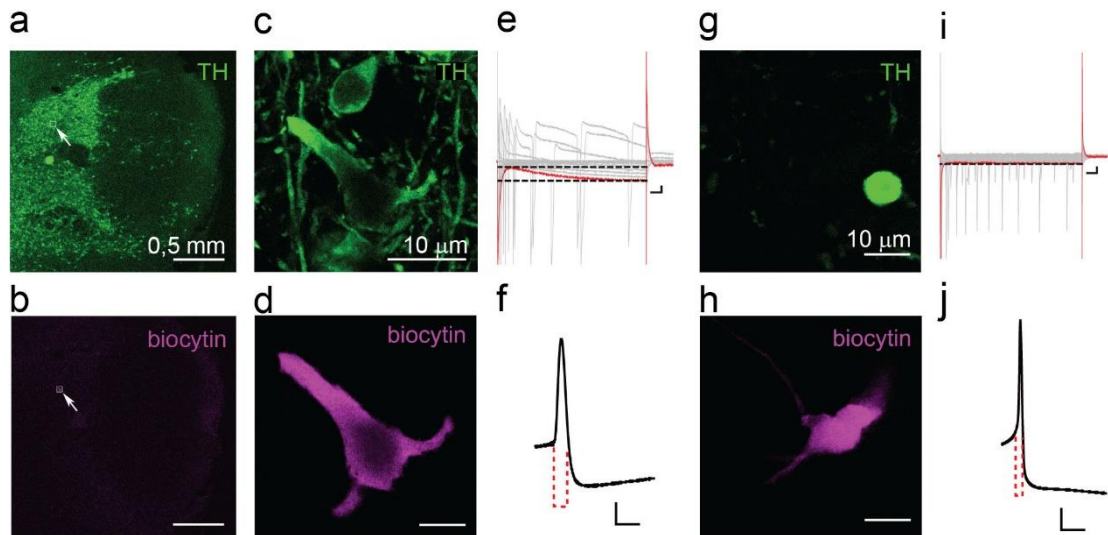
A kísérletekben részt vett: Pierluigi Saba és Paola Devoto.

2.2.4 Elektrofiziológiai elvezetés

Az izofluránnal mélyen elaltatott hím patkányok agyának gyors eltávolítása után azokból 300 µm-es horizontális szeleteket készítettünk egy Leica vibratóm segítségével jéghideg alacsony Ca²⁺ tartalmú oldatban, mely a következő anyagokat tartalmazta (mM-ban): 126 NaCl, 1,6 KCl, 1,2 NaH₂PO₄, 1,2 MgCl₂, 0,625 CaCl₂, 18 NaHCO₃ és 11 glükóz. A szeleteket ezután 37 °C-os ACSF-et tartalmazó, 95% O₂ és 5% CO₂ elegyével telített kamrába helyeztük, mely a következő oldatot tartalmazta (mM-ban): 126 NaCl, 1,6 KCl, 1,2 NaH₂PO₄, 1,2 MgCl₂, 2,4 CaCl₂, 18 NaHCO₃ és 11 glükóz. Itt a szeletek minimum egy órát tartózkodtak, mielőtt a mérő kamrába helyeztük volna őket, melyben 95% O₂, 5% CO₂ elegyével telített ACSF-et keringtettünk. A sejteket egy infravörös megvilágítású Zeiss Axioskop FS 2 plus mikroszkóp segítségével vizualizáltuk, és a teljes sejt patch-clamp elvezetést egy AxioPatch 200B erősítő (Molecular Devices) segítségével oldottuk meg. Az elvezetés a VTA laterális részéből történt.

A kiváltott gátló posztszinaptikus áramok (IPSC) voltage-clamp elvezetéséhez és a current-clamp elvezetésekhez olyan elektródokat használtunk, melyek a következő oldattal töltöttük meg (mM-ban): 144 KCl, 10 HEPES, 3,45 BAPTA, 1 CaCl₂, 2,5 Mg₂ATP, 0,25 Mg₂GTP, pH=7,2-7,4, 275-285 mOsm ozmolaritás. A GABA_A IPSC-eket 2-amino-5-foszfopentánsav (AP5, 100 µM), 6-ciano-2,3-dihidroxi-7-nitro-quinoxalin (10 µM), sztrichnin (1 µM) és eticlopride (100 nM) jelenlétében vettük fel, hogy kiküszöböljük az NMDA, AMPA, glicin és dopamin D₂ receptorok által közvetített áramokat. A current-clamp kísérletek a farmakológiai gátlószerek használata nélkül történtek. A kísérleteket csak az után kezdtük el, hogy az ellenállás stabilizálódott (R_s, 10-30 MΩ), amit egy 10 másodpercenként adott 4 mV-os hiperpolarizáló pulzus segítségével ellenőriztünk. Az adatokat kizártuk az analízisből, ha az ellenállás 20%-ot meghaladó mértékben változott.

A kiváltott serkentő áramok (EPSC-k) voltage-clamp méréseit a következő oldattal töltött elektródákkal vizsgáltuk (mM-ban): 117 Cs metánszulfonsav, 20 HEPES, 0,4 EGTA, 2,8 NaCl, 5 TEA-Cl, 0,1 spermine, 2,5 Mg₂ATP, 0,25 Mg₂GTP, pH=7,2-7,4, 275-285 mOsm. Az ACSF-hez pikrotoxint adtunk, hogy blokkoljuk a GABA_A receptor közvetítette áramokat. Ezen kívül a kísérletek egy részében az elektróda oldatához 0,2% biocytint adtunk, hogy később rekonstruálni tudjuk a sejteket, és meghatározzuk, hogy tartalmazznak-e tirozin-hidroxilázt, ami a dopaminerg sejtek egyik ismérve [102] (7. ábra).



7. ábra Patkány horizontális agyszeletben biocytinnel töltött idegsejtek sejtípusának meghatározása

a) Tirozin-hidroxiláz immunfestés patkány horizontális agyszeleten, b) benne biocytinnel töltött sejttel.

c, d) Az a) ábrán kijelölt terület kinagyítva, egy TH⁺ biocytinnel töltött sejt sejtteste.

e, f) Példa elvezetések a biocytinnel töltött sejtől. Az e) ábrán nagy h-áram látható (piros jelalak, kalibráció: 200 pA, 20 ms), az f) ábrán széles akciós potenciál figyelhető meg (kalibráció: 10 pA, 10 ms).

Ezzel szemben a g, h) ábrán egy TH⁻ biocytinnel töltött sejt látható, melynél i) nem figyelhető meg a h-áram (kalibráció 200 pA, 20 ms), és j), és keskenyebb akciós potenciál jellemző rá (kalibráció: 10 pA, 10 ms), ez az agyterületről szerzett korábbi ismereteink alapján feltehetően egy GABAerg sejt.

A kísérletek során n=15 TH⁺ sejtet azonosítottunk és n=2 TH⁻ sejtet.

A soros és bemeneti ellenállást folyamatosan vizsgáltuk egy 5 mV-os depolarizáló impulzussal (25 ms). Az adatokat 2 kHz-en szűrtük, 10 kHz-en digitalizáltuk, és pClamp 10.2 (Molecular Devices) szoftverrel rögzítettük. A posterior VTA laterális részében biocytinnel töltött dopaminerg neuronokat morfológiájuk és anatómiai elhelyezkedésük (mediálisan a kiegészítő látópálya mediális terminális magjától), lassú pacemaker-szerű tüzelési mintájuk (<5 Hz), széles akciós potenciáljuk (>2 ms) és egy nagy h-áram (>150 pA) jelenléte [103] alapján azonosítottuk. A h-áramot rögtön a kísérlet kezdetén, 13 darab növekvő 10 mV-os hiperpolarizáló négyszögjel (250 ms) segítségével, -70 mV-os tartó potenciálon mértük. A valószínűsíthetően GABAerg neuronokat a morfológiájuk, a h-áram hiánya, a keskeny akciós potenciáljuk (<2 ms) és a TH-festés hiánya alapján azonosítottuk.

A stimulációt is igénylő mérésekhez egy bipoláris rozsdamentes acél elektródát (FHC) használtunk, melyet ~100-200 μm-rel rostrálisan helyeztünk el a másik elektródától, és 0,1 Hz-es stimulációt végeztünk vele. A párosított stimulusokat 50 ms különbséggel adtuk, a

második és az első posztzinaptikus áram (PSC) arányát (PSC_2 / PSC_1) is kiszámoltuk, és az 5 perces alapszintre átlagoltuk. Az NMDA EPSC-k kiváltásához a sejteket +40 mV-on tartottuk. Az AMPA EPSC-eket NMDA-antagonista (D-AP5, 100 μ M) alkalmazása során izoláltuk. Az NMDA EPSC-k értékeit úgy kaptuk meg, hogy a teljes EPSC-ből kivontuk az AMPA áramokat. Az AMPA / NMDA arányt valószínűleg alábecsültük, mivel a kísérletek során spermine-t tartalmazott a pipetta. A spontán mini EPSC-k (mEPSC) és IPSC-k (mIPSC) mérését lidokain (500 μ M) vagy TTX (1 μ M) jelenlétében végeztük, és a csoportonként 120 darab, 1 másodperces jelsorozatból álló jelet Mini Analysis program (Synaptosoft) segítségével elemeztük. A minik amplitúdójának helyes megállapításához csak a 8 pA-nél nagyobb eseményeket vettük figyelembe (felfutási idő <1 ms, lecsengési idő <3 ms), erre a magas jel-zaj-arány eléréséhez volt szükség. Minden eseményt manuálisan is megvizsgáltunk, hogy kizárjuk az analízisből a zajok lehetséges hatásait. A kísérleteket a kezelési csoportokra vakon végeztük.

A kísérletekben részt vett: Miriam Melis.

2.2.5 Immunfestés

A patkány agyakat 4% (m/V) PFA oldattal való transzkardiális perfúzióval vagy egy éjszakán át tartó 4% PFA inkubációval fixáltuk, majd a felhasználástól függően 20, 40 vagy 50 μ m-es szeleteket készítettünk a középagyból egy Leica VT-1000S vibratóm segítségével PB-ben. A szeletek az immunfestés közben szabadon mozogtak a folyadékban. PB-ben és 0,05 M TBS-ben (pH=7,4) való többszöri mosás után a membránokat átjárhatóvá tettük az antitestek számára, és blokkoltuk a nem specifikus kötőhelyeket 0,3% (V/V) Triton X-100 és 5% NDS TBS-oldatával 45 percig, majd az elsődleges antitestek TBS oldatában (4. táblázat) hagytuk éjszakára folyamatos rázatás közben. Ezután a szeleteket TBS-ben mostuk, és a megfelelő másodlagos antitestekkel inkubáltuk őket (4. táblázat). Egyes esetekben DAPI-t is alkalmaztunk 1:1000 koncentrációban a sejtmagok megjelölésére, majd TBS és PB mosások következtek.

A kísérletekben részt vett: Csapóné Miczán Viven.

4. táblázat A kísérletekhez felhasznált elsődleges antitestek

Antitest típus	Cél	Faj	Koncentráció	Forrás
Elsődleges antitestek	Anti-Bassoon	nyúl	1:1000	Millipore ABN255
	Anti-Cannabinoid receptor 1-es típus	nyúl	1:1000	ImmunoGenes
	Anti-Tirozin-hidroxiláz	egér	1:5000	ImmunoStar 22941
	Anti-Vezikuláris gátló aminosav transzporter (VIAAT)	nyúl	1:500	Synaptic Systems 131 003
	Anti-Vezikuláris gátló aminosav transzporter (VIAAT)	tengerimalac	1:2000	Synaptic Systems 131 004
	Anti-Vezikuláris glutamát transzporter 1 (vGluT1)	tengerimalac	1:5000	Synaptic Systems 135 304
Másodlagos antitestek	Alexa488-konjugált anti-egér	szamár	1:400	Jackson 715-545-150
	Alexa594-konjugált anti-nyúl	szamár	1:400	Jackson 711-595-152
	Alexa647-konjugált anti-nyúl	szamár	1:400	Jackson 711-605-152
	Alexa647-konjugált anti-tengerimalac	szamár	1:400	Jackson 706-605-148
	CF568-konjugált anti-tengerimalac	szamár	1:1000	Biotium 20377
	DyLight405-konjugált anti-egér	szamár	1:400	Jackson 715-475-151

2.2.6 Konfokális képalkotás és képanalízis

A konfokális képalkotáshoz a szeleteket Vectashield mikroszkópiás oldattal vagy Prolong Diamond (Invitrogen) mikroszkópiás oldattal fedtük le tárgylemezen, majd a fedőlemezt körömlakkal rögzítettük. Ezután konfokális képeket vagy z-tömböket készítettünk róluk egy NIKON A1R mikroszkóp segítségével.

A dopaminerg sejtek sűrűségét úgy vizsgáltuk, hogy egységnyi területen megszámoltuk a TH pozitív sejteket. Csak olyan sejteket vettünk figyelembe, amelyek a ventrális tegmentális terület kijelölt részén voltak, és látszott a jelölt sejtmagjuk, valamint jól kivehető TH festést mutattak a sejtestükben. Ezeken a területeken meghatároztuk a konfokális TH immunfluoreszcencia intenzitását is.

A dopaminerg sejtek vGluT1 és VIAAT tartalmú bemeneteit úgy határoztuk meg, hogy a biocytin töltés alapján rekonstruáltuk a sejteket, majd a sejtest és a dendritek 1 μm sugarú környezetében a transzporter csatornák képein küszöbölést hajtottunk végre, és megszámoltuk az olyan objektumok számát, amelyek 0,02 μm^3 -nál nagyobbak voltak, ezek voltak a potenciális axonterminálisok. Az ennél kisebbeket zajnak tekintettük, és kihagytuk az analízisből.

A kísérletekben részt vett: Csapóné Miczán Viven.

2.2.7 Korrelált konfokális és STORM képalkotás

A STORM képalkotáshoz a szeleteket 4%-os PFA oldatban utófixáltuk 10 percre, majd PB mosások következtek. A mintákat ezután acetonnal megtisztított #1,5-ös boroszilikát fedőlemezekre szárítottuk, és a képalkotásig szárazon tároltuk.

Közvetlenül a képalkotás előtt a mintákat frissen készített STORM képalkotási folyadékkal [25] fedtük le, mely a következő anyagok oldatát tartalmazta: 0,1 M ciszteamin, 5% (m/V) glükóz, 1 mg/mL glükóz-oxidáz és kataláz (2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ vizes oldat, kb. 1.500 U/mL végkoncentráció, Sigma) Dulbecco-féle PBS-ben (Sigma). A fedőlemezeket körömlakkal rögzítettük a tárgylemezekre, majd 10 perces száradás után a képalkotást maximum 3 óra időtartamban folytattuk. A képeket Nikon Ti-E invertált mikroszkóppal készítettük, melyhez Nikon N-STORM rendszer, CFI Apo TIRF 100 \times objektív (NA 1,49), Nikon C2 konfokális szkennerefej és Andor iXon Ultra 897 EMCCD tartozott. A 3 dimenziós STORM képalkotást hengeres lencse biztosította [95], és N-STORM modullal kiegészített Nikon NIS-Elements AR szoftver irányította a képalkotási folyamatot. Egy 300 mW-os lézer (VFL-P-300-647, MPB Communications) segítette a STORM képalkotást, a kívánt területet az élő EMCCD kép alapján kerestük meg 488 nm-es megvilágítással. Olyan axonterminálisokat választottunk ki, amelyek TH⁺ sejtek szomatodendritikus kompartmentjéhez csatlakoztak. Ezután többcsatornás konfokális z-tömböt készítettünk (512 \times 512 \times 15 voxel, 78 \times 78 \times 150 nm felbontás) 488, 561 és 647 nm-es gerjesztés segítségével. Pillanatszerű fakítási lépéssel

elértük, hogy a jel ne menjen telítésbe a képalkotás kezdetén sem, majd direkt STORM képalkotásra került sor 10.000 cikluson keresztül, 30 ms expozíciós idővel, folyamatos alacsony szintű aktivátor lézer (405 nm) és maximális reporter lézer (647 nm) megvilágítással STORM filterkockát (Nikon) és az EMCCD kamerát használva.

A kísérletekben részt vett: Csapóné Miczán Viven.

2.2.8 Korrelált konfokális és STORM képelemzés

A konfokális tömböket klasszikus maximum likelihood becslő algoritmus segítségével 100 iterációval, elméleti pontválasz függvényvel dekonvolváltuk, melyhez a Huygens (SVI) szoftvert használtuk. A STORM képanalízist a NIS-Elements AR N-STORM moduljával végeztük. A csúcsdetektálási küszöböt 1000 szürkeárnyalatra állítottuk. A korrelált konfokális és STORM képanalízis az általunk fejlesztett VividSTORM [26] program segítségével történt. A két különböző képalkotási módszerrel nyert képeket kézzel illesztettük egymásra, ehhez minden esetben rendelkezésre álltak korrelált konfokális és STORM csatornák. Képenként egy axonterminálist választottunk ki a felvételek közepéről, ugyanis itt a legkisebb a képalkotás és az illesztés torzítása. Az axonterminálisok, valamint az aktív zóna határát élnélküli morfológiai aktív kontúr algoritmus [39] segítségével jelöltük ki objektív módon, a megfelelő konfokális csatorna felhasználásával. Meghatároztuk azoknak a STORM lokalizációs pontoknak a számát, amelyek a kívánt területhez tartoztak, majd ezt az értéket normalizáltuk az adott kép teljes lokalizációs pont sűrűségére, hogy ezzel elkerüljük az esetlegesen a képalkotás eltérő minőségéből adódó variabilitást. Meghatároztuk a kijelölt axonterminálisok/aktív zónák területét, és erre vonatkozóan is kiszámoltuk a lokalizációs pontok sűrűségét, ezen kívül a konfokális csatornák kumulált és átlagos pixelintenzitását is mértük a kiválasztott területeken.

Az ábrákat Photoshop CS5 segítségével készítettük, és minden esetben ügyeltünk arra, hogy a különböző kezelési csoportok képeit ugyanúgy változtassuk, ezáltal összehasonlíthatóak legyenek a festések.

A kísérletekben részt vett: Csapóné Miczán Viven.

2.2.9 Statisztikai elemzés

Nem használtunk statisztikai módszert az elemszámok előzetes meghatározására, azokat az korábbi ismereteink, előkísérletek és irodalmi adatok [21], [102], [104] alapján becsültük. Az állatokat véletlenszerűen osztottuk be a kezelési csoportokba. A statisztikai elemzés GraphPad Prism 6 és STATISTICA 13.4 programok használatával történt. A kiszóró pontokat Grubb-féle teszt ($\alpha=0,05$) alapján azonosítottuk, és kizártuk az analízisből. Az adatszettek eloszlásának normalitásvizsgálata Kolmogorov–Smirnov teszttel történt, és az egy csoporton belüli állatok adatainak eloszlásának azonosságát Kruskal–Wallis próbával vizsgáltuk, hogy

megállapíthatjuk a megfelelő statisztikai módszert. A STORM analízishez az állatonként számolt átlag értékeket használtuk fel, a csoportok közötti különbséget Mann–Whitney U-teszttel állapítottuk meg. Az adatok minden esetben megfeleltek a használt statisztikai próbák feltételeinek. Az elektrofiziológiai adatokat ANOVA módszerrel vizsgáltuk (kétutas vagy egyutas, a feltételeknek megfelelően), vagy Student-féle t-próbával, Sidak-, Dunnett- vagy Bonferroni-féle post hoc teszttel kiegészítve. A viselkedési kísérleteket egyutas vagy többutas ANOVA segítségével analizáltuk, Tukey- vagy Fischer-féle LSD (least significant difference) teszttel a post hoc összehasonlításához. A korrelációs analízis Pearson-féle korrelációs koefficiens számításával történt. A szignifikancia szintet 0,05-nél állítottuk be. Az adatgyűjtés és analízis a kezelési csoportokra vakon történt.

A kísérletekben részt vett: Miriam Melis, Roberto Frau és Csapóné Miczán Viven.

2.3 Egyéni hozzájárulás

A dolgozatban bemutatott kísérleti módszerek közül az alábbiakat végeztem el:

A CB₁-pozitív interneuronok kalciumkötő fehérjéinek vizsgálata című projektben én végeztem a számítógépes egysejt mRNS adatbázis elemzését, az állatok transzkardiális perfúzióját, a biocytinnel töltött sejtek morfológiai elemzését, az immunfestéseket, a konfokális mikroszkópiát és képelemzést, a korrelált konfokális és STORM mikroszkópiát és képelemzést, a statisztikai elemzést és ábrakészítést, ezen lépések nagy részében tudományos diákköri hallgatóim, Dr. Kelemen Krisztina és Glavinics Judit is segítségemre voltak. A fluoreszcens *in situ* hibridizációs kísérletet László Zsófia és Kelemen Krisztina végezte el, az adatok elemzését Kelemen Krisztinával közösen végeztük. A biocytinnel töltött sejteket Barti Benjámin, Dr. Kenesei Kata és Dr. Kisfali Máté bocsátotta rendelkezésemre.

A prenatális THC kezelés hatásainak vizsgálata című projektben az immunfestéseket, a konfokális és STORM képalkotást és képanalízist, valamint az ehhez kapcsolódó statisztikai elemzést és ábrakészítést végeztem el. Az elektrofiziológiai elvezetéseket és sejtöltéseket Miriam Melis végezte. Roberto Frau, Francesco Traccis, Valeria Serra, Silvia Fanni és Mauro Congiu a viselkedési kísérletekben, Pierluigi Saba és Paola Devoto az agyi mikrodialízis mérésekben, Claudia Sagheddu, Valeria Serra és Sonia Aroni a kísérleti állatok kezelésében, Sonia Aroni és Joseph F. Cheer a DREADD kísérletekben vettek részt.

3 Eredmények I: A CB₁-pozitív interneuronok kalciumkötő fehérjéinek vizsgálata

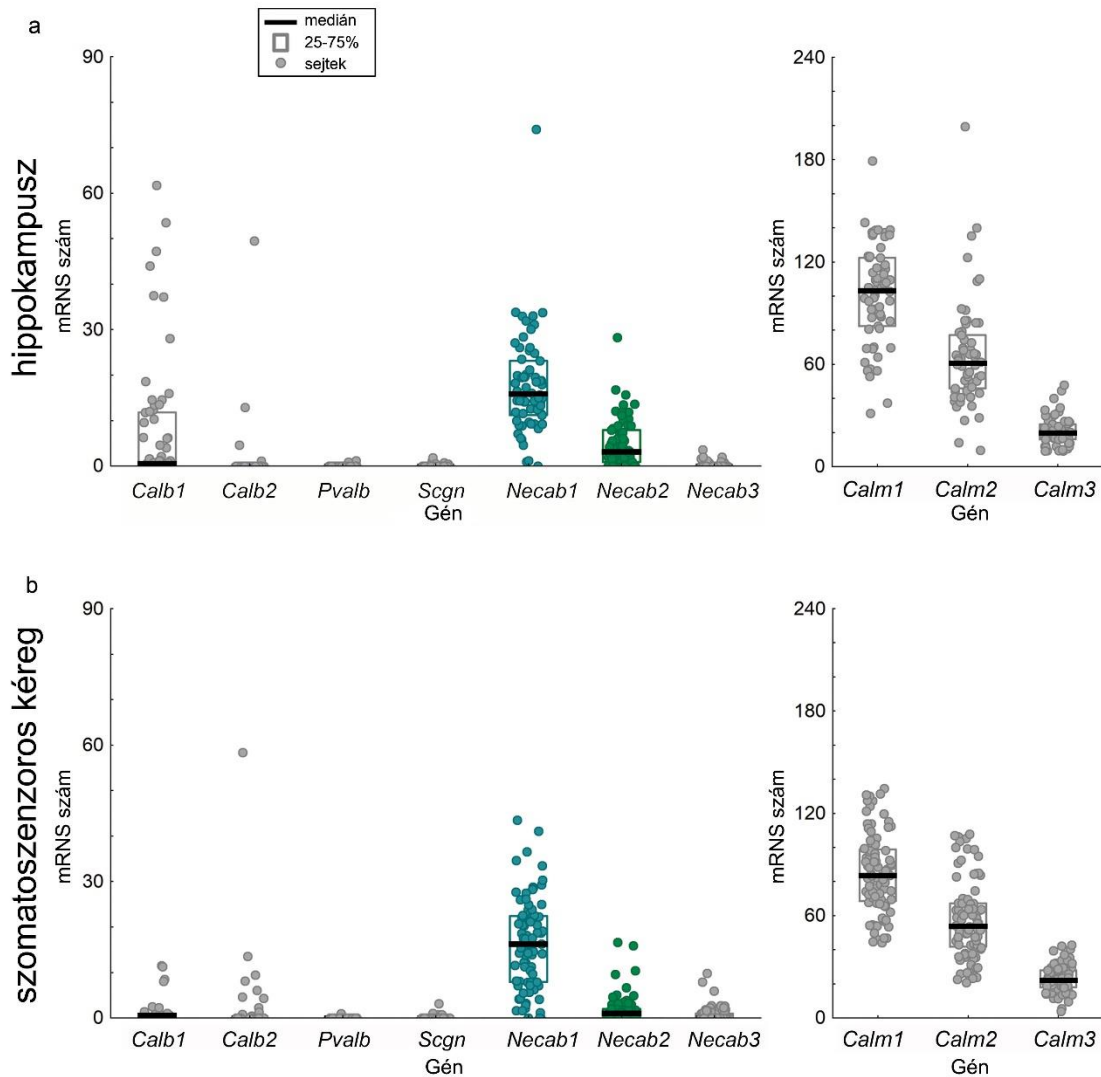
3.1 *In silico* egysejt mRNS-szekvenálási adatbázisok elemzése

Az elmúlt években az egysejt mRNS szekvenálás megjelenésével és folyamatos fejlődésével megnyílt a lehetőség arra, hogy különböző agyterületek sejtípusait azok mRNS tartalma alapján osztályozzuk. Ennek hatására többféle igen hasznos adatbázis látott napvilágot [1], [2], [44], [105]–[111], melyek segítségével vizsgálható az mRNS-ek egymáshoz képest való minőségi és mennyiségi kifejeződése az egyes sejtípusokban. Annak érdekében, hogy meghatározzuk, mely potenciális kalciumkötő fehérjék mRNS-ei találhatóak meg a CB₁+ hippokampális és kortikális interneuronokban, először Zeisel és munkatársai [2] *in silico* egysejt mRNS adatbázisának vizsgálata mellett döntöttünk, mivel ez több száz sejtet tartalmazott mindkét vizsgálni kívánt agyterületről (hippokampusz, szomatoszenzoros kéreg) jól osztályozott módon.

Először leszűrtük az adatbázisból annak saját annotációja alapján a gátló neuronokat, majd azokat *Cnr1* (a CB₁ fehérje mRNS-e) tartalmuk alapján osztályoztuk. Ezután a CB₁+ sejtekben minden olyan gén kifejeződését vizsgáltuk, melyek a Gene Ontology adatbázis [90]–[92] alapján összefüggésbe hozhatóak kalcium kötéssel (n=660 gén).

Azt találtuk, hogy várakozásainknak megfelelően a leggyakrabban előforduló kalciumkötő fehérje markerek (*Calb1/calbindin*, *Calb2/calretinin*, *Pvalb/parvalbumin*, *Scgn/secretagoin*) a CB₁+ interneuronok nagy részéből hiányoztak (8. ábra). Az is ismert volt, hogy a calbindin jelen van a rácsálók CB₁+ interneuronjainak egy részében [112], amit megerősített az adatbázis vizsgálata, de ez sem szolgál általános markerként. Találtunk viszont két érdekes jelöltet a viszonylag magas és stabil mRNS expressziójuk alapján, mégpedig az N-terminális EF-kéz kalciumkötő fehérje 1-es és 2-es típusát (*Necab1* és *Necab2*) (8. ábra). A fehérjecsalád harmadik tagja, a *Necab3* csak kis mennyiségben fejeződött ki a kiválogatott sejtjeinkben, így ennek a vizsgálatát nem folytattuk a továbbiakban.

Az *in silico* adatbázis elemzés során a módszer megbízhatóságának ellenőrzésére a kalmodulin kalciumkötő fehérje családot használtuk, mintegy pozitív kontrollként, hiszen ezek széles körben expresszálódnak az eukarióta sejtekben, amit megfigyeltünk a kiválasztott CB₁-es sejtjeinkben mind a hippokampuszban, mind pedig a szomatoszenzoros kéregben (8. ábra).



8. ábra A hippocampális és kortikális CB_1+ interneuronok kifejezik a *Necab1* és *Necab2* mRNS-eket *in silico* adatok alapján (ábra: Miczán és mtsai., módosítva)

a, b) Zeisel és munkatársai [2] egyedi sejt mRNS szekvenálási adatbázisának *in silico* elemzése alapján a CB_1+ interneuronok kalciumkötő fehérje expressziós profilja.

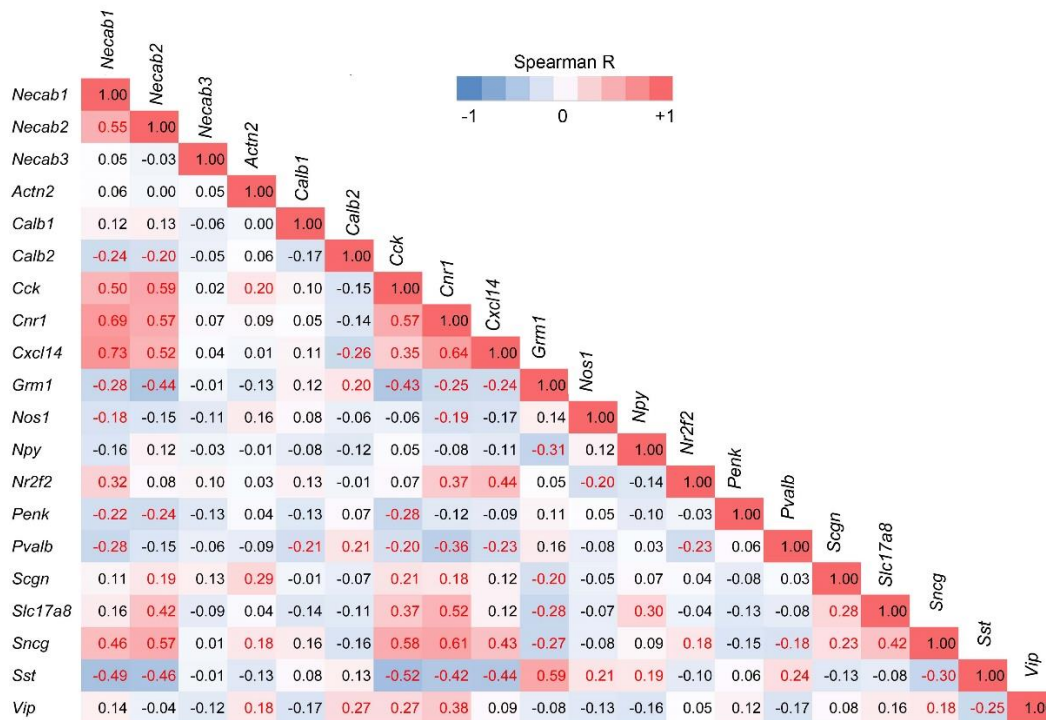
A klasszikus kalciumkötő fehérjék (calbindin – *Calb1*, calretinin – *Calb2*, parvalbumin – *Pvalb* és secretagoin – *Scgn*) alacsony szinten, és csak a CB_1+ interneuronok bizonyos alcsoportjaiban expresszálódnak, de a *Necab1* és *Necab2* mRNS-ek majdnem mindegyik CB_1+ sejtben kimutathatóak a) a hippocampusban ($n=61$ sejt) b) a szomatoszenzoros kéregben ($n=84$ sejt).

A kalmodulin kalciumkötő fehérjék mRNS-ei jelen vannak a CB_1+ interneuronokban is a) a hippocampusban, b) a szomatoszenzoros kéregben, és pozitív kontrollként szolgálnak a módszer validálásához.

Annak érdekében, hogy lássuk, hogy a *Necab1* és a *Necab2* kizárólagos markerei-e a CB_1 /CCK gátló idegsejt csoportnak, kiszámoltuk a Spearman-korreláció értéküket a hagyományos interneuron marker génekkel (9. ábra, 1. függelék ábra) az adatbázisból leszűrt összes interneuronban. Azt találtuk, hogy a *Necab1* és *Necab2* pozitívan korrelál a *Cnr1* (CB_1), *Cck* (cholecystokinin) és *Nr2f2* (COUP-TFII) génekkel, de más interneuron markerrel és az általánosan használt kalciumkötő fehérjékkel nem. Ez azt sugallja, hogy főként a CB_1 -es gátló idegsejt populációban fordulhatnak elő. Korábbi adatok alapján a COUP-TFII-t kifejező hippocampális gátló neuronok részben átfednek a CB_1 /CCK populációval, valamint ezen túl a

calbindint tartalmazó interneuronokkal, interneuron szelektív interneuronokkal, borostyán sejtekkel, neurogliaform sejtekkel, radiatum-retrohippokampális vetítő sejtekkel, de a parvalbumint és szomatosztatint kifejező interneuron populációval nem [113]. A *Necab*-ok korreláltak még kis mértékben az *Slc17a8*-cal is, ami a vezikuláris glutamát transzporter 3-as típusának (vGluT3) mRNS-e. Korábban leírták erről a fehérjéről, hogy a hippokampális CB₁+ interneuronok egy alcsoportjában fordul elő [114].

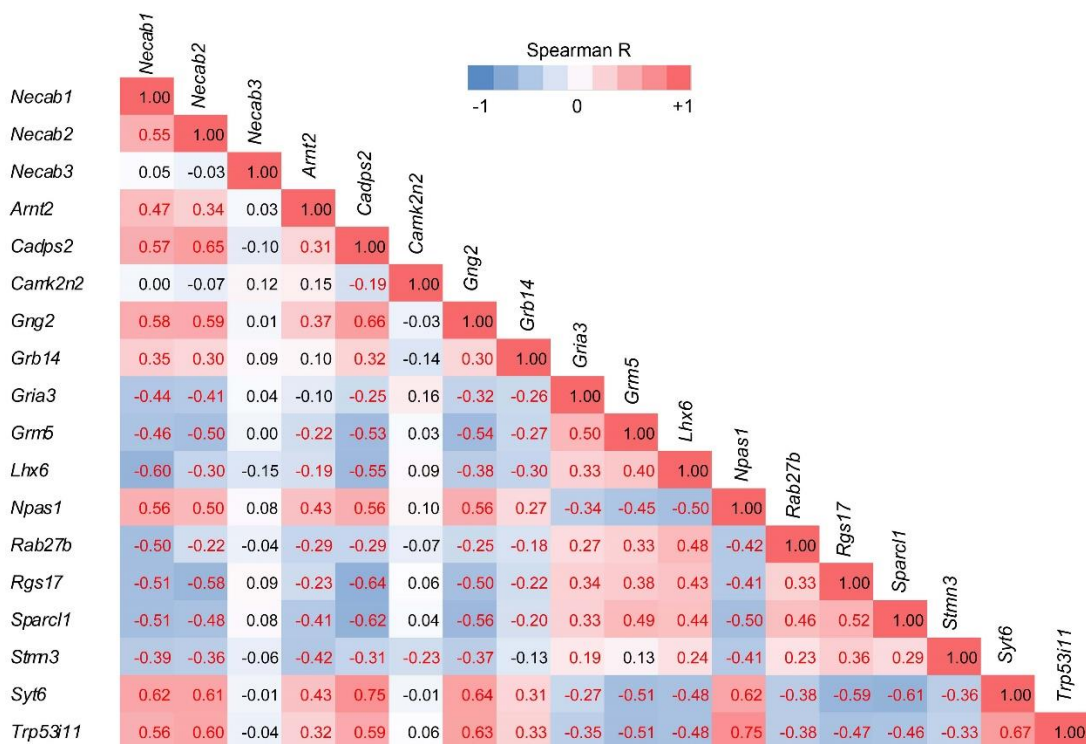
Mindezek alapján azt a hipotézist állítottuk fel, hogy a NECAB1 és a NECAB2 a hippokampális és kortikális CB₁+ interneuronok kalciumkötő fehérjéi.



9. ábra A *Necab* gének korrelációja hagyományos interneuron markerekkel az adatbázis összes gátló idegsejtjében ($n=126$) [2] (ábra: Miczán és mtsai., módosítva)

Mind a *Necab1*, mind a *Necab2* erős korrelációt mutat a *Cck* és *Cnr1* génekkel, ezen kívül még az *Nr2f2* és *Slc17a8* említhetőek meg, melyek irodalmi adatok alapján valószínűsíthetően egy-egy alcsoport markerei, míg más konvencionális interneuron markerek és kalciumkötő fehérjék nem mutatnak jelentős korrelációt a *Necab*okkal.

Ami még érdekesebbé teszi a *Necab1* és a *Necab2* géneket az adatbázis alapján, hogy felfedeztünk korrelációt olyan génekkel, amelyek a szinaptikus funkció szabályozásában vesznek részt (10. ábra, 1. függelék ábra) például a Calcium-dependent secretion activator 2 (*Cadps2*), Synaptotagmin 6 (*Syt6*), Piccolo (*Pclo*), Contactin-associated protein-like 2 (*Cntnap2*), Neurexin-3-alpha (*Nrx3*), Potassium channel tetramerization domain containing 12 (*Kctd12*), Neuropillin and tolloid-like 1 (*Neto1*), Cadherin-2 (*Cdh2*) és a Copine 5 (*Cpne5*). Ez azt vetíti előre, hogy a *Necabok* az idegsejtek szinaptikus funkciója szempontjából fontos szerepet betöltő gének lehetnek.



10. ábra A *Necab1* és *Necab2* gének expressziója korrelál bizonyos szinaptikus funkciót betöltő gének expressziójával (ábra: Miczán és mtsai., módosítva)
n=126 sejt alapján [2]

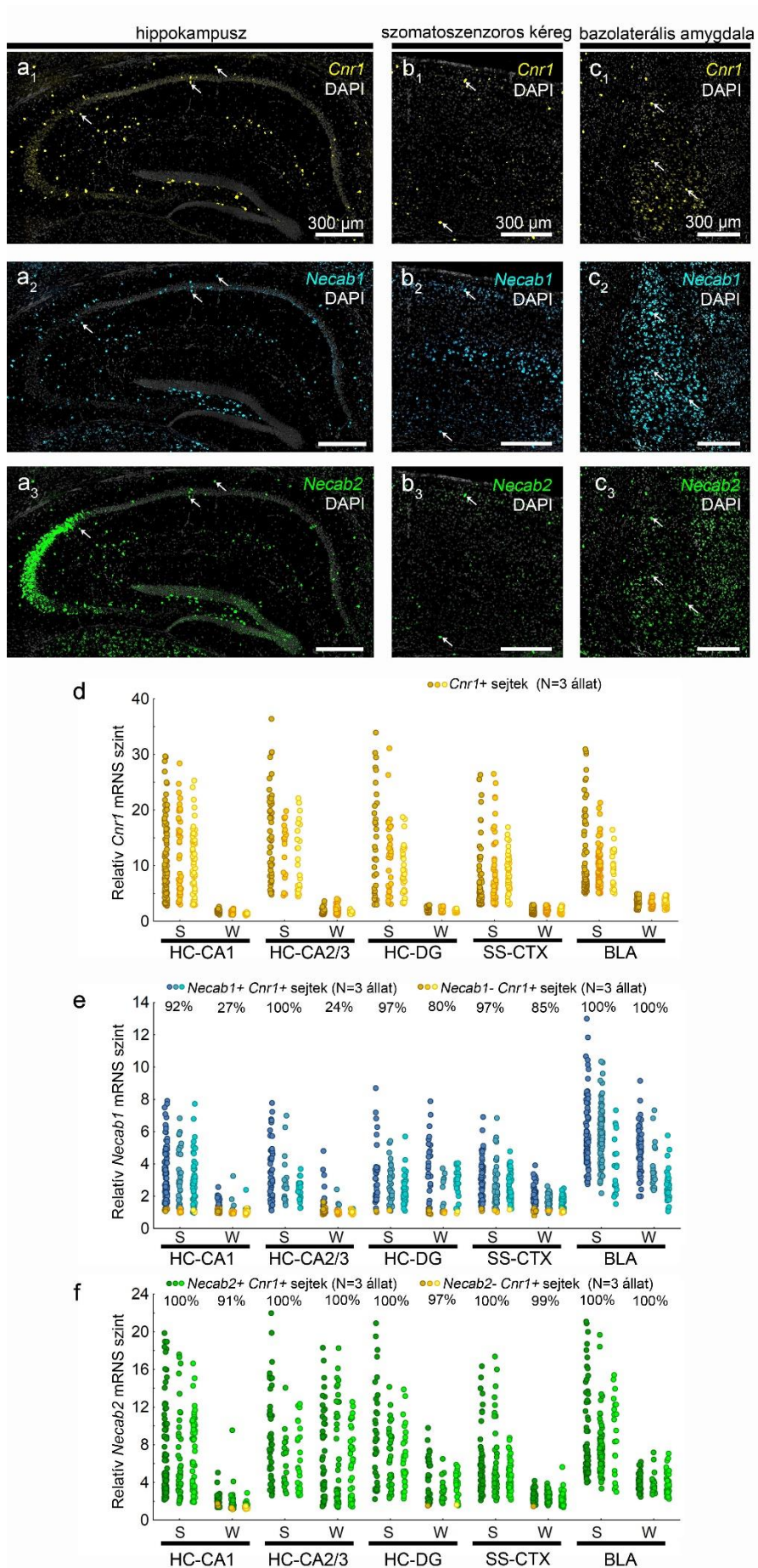
3.2 Az RNAscope *in situ* hibridizációs technika alkalmazása

A következőkben szeretnénk volna tesztelni az *in silico* elemzés alapján felállított hipotézisünket, ehhez pedig egy megfelelően érzékeny kísérletes módszerre volt szükségünk: így esett a választásunk a nemrégiben kifejlesztett többcsatornás fluoreszcens *in situ* hibridizációs technikára, az RNAscope-ra [115]. A *Cnr1*, a *Necab1* és a *Necab2* mRNS-ek korrelált expressziójának mértékére voltunk kíváncsiak, első lépésben az egér hippocampusban (11. ábra/a, d). Korábbi irodalmi adatok alátámasztják azt a megfigyelést, miszerint mind a hippocampális interneuronok, mind pedig ezen agyterület principális sejtei expresszálják a CB₁ receptor mRNS-ét, ám eltérő mennyiségben [116], [117]. Míg a piramissejtekben kevés ilyen receptor van, addig bizonyos interneuron típusok rengeteg CB₁ fehérjét tartalmaznak, főként az axonális kompartmentben. A *Cnr1* expresszió mértéke és topológiai információk alapján tehát a CB₁-es sejteket két csoportba soroltuk: „erős CB₁-es”, illetve „gyenge CB₁-es”. Az „erős CB₁-es” kategória tagjai valószínűsíthetően az interneuronok, míg a másik csoportba a principális sejtek tartoznak. Ezután megvizsgáltuk ezekben a sejtekben a *Necab1* és a *Necab2* expressziót. Azt találtuk, hogy a CA1-es régióban a CB₁-es interneuronok 92%-a tartalmaz *Necab1* és 100%-a *Necab2* mRNS-t (n=194 sejt, N=3 állat), míg minden CB₁+ interneuron *Necab1* és *Necab2* pozitív volt a CA2/CA3 régióban (n=93 sejt, N=3 állat). A gyrus dentatusban az „erős CB₁-es” sejtek 97%-ban volt a *Necab1*

megtalálható, míg az összes expresszáta a *Necab2* mRNS-t (n=105 sejt, N=3 állat). Az látható volt, hogy mind a CA1, mind a CA2/CA3 piramissejtek gyengébben expresszálják a *Necab1*-et, mint az interneuronok, és a CA1 piramissejtek a *Necab1*-et alacsony szinten, ám a *Necab2*-t magas szinten fejezik ki (n=141 és n=123 sejt területenként, N=3 állat) (11. ábra/a_{2,3}, e, f), ezáltal megerősítve a korábbi adatokat a két kalciumkötő fehérje differenciált expressziójára vonatkozóan [59]. A gyrus dentatus „gyenge CB₁-es” sejtjei 80%, illetve 97%-ban tartalmaztak *Necab1*-et, illetve *Necab2*-t (n=74 sejt, N=3 állat).

Teszteltük továbbá, hogy vajon általánosíthatóak-e a megfigyeléseink az előagy más területeire is, így kiterjesztettük a kísérleteinket a szomatoszenzoros kéregre (SS-CTX, 11. ábra/b) és a bazolaterális amygdalára (BLA, 11. ábra/c) is. Azt találtuk, hogy a kéregben 97%, illetve 100%-ban tartalmaztak az „erős CB₁-es” sejtek *Necab1*-et, illetve *Necab2*-t (n=156 sejt, N=3 állat), míg a „gyenge CB₁-es” sejteknek 85%, illetve 99%-a expresszáta a *Necab1*-et és a *Necab2*-t (n=143 sejt, N=3 állat). A BLA-ban minden CB₁+ sejtben kimutattuk mindkét kalciumkötő fehérje mRNS-ét. Érdekes módon a *Necab1* expresszió mértéke is hasonló volt a két kategóriát összehasonlítva, míg a vélhetően interneuronok magasabb expressziót mutattak a *Necab2*-ből a principális sejteknél (n=189 „erős CB₁ sejt”, n=119 „gyenge CB₁” sejt, N=3 állat).

Ezután arra voltunk kíváncsiak, hogy a hippokampusz CA1-es régiójában a *Necab*-ok kizárólagos markerei-e CB₁+ interneuron populációnak, így a kalciumkötő fehérjék irányából is megismételtük az analízisünket. Azt találtuk, hogy a *Necab1*+ sejtek csupán 1%-a, a *Necab2*+ sejtek 10%-a volt CB₁-negatív (n=3 és 25 CB₁-negatív sejt markerenként), és ugyanezt az arányt találtuk a CA2/CA3 régióra is (n=6 *Cnr1-Necab1*+, n=12 *Cnr1-Necab2*+ sejt). A mintavétel (egy sejtől egy optikai metszetet vizsgálunk), illetve a módszer jellegéből adódóan inkább fals negatív, mint fals pozitív sejtek megfigyelésére ad módot. Ezek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a hippokampusz CA1 ill. CA2/CA3 régiójában a *Necab1*, illetve a *Necab2*+ interneuronok többsége CB₁-pozitív.



11. ábra Az RNAscope többszörös fluoreszcens *in situ* hibridizációs analízis alapján a CB₁-pozitív sejtek expresszálnak *Necab1* és *Necab2* mRNS-t (ábra: Miczán és mtsai, módosítva)

Reprezentatív ábrák RNAscope fluoreszcens *in situ* hibridizációról CB₁ (*Cnr1*, sárga), *Necab1* (cián) és *Necab2* (zöld) csatornákról egér a) hippokampuszban (HC), b) szomatoszenzoros kéregben (SS-CTX), c) bazolaterális amygdalában (BLA). A sejtmagok minden ábrán DAPI (fehér) jelölővel vannak megfestve.

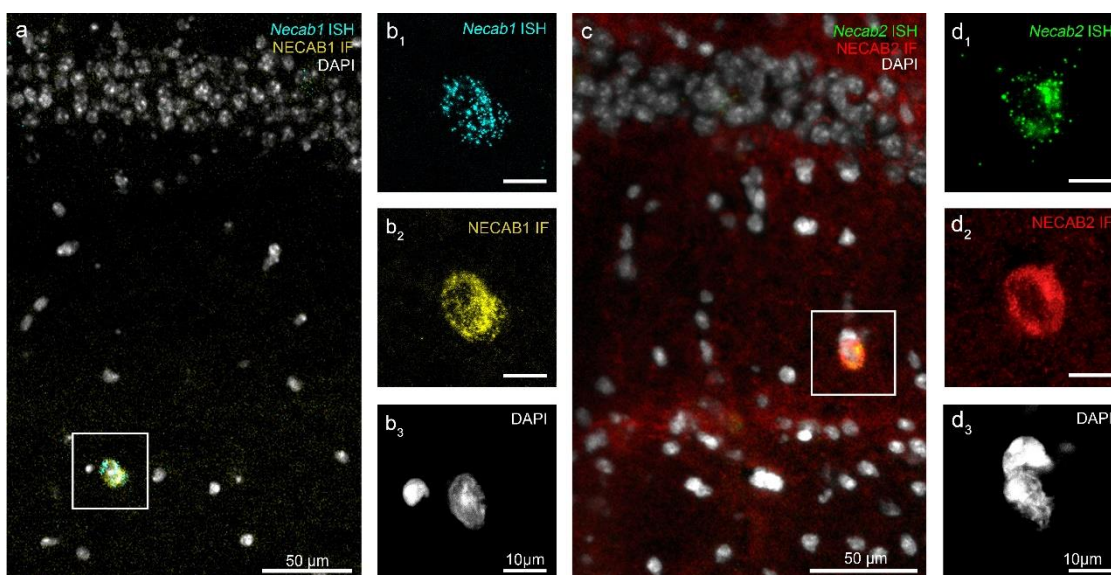
d) A *Cnr1* mRNS-t expresszáló sejtek klasszifikációja erős (S) és gyenge (W) csoportba a relatív CB₁ *in situ* hibridizációs jel alapján a HC CA1, CA2/3, gyrus dentatus (DG), SS-CTX és BLA régiókban (S-HC-CA1 n=194, W-HC-CA1 n=141, S-HC-CA3 n=93, W-HC-CA3 n=123, S-HC-DG n=105, W-HC-DG n=74, S-SS-CTX n=156, W-SS-CTX n=143, S-BLA n=189, W-BLA n=119 sejt, N=3 állat).

e) Relatív *Necab1* *in situ* jel a *Necab1*+ *Cnr1*+ (cián) és *Necab1*- *Cnr1*+ (sárga) sejtekben. A *Necab1*+ *Cnr1*+ sejtek százalékos aránya a grafikon felett található.

f) Relatív *Necab2* *in situ* jel a *Necab2*+ *Cnr1*+ (zöld) és *Necab2*- *Cnr1*+ (sárga) sejtekben. A *Necab2*+ *Cnr1*+ sejtek százalékos aránya a grafikon felett található.

3.3 Immunfestések populációs szinten

Miután mRNS szinten megerősítettük az *in silico* adatbázis vizsgálattal felállított hipotézisünket, szerettünk volna továbblépni, és fehérje szinten is megismételni ezt, melyhez a fluoreszcens immunfestés módszerét választottuk. Az antitestek érzékeny és hathatós eszközök a biológiai kutatásokban, ám rendkívül fontos annak ellenőrzése, hogy valóban a kívánt célpontot jelölik-e. Így első lépésként validáltuk a rendelkezésre álló NECAB1 és NECAB2 antitesteket, méghozzá a fluoreszcens immunfestés (IF) és az *in situ* hibridizáció (ISH) kombinálásával. A célunk az volt, hogy lássuk, hogy az immunfestéssel jelölt NECAB1+, illetve NECAB2+ sejtek valóban tartalmaznak-e *Necab1*, illetve *Necab2* mRNS-t, illetve, hogy lássuk, hogy az ISH- sejtek nem IF+-ak. Az eredmények fényében elmondható, hogy az *in situ* jel és az immunjel korreláltak egymással, hiszen a vizsgált 61 NECAB1 IF+ sejtből 61 volt *Necab1* ISH+ (N=3 állat), és 82 NECAB2 IF+ sejtből 82 bizonyult *Necab2* ISH+-nak (N=3 állat) (12. ábra). A másik irányból nem kvantifikáltuk a kolokalizáció arányát, mivel az immunfestés hatékonysága az *in situ* hibridizációhoz szükséges mintaelőkészítés hatására csökkent, így az immunpozitivitás hiánya alapján nem tudtuk kijelenteni a sejtről, hogy az valóban nem tartalmaz NECAB fehérjét.



12. ábra A NECAB1 és NECAB2 immunfluoreszcens jel szelektíven kolokalizál a Necab1, illetve a Necab2 RNAscope in situ hibridizációs csatornákkal (ábra: Miczán és mtsai.)

a) RNAscope fluoreszcens in situ hibridizáció (ISH) a Necab1 mRNS (cián) ellen, és anti-NECAB1 immunfestés (IF, sárga) egér hippocampusz CA1 régiójában. A sejtmagokat DAPI-val (fehér) jelöltük minden képen.

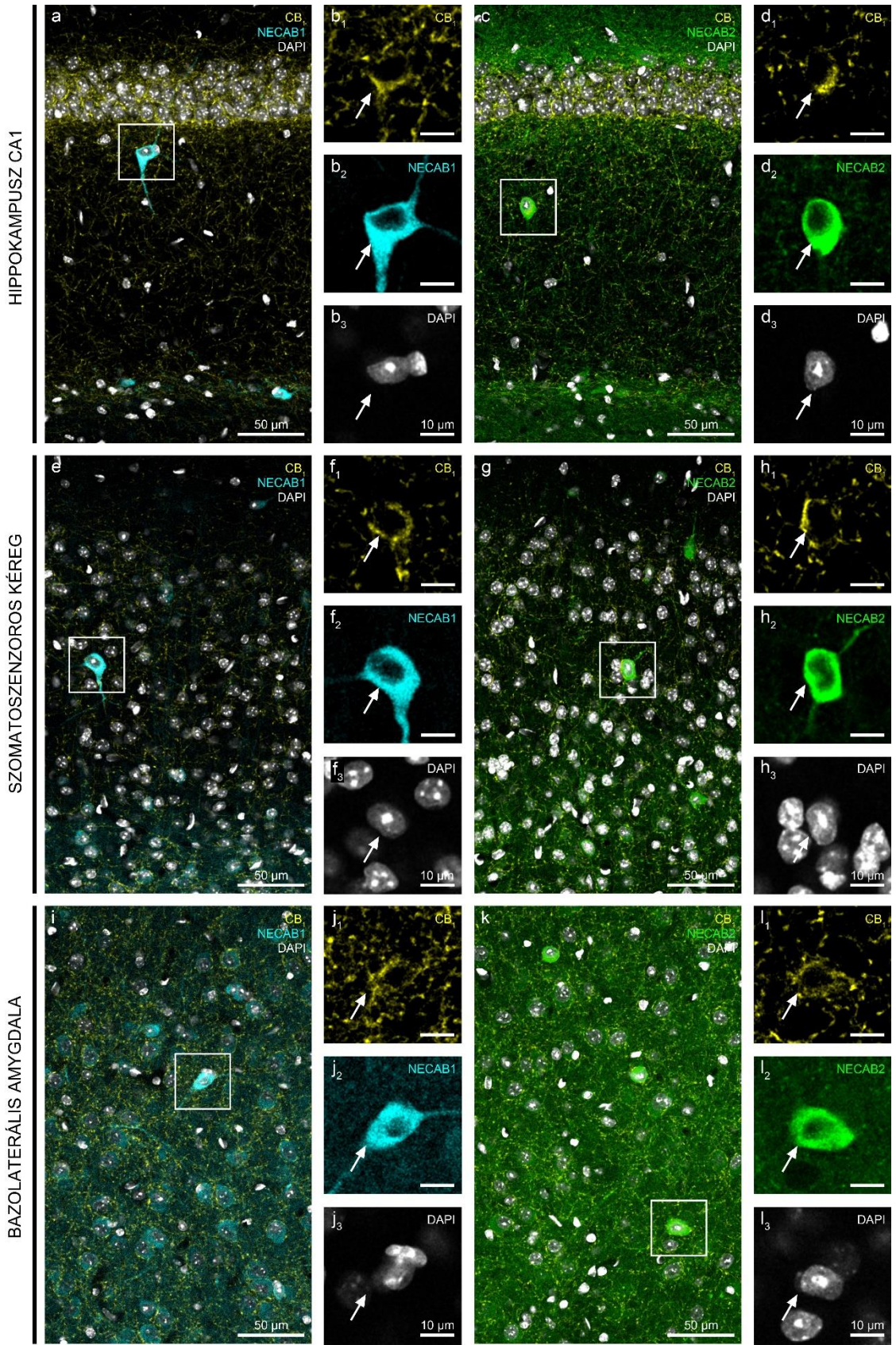
b) Necab1 mRNS-t tartalmazó sejt az a) ábrán fehér négyzettel kiemelt területről. 61-ből 61 NECAB1 IF+ sejt tartalmazott Necab1 mRNS-t (N=3 állat).

c) RNAscope fluoreszcens in situ hibridizáció a Necab2 mRNS (zöld) ellen, és anti-NECAB2 immunfestés (piros) egér hippocampusz CA1 régiójában.

d) Necab2 mRNS-t tartalmazó sejt a c) ábrán fehér négyzettel kiemelt területről. 82-ből 82 NECAB2 IF+ sejt tartalmazott Necab2 mRNS-t (N=3 állat).

Az így validált antitestekkel végzett kétcsatornás CB₁/NECAB1, illetve CB₁/NECAB2 immunfestések alapján azt találtuk, hogy minden CB₁+ sejtest NECAB1+-nak bizonyult (n=221 sejt a HC-CA1, n=237 sejt a HC-CA2/CA3, n=154 sejt a HC-DG, n=153 sejt a SS-CTX és n=151 sejt a BLA régiókból N=3 állatból), és ugyanilyen arányban voltak a CB₁+ sejtek NECAB2 pozitívak is populációs szinten (n=97 sejt a HC-CA1, n=50 a HC-CA2/CA3, n=96 sejt a HC-DG, n=132 sejt a SS-CTX és n=114 sejt a BLA régiókból N=3 állatból) (13.ábra).

A NECAB1 immunfestésre multipoláris sejtek erős szomatodendritikus jelölődése volt jellemző minden vizsgált agyterületen, ezen kívül ez kiegészült feltételezhetően principális sejt jelöléssel a szomatoszenzoros kéregben és a bazolaterális amygdalában. A NECAB2 esetében a szomatodendritikus festődés kiegészült sűrű axonterminális mintázattal és principális sejt festődéssel minden agyterületen.



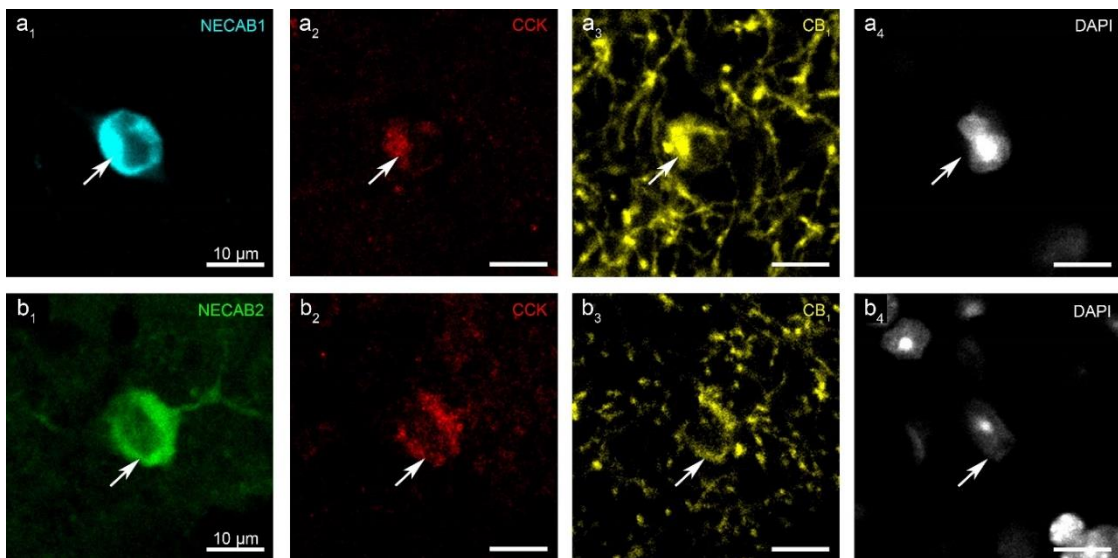
m

NECAB+ sejtek/ CB ₁ + sejtek	NECAB1					NECAB2				
	HC-CA1	HC-CA3	HC-DG	SS-CTX	BLA	HC-CA1	HC-CA3	HC-DG	SS-CTX	BLA
	221/221	237/237	154/154	153/153	151/151	97/97	50/50	96/96	132/132	114/114

13. ábra Populációs szinten minden CB_1 + interneuron tartalmaz *NECAB1*, illetve *NECAB2* fehérjét (ábra: Miczán és mtsai., módosítva)

Reprezentatív képek anti-*NECAB1* immunfestésről egér a) HC-CA1, e) SS-CTX, i) BLA agyterületeiről. Reprezentatív képek anti-*NECAB2* immunfestésről egér c) HC-CA1, g) SS-CTX, k) BLA agyterületeiről. b, f, j) CB_1 + *NECAB1*+ sejtek az a, e, illetve i) ábrákról a fehér négyzetes területekről. d, h, l) CB_1 + *NECAB2*+ sejtek a c, g, illetve a k) ábrákról a fehér négyzetes területekről. m) A populációs immunfestés kísérlet számszerűsítése. A CB_1 + sejtek 100%-a bizonyult *NECAB1* vagy *NECAB2* pozitívnek ($N=3$ állat).

A CB_1 receptort és a kolecisztokinin (CCK) nevű neuropeptidet tartalmazó interneuronok a hippokampusz nagy mértékben átfedő populációját alkotják [116]–[118]. Mi is megmutattuk kísérletes eszközökkel, hogy a CCK és a CB_1 immunjel nagy mértékben kolokalizál mind a *NECAB1*, mind a *NECAB2* fehérjével a hippokampusz CA1 régiójában (14. ábra), ezért állíthatjuk, hogy a *NECAB1* és a *NECAB2* a CCK/ CB_1 -es interneuron populáció markerei, amely megkönnyíti az eredmények elhelyezését az interneuronkutató területén.



14. ábra A *NECAB1* és a *NECAB2* fehérjék a hippokampusz CCK +/ CB_1 + interneuronjainak a markerei (ábra: Miczán és mtsai.)

a) Reprezentatív konfokális kép egy sejtről, mely CB_1 , CCK, *NECAB1* tripla pozitívást mutat ($n=32/32$ CCK+ sejt volt *NECAB1*+).
b) Reprezentatív konfokális kép egy sejtről, mely CB_1 , CCK, *NECAB2* tripla pozitívást mutat ($n=30/34$ CCK+ sejt volt *NECAB2*+).

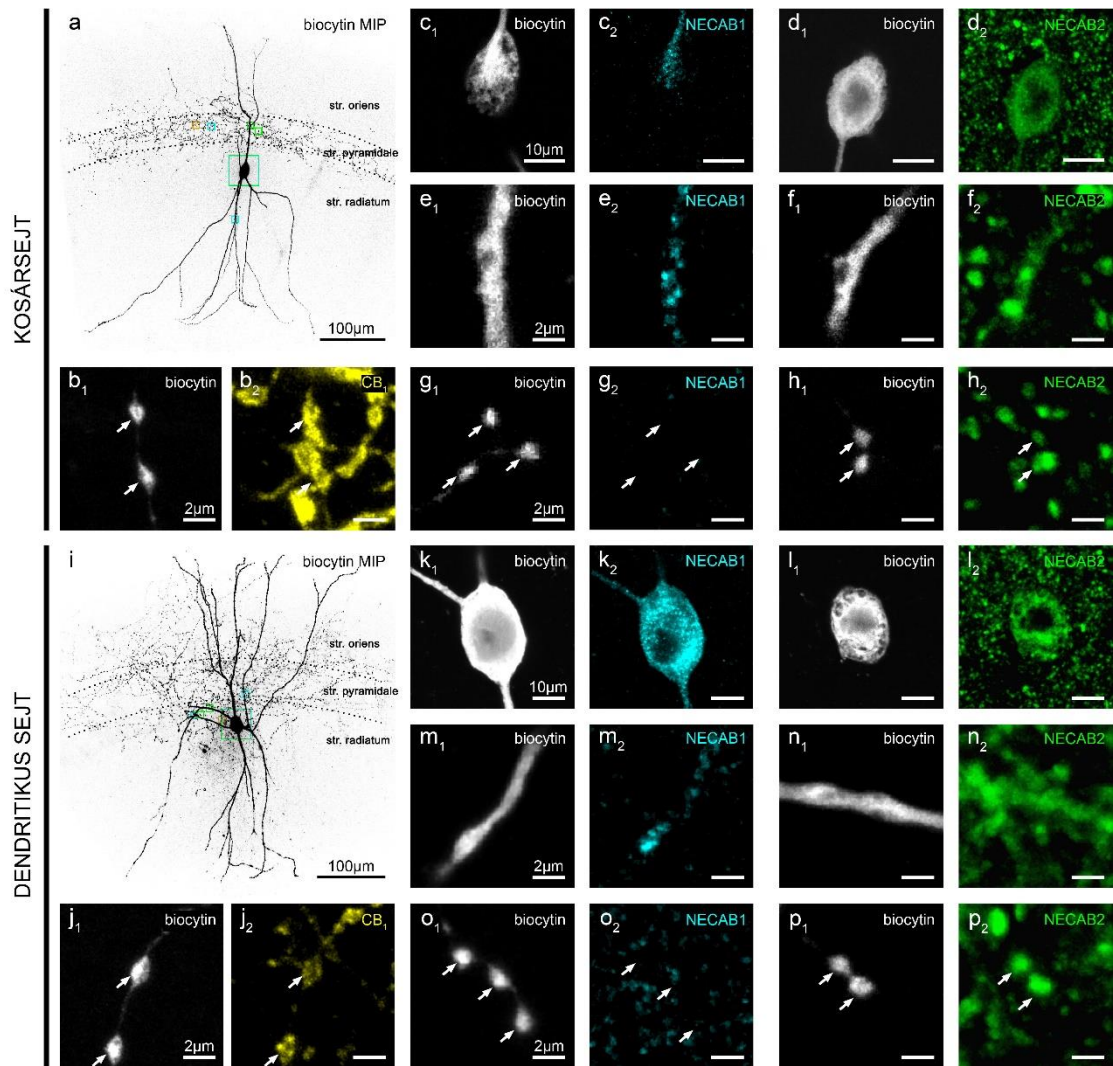
3.4 A *NECAB1* és *NECAB2* fehérjék sejten belüli eloszlása

Az eddigi kísérletek eredményei alapján az az újabb kérdés merült fel, hogy vajon miért van szüksége egy adott sejt típusba tartozó sejtnél két, egymáshoz filogenetikailag ennyire közel álló kalciumkötő fehérjére. Így a populációs immunfestések tanulságaiból kiindulva a következőkben azt a hipotézist teszteltük, miszerint a két *NECAB* fehérje egy adott sejtben különböző sejten belüli kompartmentben található meg, ami funkcionális különbségek meglétét vetné fel. Egyedi sejt szinten szeretnénk volna ezúttal kivitelezni a kísérleteinket, így a hippokampusz CA1 régiójában sejteket töltöttünk biocytinnel elektrofiziológiai elvezetés

közben. A nagy multipoláris sejttetek a radiatum régióban helyezkedtek el, tüzelésük akkomodáló mintázatot mutatott, ami CB_1+ fenotípusra utal, ezt a későbbiekben immunfestéssel meg is erősítettük. A biocytinnel töltött sejteket fluoreszcens molekulához kapcsolt sztreptavidinnel előhívtuk, konfokális mikroszkóppal z-tömböket készítettünk róluk, majd ezek alapján rekonstruáltuk őket. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a CA1 radiatum régiójában elhelyezkedő CB_1 -es interneuronoknak két morfológiai válfaja van: a kosársejtek (más néven periszomatikus sejtek) és a dendritikus sejtek [21], [22], [119], ezeket főként az axonfelhőjük elhelyezkedése alapján tudjuk elkülöníteni: a kosársejtek a piramissejtek sejttestére adnak főként bemeneteket, ezáltal legtöbb axonterminálisuk a piramisrétegben helyezkedik el. Ezzel szemben a dendritikus sejtek boutonjai inkább elkerülik ezt a réteget, és a radiatumban, valamint az oriensben található piramissejt dendriteket célozzák meg. Kísérleteinken mindkét morfológiai típust vizsgáltuk (15. ábra/a, i).

Először validáltuk a sejtek CB_1 -es fenotípusát axonterminálisaik anti- CB_1 immunfestésével (15. ábra/b, j), majd más szeleteken NECAB1 (15. ábra/c, e, g, k, m, o), illetve NECAB2 (15. ábra/d, f, h, l, n, p) immunfestést hajtottunk végre. Mivel a NECAB1 és a NECAB2 antitestek ugyanazon fajból származnak, ezért nem használhattuk őket együtt, így ahhoz, hogy egy adott sejt sejttestét mindkét antitesttel megfessük, arra volt szükség, hogy különösen vékony szeleteket metsszünk le a sejtől ($10\ \mu\text{m}$), és a sejttest egyik felét az egyik reakcióban, a másikat a másikban használjuk fel.

A NECAB1 immunfestés eredményeként azt találtuk, hogy az antitest erősen jelöli a sejttestet és a dendriteket, ám a konfokális mikroszkópiával kimutatható határ alatt van az axonterminálisokban mind a kosár-, mind a dendritikus sejtekben ($n=6$ és $n=6$ sejt). Ezzel szemben a NECAB2 koncentráltan volt kimutatható az axonterminálisokban és a szomatodendritikus kompartmentben is. A sejtípusok között ebben az esetben sem volt kvalitatív különbség ($n=6$ és $n=6$ sejt).



15. ábra A NECAB1 és a NECAB2 fehérjék szubcelluláris eloszlása CB_1+ kosár- és dendritikus sejtekben (ábra: Miczán és mtsai., módosítva)

a, i) Egyedi, biocytinnel töltött sejtek morfológiai rekonstrukciója (a - kosársejt, b --dendritikus sejt).

b, j) Az a), illetve az i) ábrán mutatott sejtek axonterminálisai CB_1 -pozitivitást mutatnak (sárga).

c, d) Az a) ábrán mutatott biocytinnel töltött kosársejt sejtteste félbevágva NECAB1 (cián) és NECAB2 (zöld) pozitív.

e, f) Az a) ábrán mutatott biocytinnel töltött kosársejt dendritjei NECAB1 és NECAB2 pozitívak.

g, h) Az a) ábrán mutatott biocytinnel töltött kosársejt axonterminálisai NECAB2 pozitívak, de a NECAB1 a konfokális mikroszkópiával elérhető detekciós határ alatt van.

k, l) Az i) ábrán mutatott biocytinnel töltött dendritikus sejt sejtteste félbevágva NECAB1 és NECAB2 pozitív.

m, n) Az i) ábrán mutatott biocytinnel töltött dendritikus sejt dendritjei NECAB1 és NECAB2 pozitívak.

o, p) Az i) ábrán mutatott biocytinnel töltött dendritikus axonterminálisai NECAB2 pozitívak, de a NECAB1 a konfokális mikroszkópiával elérhető detekciós határ alatt van.

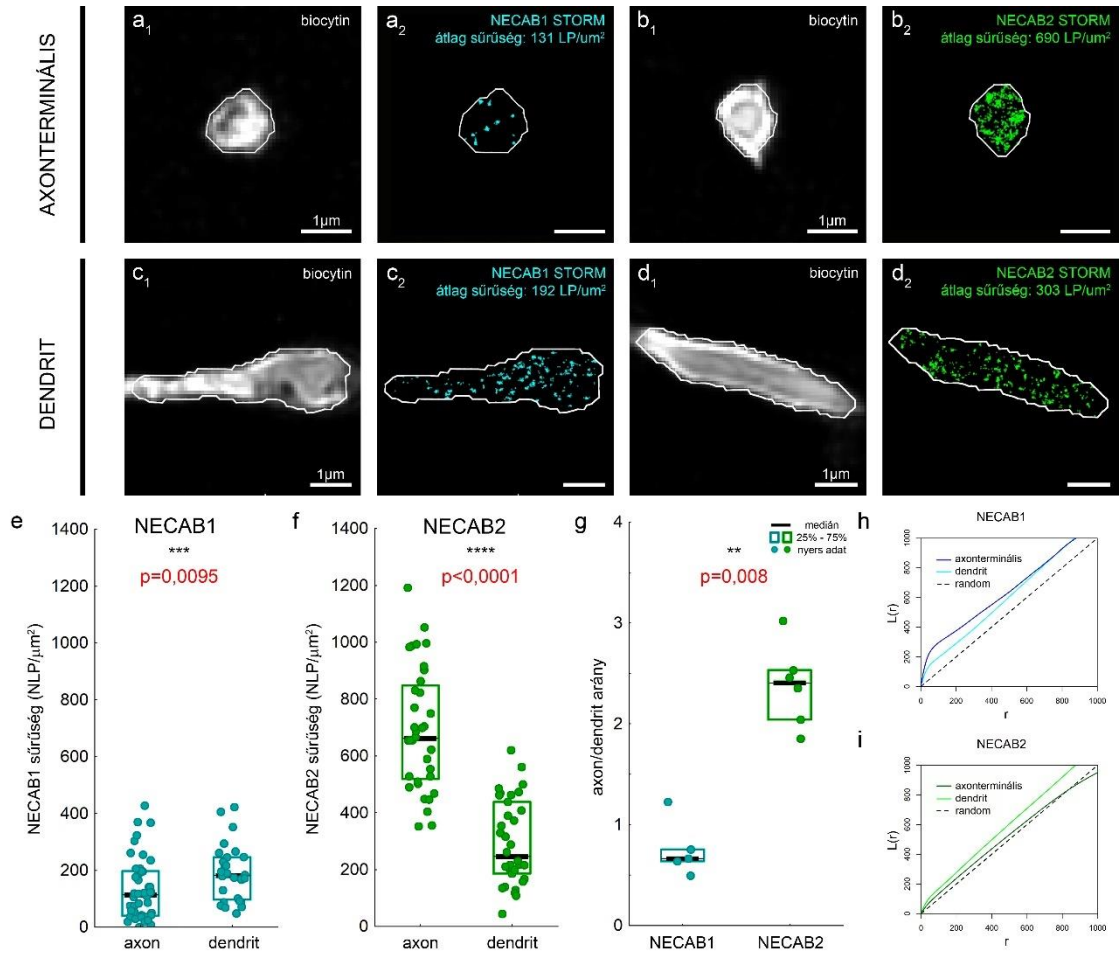
Reprezentatív sejtek, a kísérleteket $n=6$, illetve $n=6$ kosár- illetve dendritikus sejtben ismételtük meg.

A két NECAB fehérje szubcelluláris elhelyezkedésében megtalált különbség arra utalhat, hogy van valamiféle funkcionális munkamegosztás a két protein között. Így következő lépésként kvantifikálni szeretnénk volna ezt a sűrűségkülönbséget a szomatodendritikus és az axonális kompartmentek között, hogy jobban megérthessük a fehérjék eloszlását. Ehhez a STORM szuperrezolúciós mikroszkópiát választottuk eszközül, hiszen érzékenyebb a hagyományos konfokális mikroszkópoknál, és nagyobb, molekuláris felbontás érhető el vele. Ismét biocytinnel töltött egyedi sejteket vizsgáltunk, és mivel az előző kísérletben nem

találtunk a sejtípusok között különbséget, ezért csak a kosársejteken folytattuk vizsgálatainkat.

A STORM nagyobb érzékenységének köszönhetően képesek voltunk kimutatni a kis mennyiségű NECAB1-et is az axonterminálisokban (16. ábra/a, e), habár szignifikánsan több fehérje található a szomatodendritikus kompartmentben (16. ábra/c, e, N= 6 és 5 állat, 43 és 28 ROI, Mann–Whitney U-teszt, $p=0,0095$). Ezzel szemben a NECAB2 fehérje inkább az axonterminálisokban volt nagyobb sűrűségben megtalálható (16. ábra/b, f), mint a dendritekben (16. ábra/d, f, N=6 és 6 állat, 36 és 34 ROI, Mann–Whitney U-teszt, $p<0,0001$). Az axonterminális/dendrit sűrűségarány kvantifikációja során feltűnő különbség mutatkozott a NECAB1 és a NECAB2 festés között (16. ábra/g, N=5 és 6 állat, Mann–Whitney U-teszt, $p=0,008$), mely megerősítette korábbi, konfokális mikroszkópiás megfigyeléseinket.

Vizsgáltuk a STORM lokalizációs pontok klasztereződését is a különböző kompartmentekben a Ripley L-függvény segítségével (ami leegyszerűsítve azt mutatja meg, hogy az eloszlás mely mérettartományban tér el a randomtól, tehát hol klaszterezett), és azt találtuk, hogy a NECAB1 esetében az axonterminálisokban található LP-k klaszterezettebbek, mint a dendritekben lévők, viszont ennek az ellenkezője igaz a NECAB2 festésre: a dendritekben megtalálható LP-k rendeződnek inkább csoportokba. Ezek a molekuláris sűrűség- és klaszterezettségi adatok a kétféle NECAB fehérje funkcionális különbözőségét sejtetik, mely további vizsgálatok tárgya lehet.



16. ábra A NECAB1 és a NECAB2 fehérjék szubcelluláris sűrűségkülönbsége CB₁+ hipokampális kosársejtekben (ábra: Miczán és mtsai., módosítva)

a₁, b₁, c₁, d₁) Biocytinnel töltött (fehér), morfológiailag karakterizált kosársejt (a₁, b₁ – axonterminális kompartment, c₁, d₁ – dendritikus kompartment). Aktív kontúr algoritmus [39] segítségével kijelölt ROI-k (fehér vonal).

a₂, c₂) Különböző sűrűségű NECAB1 STORM jel axon terminálisban és dendritben. A STORM koordinátákat szűrtük a ROI alapján.

b₂, d₂) Különböző sűrűségű NECAB2 STORM jel axon terminálisban és dendritben. A STORM koordinátákat szűrtük a ROI alapján.

e) A NECAB1 lokalizációs pontok sűrűsége magasabb a dendritekben az axon terminálisokhoz képest (N=6 és 5 állat, 43 és 28 ROI, Mann–Whitney U-teszt, p=0,0095).

f) A NECAB2 lokalizációs pontok sűrűsége magasabb az axonterminálisokban, mint a dendritekben (N=6 és 6 állat, 36 és 34 ROI, Mann–Whitney U-teszt, p<0,0001).

g) Az axonális és dendritikus STORM lokalizációs pontok aránya eltér a NECAB1 és a NECAB2 esetében. A NECAB1 a dendritikus kompartmentben, míg a NECAB2 az axonterminálisokban van jelen nagyobb sűrűségben (N=5 és 6 állat, Mann–Whitney U-teszt, p=0,008).

h) A Ripley L-függvény vizualizációja NECAB1+ dendritekre (cián) és axon terminálisokra (kék), mely azt mutatja, hogy a NECAB1 festés klaszterezettebb az axonterminálisokban, mint a dendritekben (N=6 és 5 állat, n=51 és 40 ROI). A fekete szaggatott vonalak a Poisson-eloszlást mutatják (random).

i) A Ripley L-függvény vizualizációja NECAB2+ dendritekre (világos zöld) és axon terminálisokra (sötét zöld), mely azt mutatja, hogy a NECAB2 festés klaszterezettebb a dendritekben, mint az axonterminálisokban (N=6 és 6 állat, n=31 és 37 ROI). A fekete szaggatott vonalak a Poisson-eloszlást mutatják (random).

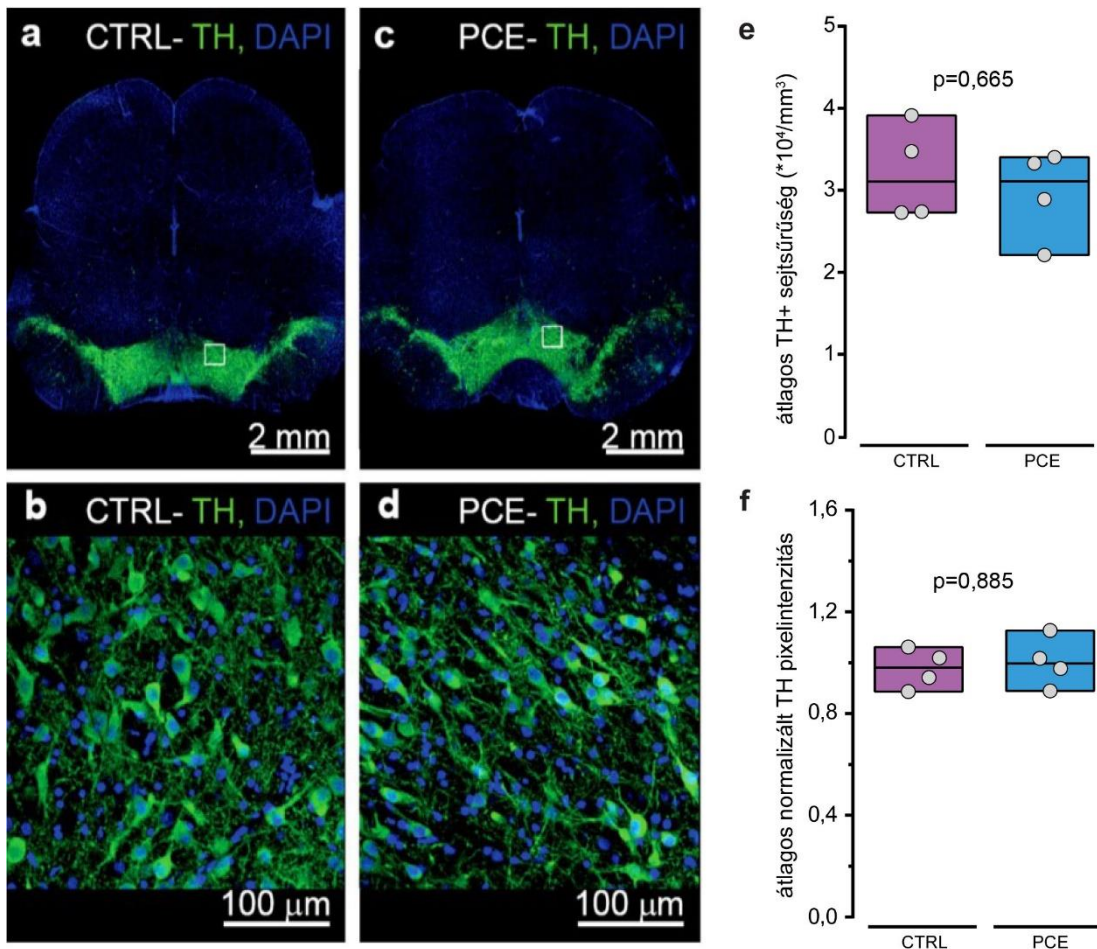
4 Eredmények II: A prenatális THC kezelés hatásának vizsgálata

A csoportunk felnőtt rágcslókon végzett korábbi kutatásai alapján szeretnénk volna továbblépni, és azt vizsgálni, hogyan hat az utódokra az anyai szervezetbe adagolt THC, azon belül is milyen molekuláris, szinaptikus változásokat eredményez ez a beavatkozás a középagyú jutalmazó rendszerben.

Ehhez a következő állatkísérletes modellt alkalmaztuk: először vemhes patkány anyáknak napi egyszer 2 mg/kg THC-t adagoltunk szubkután a megtermékenyülést követő 5. és 20. nap között. Ez alacsony dózissnak számít, hiszen az így kezelt állatok nem mutatják a klasszikus kannabinoid tetrad teszt eleimet (a testhőmérséklet csökkenése, a fájdalomérzet tompulása, a spontán helyváltoztató mozgás visszaesése és a katalipszia, mely az izomtónus egyfajta elvesztésével jár), és nem alakítanak ki toleranciát sem ismételt adagolás esetén [120]. Ezen viszonylag kis mértékű inzultustól nem várható, hogy direkt módon befolyásolja a patkányok anyai viselkedését. Ha párhuzamot akarunk teremteni az emberi szerhasználattal, ez az adagolt mennyiség egy gyengébb élvezeti szerként fogyasztott THC-tartalmú („füves”) cigarettának felel meg (~5% THC tartalommal) a mai viszonylatok közt, hiszen az elmúlt két évtizedben az illegális kannabisz termékek THC tartalma ~4%-ról 12%-ra nőtt [121]. A kezelést a továbbiakban PCE-ként rövidítjük (prenatal cannabis exposure, azaz prenatális kannabisz kezelés).

4.1 A VTA-beli dopaminerg sejtek számának vizsgálata

Mivel a THC legfőbb molekuláris célpontjai az 1-es és 2-es típusú kannabinoid receptor (CB_1 és CB_2), és ezek a fehérjék a fejlődő agyban hatással vannak a progenitor sejtek osztódására [72], ezért első lépésben azt vizsgáltuk meg, hogy a prenatális kannabisz kezelés vajon megváltoztatja-e a dopaminerg sejtek számát a ventrális tegmentális területen, a jutalmazási rendszer egyik központjában. Ennek felderítésére az egyik dopamin szintézishez nélkülözhetetlen enzim, a tirozin-hidroxiláz (TH) elleni fluoreszcens immunfestést alkalmaztuk. Ez a fehérje a VTA-ban a dopaminerg sejtek megbízható jelölője. Majd konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk a területet, melynek során nem tapasztaltunk különbséget a PCE-kezelésen átesett és a kontroll (CTRL) állatokban a TH+ dopaminerg sejtek számában (17. ábra/a-e). Ezen felül a TH-festés intenzitásában sem találtunk különbséget (17. ábra/f), ami arra utal, hogy a kezelés nem változtatja meg a dopaminszintézist katalizáló enzim szintjét.



17. ábra A prenatális kannabisz kezelés nem változtatja meg a dopaminerg sejtek számát a VTA-ban (Frau, Miczán és mtsai.[122], módosítva)

a) Anti-TH immunfestés (zöld) konfokális képe kontroll kezelésen átesett patkány agy metszeten. A sejtmagok DAPI festéssel vannak jelölve (kék).

b) Az a) panelen lévő fehér négyzettel jelölt terület kinagyítva.

c) Anti-TH immunfestés konfokális képe PCE kezelésen átesett patkány agy metszeten.

d) A c) panelen lévő fehér négyzettel jelölt régió kinagyítva.

n=12 képet készítettünk állatonként, a paneleken reprezentatív képek láthatóak.

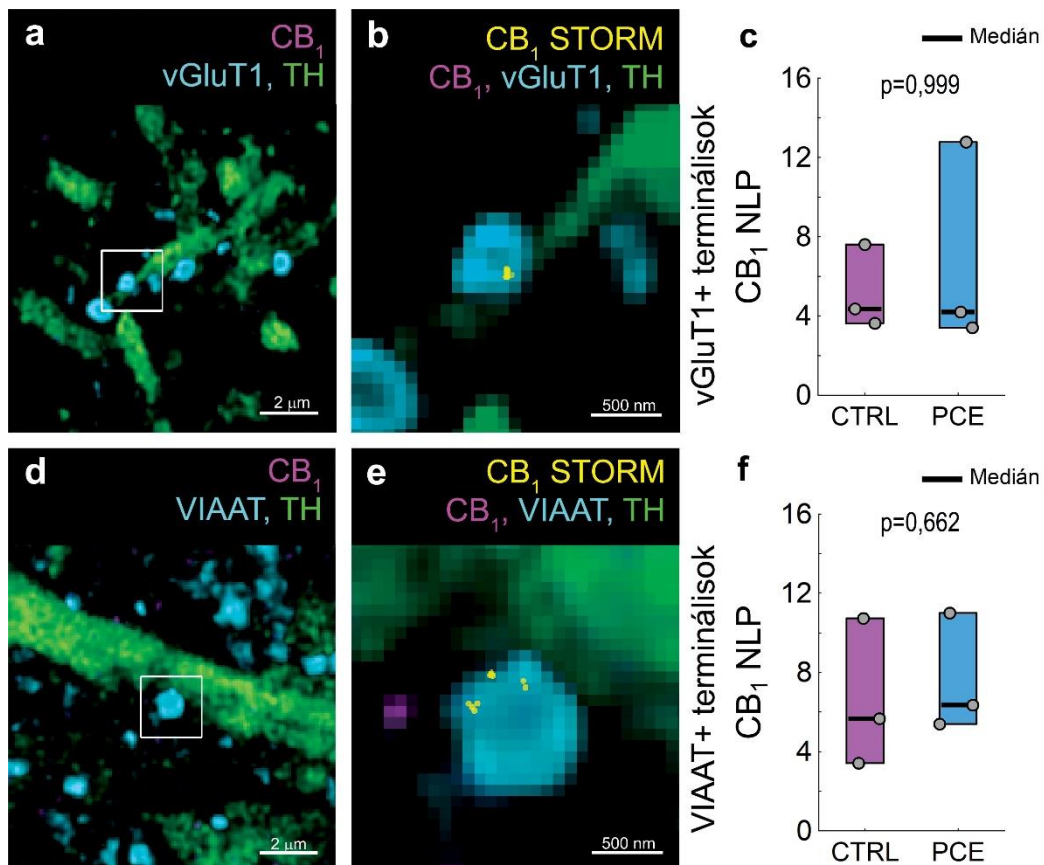
e) Az átlagos TH+ sejtűrűség a VTA kijelölt területén nem tér el a kezelési csoportok között (N=4 és 4 állat, p=0,665, Mann-Whitney U-teszt).

f) Az átlagos TH pixelintenzitás a VTA kijelölt területén nem tér el a kezelési csoportok között (N=4 és 4 állat, p=0,885, Mann-Whitney U-teszt)

4.2 CB₁ receptor szintek mérése a VTA dopaminerg sejtek bemenetein

A CB₁ receptor az egyik legnagyobb mértékben kifejeződő metabotróp receptor az agyban, és a feszültségfüggő kalciumcsatornák gátlásán keresztül hatékonyan gátolja az ingerület-átvivő anyagok felszabadulást az idegrendszerben, méghozzá a retrográd endokannabinoid jelátviteli rendszer kulcsszereplőjeként [123]. Anatómiai és elektrofiziológiai kísérletek bizonyítják, hogy a CB₁ receptor aktiváció csökkenti a GABA gátló neurotranszmitter felszabadulást, ezáltal befolyásolja a dopaminerg sejtek aktivitását a ventrális tegmentális területen [102], [124]. Kézenfekvő tehát tesztelni, hogy változik-e a prenatális kannabisz kezelés hatására a VTA dopaminerg sejteire érkező bemenetek CB₁ szintje.

Ehhez korrelált konfokális és STORM szuper-rezolúciós mikroszkópiát alkalmaztunk. A dopaminerg sejteket anti-tirozin-hidroxiláz fluoreszcens immunfestéssel jelöltük, és a sejttestjeikre, valamint dendritjeikre érkező serkentő bemeneteket anti-vezikuláris glutamát transzporter 1 (vGluT1), míg a gátló bemeneteket anti-vezikuláris gátló aminosav transzporter immunfestéssel (VIAAT) tettük láthatóvá. A STORM rendszer nagy érzékenysége ellenére is csupán kis számban volt megfigyelhető a CB₁ fehérje a dopaminerg sejtek ezen bemenetein (18. ábra/a-b, d-e), és a PCE kezelés következtében nem figyeltünk meg változást sem a serkentő (18. ábra/c), sem pedig a gátló (18. ábra/f) axonterminálisok területén.



18. ábra Nincs különbség a CB₁ fehérje mennyiségében PCE-kezelés után a VTA dopaminerg sejtjeinek serkentő és gátló bemenetein

a, b, d, e) Patkány VTA területén TH+ (zöld) szomatodendritikus nyúlványokra érkező a, b) vGluT1+, illetve d, e) VIAAT+ bemeneteken (cián) található CB₁ fehérje elleni immunfestés konfokális (magenta) és STORM (sárga) képe. Nincs szignifikáns különbség a normalizált CB₁ lokalizációs pontok számában

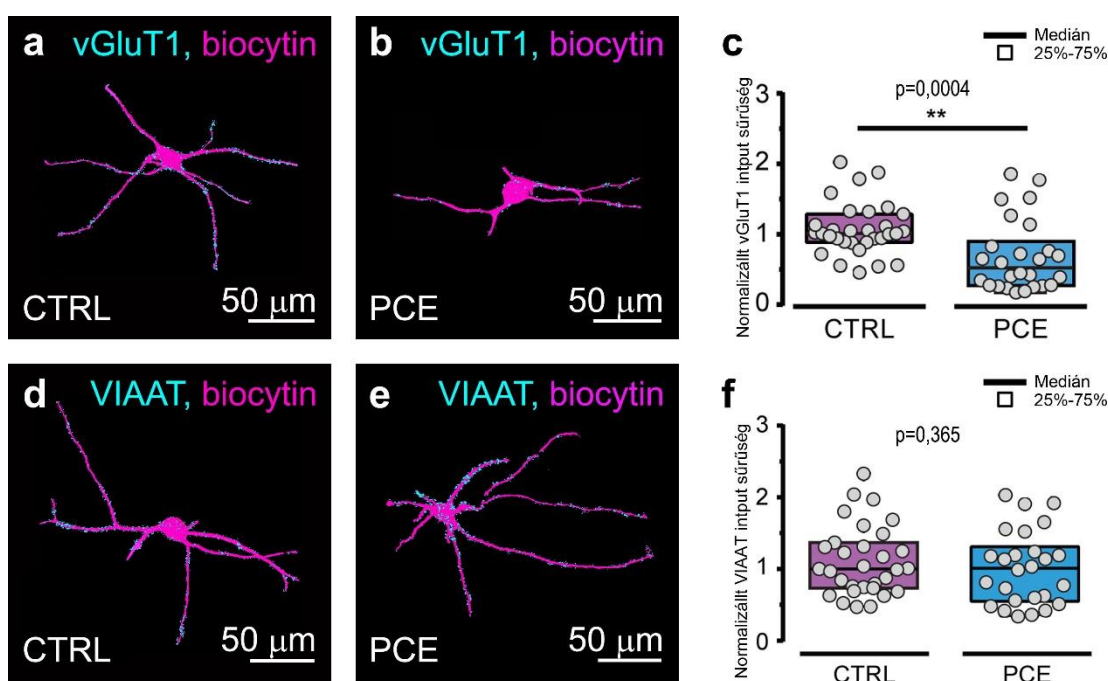
c) sem a serkentő ($p=0,999$, Mann-Whitney U-teszt, $N=3$ állat csoportonként, $n=20$ kép állatonként),

d) sem a gátló ($p=0,662$, Mann-Whitney U-teszt, $N=3$ állat csoportonként, $n=20$ kép állatonként) bemeneteken.

4.3 A dopaminerg sejtek bemeneteinek változása

Miután megmutattuk, hogy PCE-kezelés hatására nem változik sem a VTA dopaminerg sejtjeinek a száma, sem pedig a rájuk érkező bemeneteken a CB₁ receptorok mennyisége, a következő kérdésünk az volt, vajon változik-e a dopaminerg sejtekre érkező serkentő vagy gátló bemenetek száma, esetleg más szinaptikus tulajdonságaik.

Ehhez a VTA-ban biocytinnel töltött dopaminerg sejteket tartalmazó agyszeleteken végeztünk fluoreszcens immunfestést a vezikuláris glutamát transzporter 1-es típusa (vGluT1), mint serkentő és a vezikuláris gátló aminosav transzporter (VIAAT), mint a gátló axonterminálisok markere ellen. A konfokális mikroszkópiával felvett z-tömbökben küszöböléssel rekonstruáltuk a biocytinnel töltött sejteket és az azokra érkező serkentő, valamint gátló bemeneteket (19. ábra/a, b, d, e). Ez azt jelenti, hogy egy bizonyos pixelintenzitás érték felett tekintettük az összefüggő voxeleket a vizsgált objektumok részének. A kvantifikáció során azt találtuk, hogy szignifikánsan csökkent a dopaminerg sejtekre érkező serkentő bemenetek száma a PCE-kezelt utódokban (19. ábra/c), míg a gátló bemenetek száma nem változott (19. ábra/f). A serkentő bemenetek ilyen mértékű csökkenése arra utal, hogy a PCE-kezelés megzavarja a VTA dopaminerg jelátvitel szinaptikus kapcsolatrendszerének fejlődését.



19. ábra A PCE-kezelés hatására csökken a dopaminerg sejtekre érkező serkentő bemenetek száma, míg a gátló inputok sűrűsége nem változik (Frau, Miczán és mtsai. [122], módosítva)
Biocytinnel töltött VTA-beli dopaminerg sejtek 3D rekonstrukciója (magenta) a, d) kontroll, b, e) PCE-kezelt állatokból, a, b) vGluT1+ d, e) VIAAT+ szinaptikus bemenetek (cián) feltüntetésével.
c) A vGluT1+ bemenetek sűrűségének számszerűsítése a biocytin objektumok felszínére normalizálva ($p=0,0004$, Mann-Whitney U-teszt $n=31$ és 26 kép alapján).
f) A VIAAT+ bemenetek sűrűségének számszerűsítése, a biocytin objektumok felszínére normalizálva ($p=0,365$, Mann-Whitney U-teszt $n=31$ és 26 kép alapján).

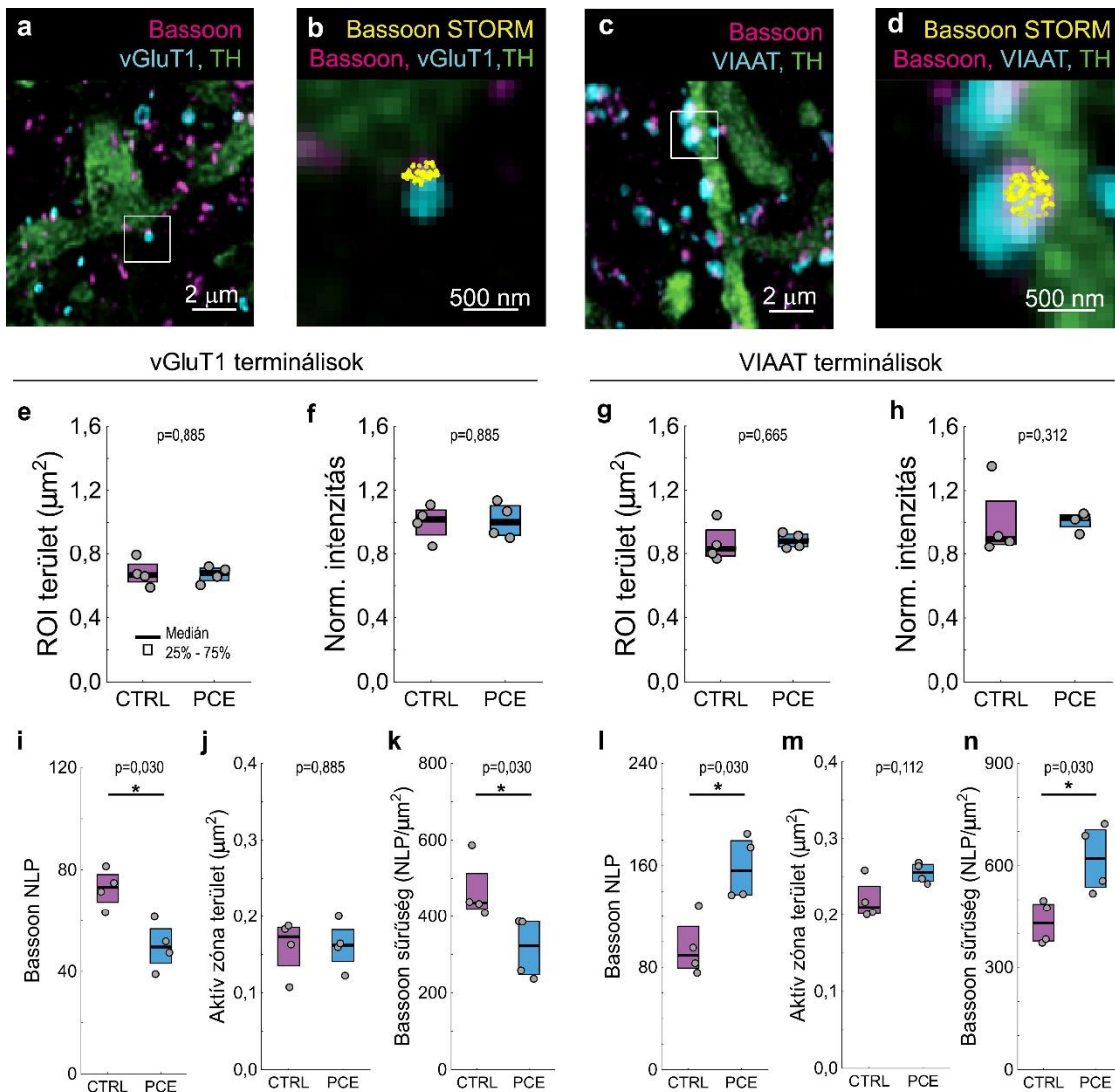
Nemrégiben megmutatták korrelált elektrofiziológiai és szuperrezolúciós mikroszkópiai vizsgálatok segítségével, hogy a bassoon nevű preszinaptikus állványfehérje csoportosulása a preszinaptikus aktív zónában negatívan korrelál a neurotranszmitterek felszabadulási valószínűségével (release probability) [125]: a nagyobb bassoon sűrűség megakadályozza a

feszültségfüggő kalciumcsatornák toborzását az aktív zónába, amelyek nélkülözhetetlenek az akciós potenciál függő vezikula ürüléshez [125].

Szerettük volna tesztelni, hogy létezik-e ilyen típusú különbség a PCE-kezelésen átesett, illetve a kontroll állatok VTA-beli dopaminerg idegsejtjeire érkező szinapszisok között, így korrelált konfokális és szuperrezolúciós mikroszkópiát alkalmaztunk ennek felderítésére. A kétféle csoportban az anti-TH immunfestéssel jelölt dopaminerg sejtek szomatodendritikus kompartmentjére érkező immunfestéssel jelölt serkentő (vGluT1 pozitív) és gátló (VIAAT pozitív) axonterminálisok területén vizsgáltuk a bassoon állványfehérje mennyiségét és sűrűségét (20. ábra/a-d). Nem volt különbség a PCE és CTRL állatokban sem a serkentő, sem a gátló bemenetek esetében az axonterminálisok területében (20. ábra/e, g), sem pedig a vezikuláris transzportfehérjék összes konfokális pixelintenzitás alapján mért értékeiben (20. ábra/f, h). Ez azt jelenti, hogy az esetleges számbeli változásokat nem az okozza, hogy nehezebb detektálni ezeket a bemeneteket.

Ezzel szemben a bassoon fehérje STORM lokalizációs pontjainak száma csökkent a PCE-kezelés hatására a serkentő terminálisokban (20. ábra/i), míg ezzel ellentétesen változott a gátló axonterminálisokban (20. ábra/l). Mivel a bassoon konfokális képe alapján mért aktív zóna területe nem módosult egyik típusú idegvégződésben sem (20. ábra/j, m), ezért azt tudjuk megállapítani, hogy a bassoon fehérje ritkásabban helyezkedik el a PCE-kezelt serkentő terminálisokban (20. ábra/k), míg sűrűbben a gátló végződéseken (20. ábra/n). Ez arra enged következtetni, hogy a kezelés hatására szinaptikus változások lépnek fel, és az ismert összefüggés alapján a serkentő bemenetekben magasabb, míg a gátlókban alacsonyabb vezikula-felszabadulási valószínűségekre számíthatunk a PCE-kezelt utódokban a kontrollhoz képest.

Mindent összevetve azt láthatjuk az anatómiai adatok alapján, hogy a prenatalis kannabisz kezelés specifikus és ellentétes változásokat indít el a VTA dopaminerg neuronjainak szinaptikus nanoarchitektúrájában, és az állványfehérje molekulák sűrűségváltozása miatt megváltozott vezikula-felszabadulásra számíthatunk.



20. ábra A serkentő és gátló szinapszisokban ellentétesen változik a bassoon állványfehérje sűrűsége a PCE kezelés hatására (Frau, Miczán és mtsai. [122], módosítva)

a, b, c, d) Patkány VTA területén TH+ (zöld) szomatodendritikus nyúlványokra érkező a, b) vGluT1+, illetve c, d) VIAAT+ bemenetek (cián) területén található bassoon szinaptikus állványfehérje elleni immunfestés konfokális (magenta) és STORM (sárga) képe.

e) A serkentő axon terminálisok mérete nem változott ($p=0,885$ Mann-Whitney U-teszt, $N=4$ és 4 állat, állatonként $n=20$ kép).

f) A serkentő axon terminálisokban a transzporter fehérjék összedott pixelintenzitása állandó maradt ($p=0,885$ Mann-Whitney U-teszt, $N=4$ állat, állatonként $n=20$ kép).

g) A gátló axon terminálisok mérete is állandó maradt ($p=0,665$ Mann-Whitney U-teszt, $N=4$ állat, állatonként $n=20$ kép).

h) A gátló idegvégződésekben nem változott a transzporter összintenzitása ($p=0,312$ Mann-Whitney U-teszt, $N=4$ állat, állatonként $n=20$ kép).

i) A serkentő terminálisok területén található bassoon állványfehérje mennyisége csökkent a PCE-kezelés hatására ($p=0,030$ Mann-Whitney U-teszt, $N=4$ állat, állatonként $n=20$ kép).

j) A szinaptikus aktív zóna mérete változatlan maradt a serkentő terminálisokban ($p=0,885$ Mann-Whitney U-teszt, $N=4$ állat, állatonként $n=20$ kép).

k) Az aktív zóna területére normalizált bassoon fehérje sűrűségében növekedést tapasztalhatunk a serkentő terminálisok esetében ($p=0,030$ Mann-Whitney U-teszt, $N=4$ állat, állatonként $n=20$ kép).

l) A gátló terminálisokban nőtt az állványfehérje mennyisége ($p=0,03$ Mann-Whitney U-teszt, $N=4$ állat, állatonként $n=20$ kép).

m) A gátló aktív zóna mérete nem változott ($p=0,112$ Mann-Whitney U-teszt, $N=4$ állat, állatonként $n=20$ kép).

n) A gátló terminálisokban csökkent az aktív zóna területére normalizált bassoon fehérje sűrűsége ($p=0,030$ Mann-Whitney U-teszt, $N=4$ állat, állatonként $n=20$ kép).

A gátló szinapszisok száma változatlan maradt, viszont sűrűbb állványféhérje mintázatot tapasztaltunk, ami az irodalmi adatok alapján csökkent vezikula-felszabadulással járhat együtt [125], így azt a jóslatot tehetjük, hogy a VTA gátló bemenetei gyengülni fognak PCE-kezelés hatására. Ezzel szemben a serkentő bemenetek száma csökkent, viszont az állványféhérje sűrűségében is csökkenés volt tapasztalható, ami arra utalhat, hogy a kevesebb megmaradó serkentő bemenet valamilyen kompenzációs mechanizmus révén próbál legalább ugyanolyan serkentést kifejteni. A VTA dopaminerg neuronjaira érkező serkentés és a gátlás aránya ezek alapján eltolódhat, és ez megjelenhet a dopaminerg sejtek serkentetőségében és tüzelési tulajdonságaiban, végső soron a kimenetén is, azaz több vagy kevesebb dopamin felszabadulása várható ezen sejtek célpontjában, a nucleus accumbens shell részében. A mezolimbikus dopaminrendszer egyensúlyának felborulása pedig az állatok viselkedésének megváltozásával is járhat, hiszen a jelpálya zavara összefüggésbe hozható több pszichiátriai betegséggel is, melyek markáns tüneteit állatmodellekben is lehetséges vizsgálni.

Ezen predikciók teszteléséhez komplex élettani mérésekre és viselkedési paradigmák beállítására volt szükség, amelyek nem álltak a laborunk rendelkezésére, így külföldi kollaborátoraink végezték a kísérleteket a szardíniai Cagliari Egyetemen. Az általuk készített eredményeket a Diskusszió fejezetben mutatom be röviden, melyek az anatómiai kísérleteket kiegészítve társelsőszerzős publikációm részét képezték.

5 Összefoglalás

5.1 Új tudományos eredmények

Tézis 1a: *In silico* egysejt mRNS-szekvenálási adatbázisok vizsgálata alapján azt találtam, hogy az egér hippocampusz CA1 és CA2/CA3 régiójának, valamint a szomatoszenzoros kéregnek a CB₁+ interneuronjai expresszálják a NECAB1 és NECAB2 kalciumkötő fehérjék mRNS-eit. Ezt megerősítettem kísérletes eredményekkel populációs szinten mRNS és fehérje szinten is a hippocampuszban, szomatoszenzoros kéregben és a bazolaterális amygdalában.

Kapcsolódó publikációk: [J4], [C8], [C9]

Régóta érdekli az interneuron-kutatókat, hogy vajon melyek lehetnek a CB₁+ interneuronoknak a konszenzus kalciumkötő fehérjéi, amelyek jó populációs markerként szolgálhatnak, és akár felelősek lehetnek a sejtcsoport specifikus tüzelésmintázatáért és az agyi hálózatokban betöltött szerepéért. Az egysejt mRNS szekvenálás technikájának fejlődésével lehetőségünk nyílt arra, hogy egy átfogó hippocampális és szomatoszenzoros kéregbeli adatbázisban ezen lehetséges kalciumkötő fehérjék után kutassunk. Elemzéseink után a NECAB1 és NECAB2 fehérjét emeltük ki, mint jelölteket, és a továbbiakban kísérletes munkával bizonyítottuk az adatbázis alapján felállított hipotézisünket. Ez egy jó példa arra, hogyan lehet felhasználni a napjainkban az egyre nagyobb mennyiségben termelődő adatot egy-egy kérdés megválaszolására, majd kísérletekkel validálni azt.

Tézis 1b: Egyedileg azonosított sejteken korrelált konfokális és STORM szuperrezolúciós mikroszkópia segítségével megmutattam, hogy a NECAB1 és NECAB2 fehérjék szubcelluláris eloszlása különbözik az egér hippocampusz CA1 régiójában: a NECAB1 fehérje nagyobb sűrűségben fordul elő a szomatodendritikus kompartmentben, míg a NECAB2 fehérje inkább az axon terminálisokban sűrűsödik be.

Kapcsolódó publikációk: [J4], [C8], [C9]

A NECAB1 és NECAB2 fehérjék között nagy a szekvenciabeli hasonlóság, és felmerült a kérdés, miért van szüksége ugyanazon sejtípusnak két ilyen hasonló proteinre. Egyedi sejtes kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy van-e valamilyen elhelyezkedésbeli különbség a kétféle fehérje között. Míg konfokális mikroszkópiával a NECAB1-et nem sikerült detektálnunk az axonterminálisokban, viszont a NECAB2 itt fordult elő nagyobb mennyiségben, addig a korrelált konfokális és STORM kísérletekben megmutatkozott a szuper-rezolúciós módszer előnye, hiszen a magasabb szenzitivitásának köszönhetően az axonterminálisokban is

detektálni tudtuk a NECAB1-et, viszont sokkal kisebb sűrűségben, mint a NECAB2-t. Ez a sűrűségbeli eltérés jelenthet funkcióbeli különbségeket is a két protein között.

Tézis 2a: Konfokális, valamint korrelált konfokális és STORM mikroszkópiás vizsgálatok segítségével azt találtam, hogy hím patkányokban prenatalis kannabisz kezelés hatására nincs különbség a VTA dopaminerg sejtjeinek számában és az azok vGluT1+ és VIAAT+ bemenetein található CB₁ receptorok mennyiségében .

Kapcsolódó publikáció: [J3]

A kannabisz egyre nagyobb mértékű rekreációs célú és orvosi alkalmazásának növekedésével párhuzamosan növekszik világszerte a kannabisz használó várandós nők száma, akik sokszor nincsenek tisztában azzal, hogy árthatnak is magzatuknak. Fontos tehát vizsgálni az utódokban bekövetkező, a kannabisz aktív hatóanyagai, például a THC- okozta változásokat. Kutatásunkban a jutalmazó rendszerre fókuszáltunk, hiszen a drogok nagy része itt fejt ki hatását. Egy patkány állatmodellt használtunk, melyben az anyáknak adagoltunk THC-t a gesztációs időszak alatt. Bár a THC köztudottan hat a CB₁ receptorokon, amelyek a magzati élet során aktívan befolyásolják az agyfejlődést, nem találtunk különbséget a kezelt és kezeletlen patkányok ventrális tegmentális területén a dopamint tartalmazó sejtek számában, illetve az azokra érkező serkentő (vGluT1+) és gátló (VIAAT+) bemeneteken a CB₁ receptorok számában. A kísérletek során kihasználtuk a korrelált konfokális és STORM mikroszkópia előnyeit, hiszen a CB₁ receptorok kis száma miatt konvencionális mikroszkópiával nem lett volna lehetséges a vizsgálat, szükség volt a STORM nagyobb érzékenységére, valamint, hogy azonosítani tudjuk a bemeneteket konfokális mikroszkópia segítségével.

Tézis 2b: Konfokális, valamint korrelált konfokális és STORM mikroszkópiás vizsgálatok segítségével azt találtam, hogy a prenatalis kannabisz kezelés komplex szinaptikus változásokat okoz a hím patkányok VTA-beli dopaminerg sejtjeinek serkentő és gátló bemeneteinek anatómiájában: kevesebb, ám serkenthetőbb vGluT1+ szinapszis lesz, a VIAAT+ szinapszisok gyengülnek, viszont számuk nem változik.

Kapcsolódó publikáció: [J3]

Egyedileg, biocytinnel töltött VTA-beli dopaminerg sejteken többcsatornás fluoreszcens immunfestést végeztünk a vGluT1 serkentő és a VIAAT gátló szinaptikus markerek ellen, és nagyfelbontású konfokális képalkotás és komplex képfeldolgozási lépések után azt találtuk, hogy a dopaminerg sejtek bemeneteinek száma eltérő módon változik prenatalis kannabisz kezelés hatására. A szinapszisok molekuláris elrendeződése is változik, ebben az esetben a korrelált mikroszkópia előnyeit ott tudtuk kihasználni, hogy szinapszis-specifikusan vizsgáltuk

a bassoon állványfehérje besűrűsödését: míg a kezelt állatokban a serkentő szinapszisokban csökkent az állványfehérje sűrűsége, a gátlókban nőtt. Ez arra utal, hogy a serkentő szinapszisok erőssége nő, a gátlóké csökken, hiszen a szinaptikus fehérjesűrűség befolyásolja a feszültségfüggő kalciumcsatornák számát az aktív zónában. Ezen kívül a változatlan számú CB₁ receptornak eltérő mennyiségű kalciumcsatornát kell szabályoznia, ami szintén hozzájárulhat a változásokhoz. Az anatómiai megfigyeléseinket kollaborátoraink elektrofiziológiai mérésekkel támasztották alá, és viselkedésbeli fenotípus különbséget is találtak a kezelt és kezeletlen állatok között. Továbbá sikerült egy, már korábban más indikációra forgalomba került szerrel meggátolni a változásokat a kezelt állatokban, ami ígéretes gyógymódot jelenthet a jövőben azon gyermekek számára, akik *in utero* találkoztak a kannabisz hatóanyagaival.

6 Diszkusszió és az eredmények alkalmazási lehetőségei

6.1 I. CB₁-pozitív interneuronok kalciumkötő fehérjéinek vizsgálata

A sejt plazma kalcium koncentrációjának sokoldalú szabályozása összefüggésben áll azzal, hogy ez az ion milyen sokféle specifikus funkciót tölt be az idegsejtekben, például a neurotranszmitter-felszabadulásban, a szinaptikus plaszticitásban, a neuroszenzoros jelátvitelben, valamint az aktivitásfüggő génátíródásban. Ezeknek a folyamatoknak a szabályozásában részt vehetnek kalciumkötő fehérjék [45]–[48]. Ezen kívül a CaBP-k fontosak a taxonómiai megközelítésekben is, hiszen sok esetben egyedi markerként szolgálnak egy-egy idegsejtpopuláció azonosításában [42].

Erre egy példa a parvalbumin nevű kalciumkötő fehérje, mely régóta ismert kalcium pufferelő fehérje, és a központi idegrendszer egyik nagyon fontos gátló neuron populációjának jól ismert szelektív jelölője [4], [41]. A PV+ interneuronok akciós potenciáljai rövidek (~0,5 ms), és gyorsan terjednek. Ezek a sejtek magas frekvencián tüzelnek, gyors és megbízható neurotranszmisszió jellemzi őket, így ezek az IN-ok fontos szerepet játszanak a hálózatok időben precíz előre csatolt/visszacsatolt gátló modulációjában és az agykérgi idegsejtcsoportok oszcillációjának kialakulásában [42]. A parvalbumin klasszikusan lassú kinetikájú kalcium pufferként vesz részt a rövid távú plaszticitás hatásos modulációjában [126]–[128], ám újabb bizonyítékok jelentek meg arra vonatkozóan, hogy bizonyos fiziológiai körülmények között magas koncentrációban képes gyors kinetikájú kalcium pufferként is működni, ami a szabályozás még szélesebb repertoárját biztosítja [129], [130].

A CCK/CB₁ tartalmú interneuronok a parvalbuminosoktól igen eltérő tulajdonságokat mutatnak a jelátvitel területén, melyre inkább a kevésbé szigorú csatolás és aszinkron neurotranszmitter-felszabadulás jellemző. Ezen kívül a CCK-s sejteknek hosszabb akciós potenciáljuk van (>0,5 ms), ami az ismétlődő aktiváció során tovább nőhet, így ezek a sejtek elhúzódóbb gátló kontrollban tarthatják posztzinaptikus partnereiket [42]. A CCK/CB₁-es sejtek ezen tulajdonságai más jellegű kalciumpuffer rendszert sejtetnek, mint amit a PV-os sejtekben találunk, bár érdekes módon korábban nem írtak le bennük specifikus EF-kéz kalciumkötő fehérjéket.

Erre irányuló kutatásaink során sikerült találnunk két ilyen kalciumkötő fehérjét a CCK/CB₁+ interneuron populációban a hippocampusban, a szomatoszenzoros kéregben és a bazolaterális amygdala területén, amit mRNS és fehérje szinten bizonyítottunk populációs és egyedi sejt mérésekkel egyaránt, valamint megmutattuk a két fehérje szubcelluláris sűrűségkülönbségét.

A celluláris taxonómiában megfigyelhető kiemelt fontosságukon túl az interneuronok kalciumkötő fehérjéinek tanulmányozása az orvosi kutatásokban is egyre inkább előtérbe kerül, hiszen ezek a fehérjék elengedhetetlen szerepet játszanak a sejtek kalcium

homeosztázisának szabályozásában, mely folyamat gyakran sérül különböző neurobiológiai és pszichiátriai betegségek kapcsán, úgy mint az epilepszia, a Parkinson-kór, illetve az Alzheimer-kór [131], [132]. Habár jelenleg kevés információnk van a NECAB1 és a NECAB2 kalciumkötő fehérjékről, de néhány orvosi implikációt már esetükben is felfedeztek: a NECAB1 egy variánsát nemrégiben egy beszédfejlődési rendellenességhez kötötték [133], míg a NECAB2 összefüggésbe hozták a Parkinson-kórral és a kalcium-közvetítette neurotoxicitással [134], az autizmus spektrum zavarral [135] és a gyulladásoos fájdalom-hiperszenzitivitással [136], ezen túl biomarkerként és lehetséges gyógyszercélpontként jelölték meg ízületi gyulladásoos kórképekben és sclerosis multiplexben is [136]–[138].

Mivel a kalcium homeosztázis felborulása az idegsejtek eltérő tüzeléséhez vezethet, és hosszú távon neurotoxicitáshoz és sejthalálhoz, a NECAB1 és NECAB2 kalciumkötő fehérjék vizsgálata további érdekes és fontos kutatások tárgya lehet.

6.2 II. A prenatális THC kezelés hatásának vizsgálata

6.2.1 A publikáció társszerzői által a Cagliari Egyetemen végzett kísérletek rövid összefoglalása

6.2.1.1 A dopaminerg idegsejtek serkenthetősége

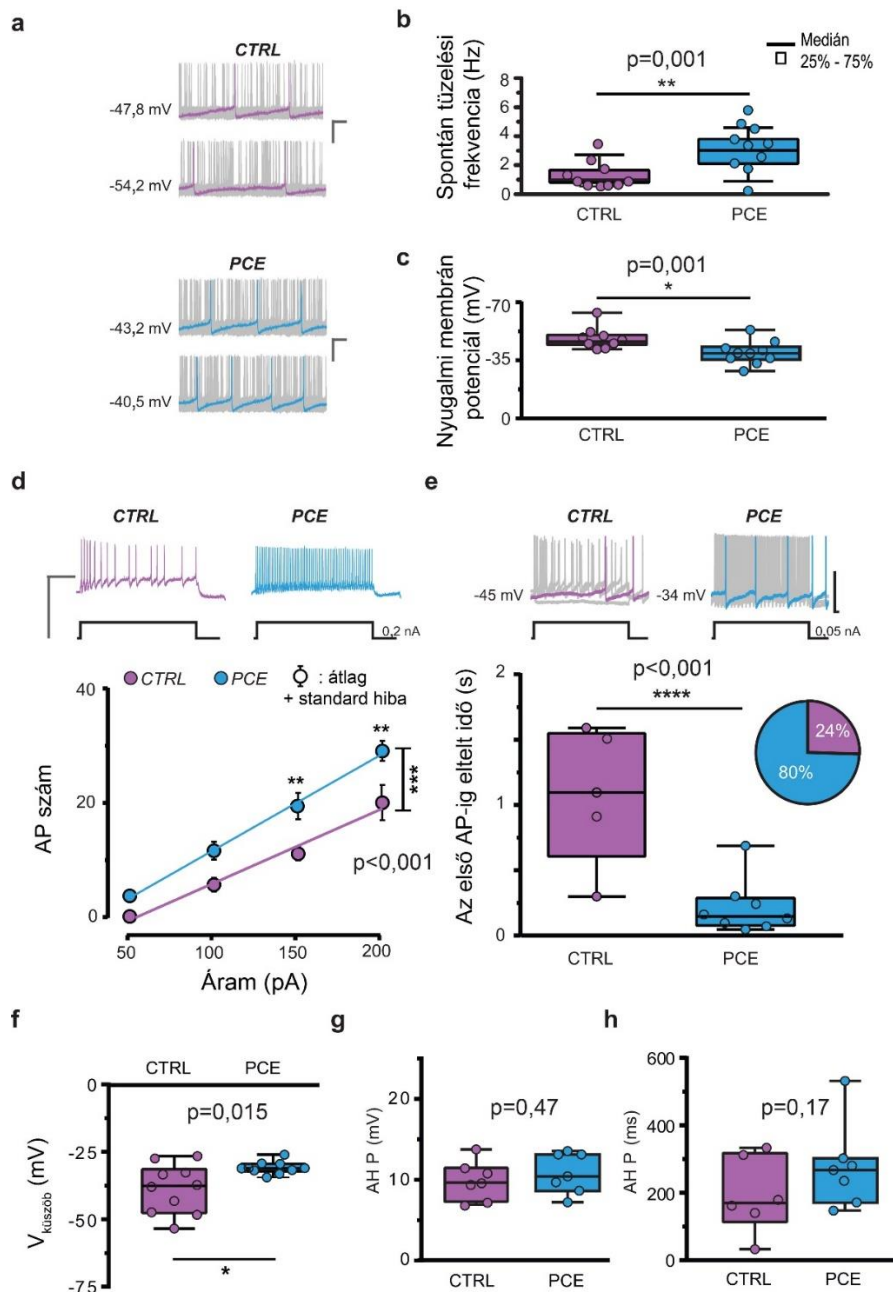
Első lépésként azt szeretttük volna kollaborátoraink segítségével tesztelni, hogy a PCE-kezelés hatására a dopaminerg sejtek bemenetében tapasztalható anatómiai és molekuláris változások milyen élettani különbségeket eredményeznek a VTA dopaminerg sejtjeiben.

Ennek vizsgálatához teljes sejt konfigurációjú patch-clamp kísérletet használtunk akut horizontális VTA szeletekben. Current clamp módban vezettünk el a VTA laterális részén található sejtekből, ahol a nucleus accumbens shell részébe vetítő dopaminerg sejttestek nagy része található [139]–[141]. A biocytinnel töltött sejtek dopaminerg tulajdonságát fluoreszcens anti-tirozin-hidroxiláz festéssel és konfokális mikroszkópiával erősítettük meg (7. ábra).

A PCE-kezelt állatokból származó dopaminerg neuronok jelentősen eltértek a kontrolltól elektrofiziológiai paramétereik alapján: spontán magasabb frekvencián tüzeltek, és depolarizáltabb nyugalmi membránpotenciállal rendelkeztek (21. ábra/a-c). Ezen kívül a PCE dopaminerg neuronok magasabb serkenthetőséget mutattak, és a sejttestükbe fecskendezett áramok hatására magasabb frekvencián tüzeltek, mint a CTRL állatokból származó sejtek (21. ábra/d). Hamarabb kialakultak az akciós potenciálok a legkisebb injektált áram hatására, és a dopaminerg sejtek nagyobb hányadában figyeltünk meg akciós potenciált (16/20, azaz 80% a PCE, és 5/21, azaz 23% a CTRL sejtek esetében) (21. ábra/e). Ez egybecseng a depolarizáló áramok hatására létrejövő akciós potenciálok alacsonyabb küszöbértékével is

(21. ábra/f). A hiperpolarizáció utáni periódus hosszában és feszültségértékében viszont nem találtunk különbséget a csoportok között (21. ábra/g, h).

Összességében tehát könnyebben gerjeszhetőbbnek, aktívabbnak mutatkoztak a prenatális THC-kezelésen átesett állatok dopaminerg sejtjei, ami arra utal, hogy a kezelés úgy változtatja meg a dopamin rendszer sejtjeinek belső tulajdonságait, hogy azokat egy hiperserkenthető fenotípussal ruházza fel, ami többféle pszichiátriai betegség klinikai megjelenésével mutat hasonlóságot [80], [84].



21. ábra A PCE-kezelés növeli a VTA dopaminerg sejtjeinek aktivitását (Frau, Miczán és mtsai. [122], módosítva)

a) Dopaminerg sejtek spontán aktivitásának reprezentatív jelalakjai akut VTA szeletből ($N=20$ és 21 kísérlet, kalibráció: 100 ms, 20 mV).

b) A PCE-kezelt állatok sejtjei magasabb spontán aktivitást mutatnak ($p=0,001$, kétmintás t -teszt, Welch-féle korrekció, $N=10$).

c) A PCE-kezelt állatokból származó sejteknek alacsonyabb a nyugalmi membrán potenciálja ($p=0,01$, kétmintás t -teszt, $N=10$).

d) A PCE-kezelt dopaminerg sejtek jobban gerjeszhetőek a sejttestbe injektált áram hatására ($p=0,0001$, kétutas RM-ANOVA Bonferroni-korrekcióval a csoportok között, $N=10$). A jelalakok reprezentatív kiváltott akciós potenciálokat mutatnak a maximális injektált áram hatására, kalibráció: 400 ms, 100 mV).

e) A legkisebb injektált áram hatására megjelenő első AP megjelenésének ideje rövidebb a PCE-kezelt utód esetében, és több sejt reagál AP-lal az áraminjekcióra ($p<0,001$, kétmintás t -teszt, $N=5$ és 8). A kördiagram az 50 pA-es áram hatására tüzelő sejtek arányát mutatja (CTRL: lila, PCE: kék). Reprezentatív jelalakok a minimális injektált áram hatására (kalibráció: 100 ms, 50 mV).

f) A PCE-kezelt állatokból származó dopaminerg sejtek alacsonyabb küszöbfeszültséggel rendelkeznek ($p=0,015$, kétmintás t -teszt, $N=10$).

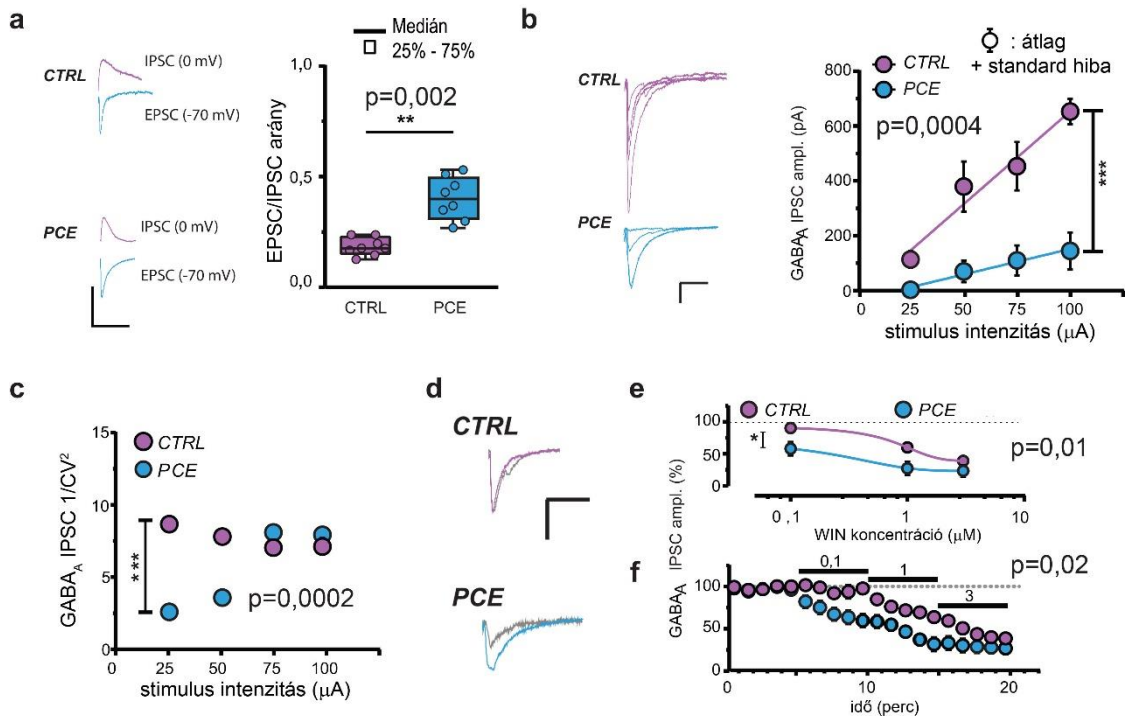
g) A PCE-kezelés nem befolyásolja a hiperpolarizáció utáni periódus (AHP) amplitúdóját ($p=0,47$) és az h) AHP idejét ($p=0,14$, kétmintás t -teszt, $N=10$).

6.2.1.2 *A dopaminerg sejtekre érkező serkentő és gátló szinaptikus bemenetek*

Miután megismertük, hogy változnak a PCE-kezelés hatására a dopaminerg sejtek belső elektrofiziológiai tulajdonságai, a következő lépés az volt, hogy vizsgáljuk a dopaminerg sejtek szinaptikus tulajdonságait.

Először is a serkentés és a gátlás arányának robosztus megváltozását tapasztaltuk a PCE-kezelt állatokban, méghozzá a serkentetőség javára (22. ábra/a). Ez részben azzal magyarázható, hogy a PCE-kezelt patkányokban kisebb szinaptikus gátlás érkezik a dopaminerg idegsejtekre (22. ábra/b). Annak megítélésére, hogy ez a változás preszinaptikus mechanizmus eredménye-e, kiszámoltuk az $1/CV^2$ értéket (a variációs együttható négyzetének inverze) [142]. A PCE-kezelés csökkentette a gátló posztzinaptikus áramok (IPSC-k) $1/CV^2$ értékét az alacsonyabb stimulus intenzitásoknál, amely a gátló szinapszisok alacsonyabb vezikula-felszabadulási valószínűségére (release probability) utal (22. ábra/c).

Azt is szeretnénk volna tesztelni, hogy a csökkent gátló szinaptikus aktivitást okozhatja-e fokozott endokannabinoid receptor működés. A CB_1/CB_2 vegyes receptor agonista WIN (WIN 55,212-2) nagyobb és gyorsabb hatást gyakorolt az IPSC-k amplitúdójára a PCE-kezelt állatok dopaminerg sejtjeiben (22. ábra/d-f). Korábban a STORM mikroszkópiás vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a CB_1 receptorok számában nincsen különbség a PCE és a CTRL állatok dopaminerg neuronjainak gátló afferensein (18. ábra), ugyanakkor több bassoon állványfehérje figyelhető meg ezekben a szinapszisokban, ami arányosságban áll a feszültségfüggő kalcium csatornák, azaz a CB_1 receptor célmolekuláinak számával [143], így feltételezhető, hogy ugyanannyi CB_1 receptornak több feszültségfüggő kalciumcsatorna csendesítéséről kell gondoskodnia, ami megmagyarázhatja a csökkenő hatékonyságot az állványfehérje sűrűsödésének csendesítő hatása mellett is. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a CB_1 agonista WIN szaturáló adagjának alkalmazása ugyanazt a hatást váltja ki a $GABA_A$ IPSC-k amplitúdójára (22. ábra/e, f) mindkét kezelési csoportban. Összességében ezek az adatok azt támasztják alá, hogy a PCE-kezelés az aktív zóna molekuláris újraszerveződését okozza a gátló szinapszisokban, amely megnövekedett kannabinoid kontrollhoz és csökkent $GABA$ gátláshoz vezet.



22. ábra A PCE-kezelés csökkenti a dopaminerg neuronokra érkező szinaptikus gátlást (Frau, Miczán és mtsai. [122], módosítva)

a) Ugyanazon dopaminerg sejtől kiváltott EPSC és IPSC jelalakja és kvantifikációja ($p=0,002$, kétmintás t -teszt, $N=10$). A PCE kezelést követően csökkent a sejtekre érkező gátlás.

b) A PCE-kezelt állatokból származó dopaminerg sejtekben eltörlődik az input-output összefüggés ($p=0,0004$, $N=4$ és 5 , kétutas RM-ANOVA Bonferroni-korrekcióval), a bal oldalon reprezentatív IPSC jelalakok láthatóak (kalibráció: 5 ms, 100 pA).

c) A PCE hatása a korrelációs koefficiens inverzére ($1/CV^2$, $p=0,0002$, kétutas RM-ANOVA Bonferroni-korrekcióval, $N=4$ és 5).

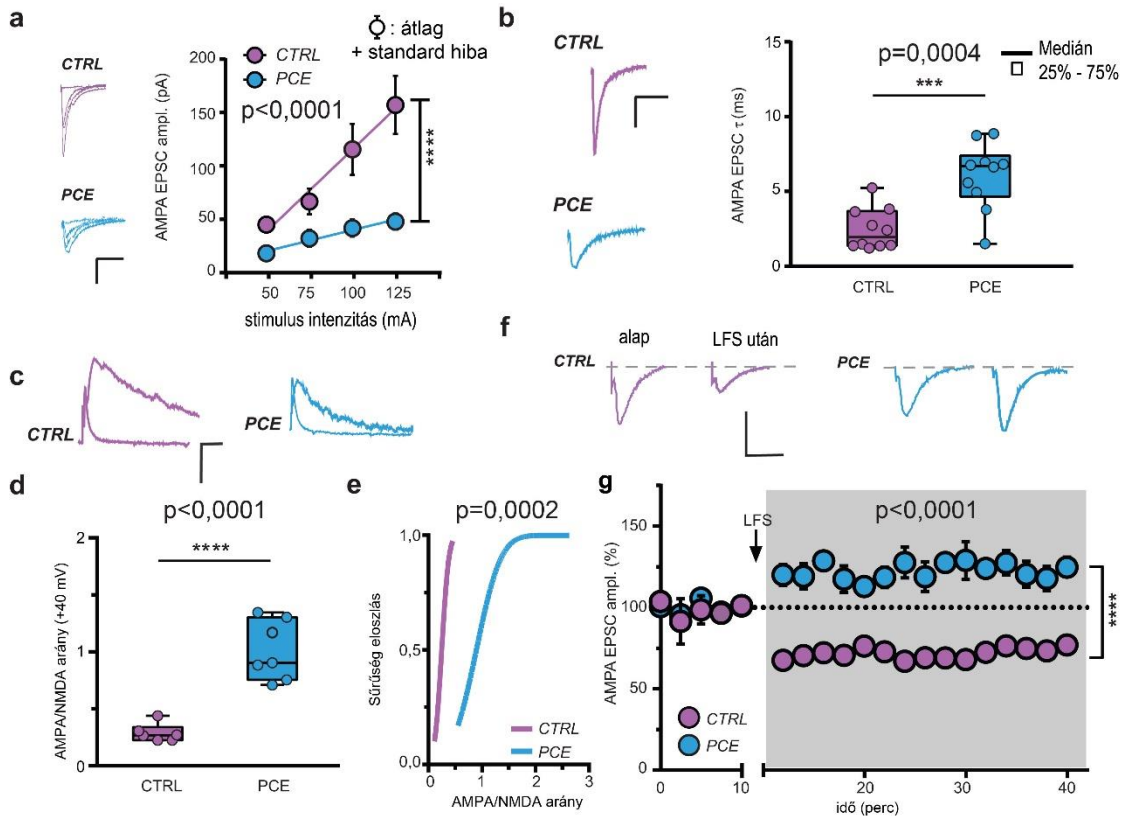
d) WIN 55.212-2 (WIN, $0,1$ μ M) kezelés előtti és utáni (szürke) reprezentatív jelalakok (kalibráció: 5 ms, 100 pA).

A WIN kezelés dózis-hatás görbéje nagyobb e) ($p=0,01$) és gyorsabb f) ($p=0,02$) hatást mutat a PCE csoportban ($N=6$, kétutas RM-ANOVA Bonferroni-korrekcióval).

A PCE-kezelés serkentő szinapszisokra kifejtett hatására is kíváncsiak voltunk, így először felvettük a különböző stimulus intenzitásokhoz tartozó válaszok bemenet-kimenet (input-output) görbéit. Azt találtuk, hogy nagyobb stimulus intenzitás szükséges ugyanakkora szinaptikus serkentés kiváltásához a PCE utódokban, így valószínűsíthetően a kezelés csökkenti a dopaminerg sejtekre érkező serkentő inputok számát és/vagy erősségét (23. ábra/a), ahogy ezt a konfokális mikroszkópos vizsgálatokban is tapasztalhattuk (19. ábra/a-c). Ezzel együtt megfigyeltük, hogy hosszabb lett a poszt-szinaptikus AMPA áramok lecsengése (23. ábra/b), ami arra utal, hogy a PCE-kezelés a dopaminerg neuronok serkentő afferenseinek poszt-szinaptikus válaszkészségét is növelte. Ehhez hasonlóan a PCE utódokban magasabb AMPA/NMDA arányt figyelhettünk meg, és ennek a sűrűség-eloszlás függvénye jobbra tolódott a dopaminerg sejtekben (23. ábra/c-e). Figyelemre méltó megjegyezni, hogy hasonló AMPA/NMDA arány növekedést tapasztaltak korábban *in utero* kokainnak és alkoholnak kitett utódok VTA dopaminerg sejtjeiben is [144], [145].

A dopaminerg neuronokra érkező csökkent erősségű gátlás és a serkentő bemenetekre való nagyobb válaszkészség eltolhatja a szinaptikus plaszticitás küszöbértékeit is. A kontroll

állatokban alacsony frekvenciájú preszinaptikus stimulációt (LFS, 1 Hz) posztzinaptikus membrán depolarizációval (-40 mV) párosítva megfigyelhető volt a serkentő szinapszisok várt hosszú távú depressziója (LTD) [146]. Ezzel szemben a PCE-kezelt állatokban ugyanez a stimulus protokoll a szinapszisok hosszú távú potencírozódásához vezetett (LTP) (23. ábra/f-g), ami az éretlen glutamáterg szinapszisok egyik ismertető jege. A szinapszisok plaszticitásának ilyen szintű megváltozása előrevetítheti későbbi pszichiátriai kórképek kialakulásának nagyobb valószínűségét.



23. ábra A PCE-kezelés megváltoztatja a VTA dopaminerg neuronjaira érkező serkentő szinaptikus bemenetek tulajdonságait (Frau, Miczán és mtsai.[122], módosítva)

- a) A PCE-kezelés megváltoztatja az input-output összefüggést ($p < 0,0001$, kétutas RM-ANOVA, $N = 5$ és 7). A bal oldalon reprezentatív AMPA EPSC jelalakok láthatóak (kalibráció 10 ms, 50 pA).
- b) Az AMPA EPSC lecsengési ideje meghosszabbodik PCE kezelés hatására ($p = 0,0004$, kétmintás t-teszt, $N = 5$ és 7). A példa AMPA EPSC jelalakokat 70 mV-on rögzítettük (kalibráció 10 ms, 50 pA).
- c) AMPA és NMDA EPSC jelalakok, melyeket +40 mV-on tartott dopaminerg neuronokból rögzítettünk (kalibráció 10 ms, 50 pA).
- d) A PCE-kezelés befolyásolja az AMPA/NMDA arányt ($p < 0,0001$, kétmintás t-próba, $N = 5$ és 7).
- e) Az AMPA/NMDA arány értékek kumulatív sűrűségeloszlás függvénye ($p = 0,0002$, Kolmogorov-Smirnov teszt, $N = 6$ és 7).
- f) AMPA EPSC jelalakok, melyeket -70 mV-on vettünk fel posztzinaptikus membrán depolarizáció (-40 mV) és alacsony frekvenciás preszinaptikus stimuláció (LFS, 1 Hz) együttes alkalmazása előtt és után (kalibráció 5 ms, 100 pA).
- g) Az alacsony frekvenciás stimuláció (1 Hz, kezdőpontja nyíllal jelölve) hosszú távú potencírozódást (LTP) okoz a PCE-kezelt utódotokban, míg a CTRL patkányok DA neuronjaiban hosszú távú depresszió (LTD) figyelhető meg ($p < 0,0001$, kétutas RM-ANOVA, $N = 5$ és 4).

6.2.1.3 *Speciális viselkedési endofenotípus*

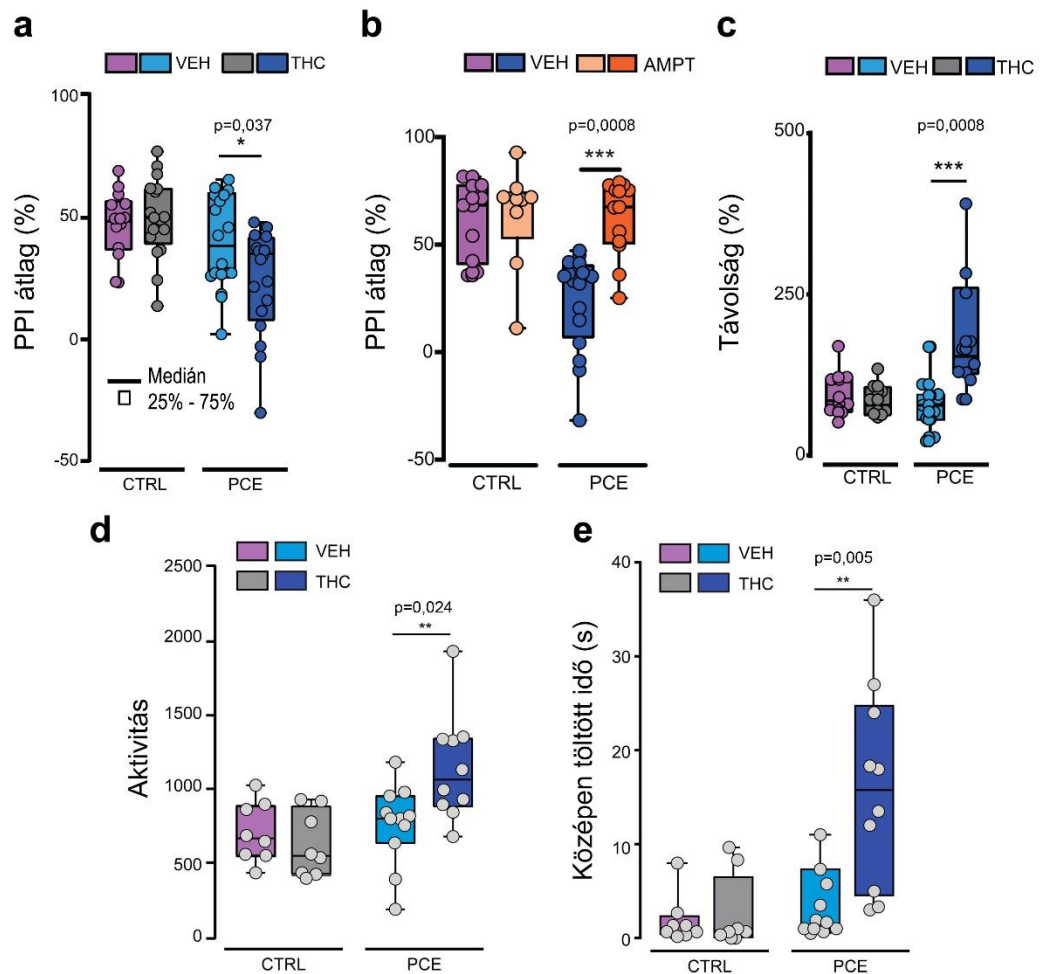
A közepagy dopaminerg jelátvitel prenatális kannabisz adagolás hatására történő megváltozása a fejlődés folyamán tükröződhet a rácsálók eltérő viselkedési mintázataiban, melyek akár alapállapotban, akár valamilyen beavatkozás hatására létrejöhetnek. Így a PCE-kezelt utódokat többféle viselkedési tesztnek vetettük alá, vagy „környezeti inzultusként” akut szubkután THC (2,5 mg/kg) adagolást választottunk az emberi pre-pubertásnak megfelelő időszakban (a 15. és 28. életnap között), vagy pedig csupán a hordozószert adagoltuk a THC hatóanyag nélkül (VEH: vehikulum). Azért ezt az időszakot választottuk, mert emberben a pszichiátriai betegségek, állapotok első jelei, az ún. „szubklinikus tünetek” még a serdülőkor és a fiatal felnőtt kor előtt jelentkezhetnek [147], és egy fontos kutatási cél, hogy minél hamarabb, már ebben a fázisban azonosíthatóak legyenek az elváltozások, az úgynevezett endofenotípusok, azaz olyan mérhető, nem feltétlenül patológiás jellemzők, amelyek utalhatnak egy későbbi kóros állapot kialakulására [86].

Egészséges felnőtt kannabiszfogyasztó emberekből megfigyelték, hogy a szer olyan tünetek széles skáláját is kiválthatja, melyek hasonlítanak a skizofrénia-spektrum zavar megnyilvánulásaira [83], [148]. Így elsőként egy ilyen tipikus skizofrénia tünet állatmodelljét teszteltük PCE-kezelt patkányokon: azt szeretettük volna megállapítani, hogy épek-e az állatok szenzomotoros kapuzó funkciói. Ezt úgy lehet vizsgálni, hogy mérjük, hogy az állatok mennyire riadnak meg egy bizonyos hangingertől annak függvényében, hogy előtte hallanak-e egy figyelmeztető hangot vagy sem. Ezt prepulzus gátlásnak (pre-pulse inhibition, PPI) nevezzük, és ennek károsodása sok pszichotikus rendellenességgel küzdő betegen is megfigyelhető [149].

A kísérletek során azt találtuk, hogy önmagában a PCE-kezelés nem módosítja a prepulzus gátlást, de akut THC-kezelés hatására a PCE-csoportban a PPI érték károsodott, míg ez nem befolyásolta a kontroll állatokat (24. ábra/a). A jelenség hátterében valószínűsíthetően a mezolimbikus dopaminszintek megváltozása állhat, hiszen a tirozin-hidroxiláz gátló AMPT (alfa-metil-para-tirozin) alkalmazásával elkerülhetőek voltak a PPI-ben megfigyelhető rendellenességek a PCE állatokban (24. ábra/b).

A következő viselkedési kísérletben az akut THC hatását vizsgáltuk a spontán mozgási jelenségekre PCE-kezelt és kontroll állatokban. Ehhez egy $\sim 40 \times 40$ cm-es négyzet alakú terepen figyeltük a patkányok mozgását. Az adott idő alatt megtett távolság és az aktivitási események száma nem különbözött alapállapotban a kontroll és a PCE-kezelésen átesett állatok között, ám akut THC adagolás hatására a PCE-állatok hiperaktivitását figyelhettük meg (24. ábra/c, d). Ha megkülönböztettük a középső 20×20 cm-es részt a szélekhez közeli 20 cm-es sávától, azt tapasztaltuk, hogy a THC-kezelés a PCE állatokban növelte a középső részen töltött idő arányát, ami ebben az állatmodellben úgy értelmezhető, hogy ezek a

patkányok fajtársaikhoz képest többször tartózkodtak a „kockázatosabb” nyílt területen (24. ábra/e).



24. ábra A prenatális kannabisz kezelés fogékonyságot okoz későbbi THC-adagolás után különböző viselkedési paradigmákban (Frau, Miczán és mtsai.[122], módosítva)

a) Akut szubkután THC adagolás (2,5 mg/kg) szenzorimotoros kapuzási rendellenességeket okoz PCE-kezelt hím patkányokban, ezt csökkent PPI-index (pre-pulse inhibition, azaz egy előzetes inger miatti csökkent válasz) jelzi. (PCE-VEH vs. PCE-THC: $p=0,037$; CTRL-VEH: $n=14$, PCE-VEH, PCE-THC: $n=18$; CTRL-THC: $n=17$).

b) A dopamin szintézis gátlásával (AMPT: alfa-metil-para-tirozin, 200 mg/kg intraperitoneálisan) megelőzhetőek az akut THC-indukálta PPI különbségek a PCE csoportban ($p=0,0008$, PCE-VEH-THC vs. PCE-AMPT-THC; CTRL-VEH-THC, PCE-VEH-THC: $n=10$, CTRL-AMPT-THC: $n=9$, PCE-AMPT-THC: $n=13$).

c) Az akut THC megnövekedett mozgási aktivitást okoz a PCE-kezelt utódokban ($p=0,0008$ PCE-VEH vs. PCE-THC; CTRL-VEH, CTRL-THC: $n=8$, PCE-VEH: $n=11$, PCE-THC: $n=10$).

d) Az akut THC növeli a mozgási eseményeket a PCE-kezelt utódokban ($p=0,0024$ PCE-VEH vs. PCE-THC, CTRL-VEH, CTRL-THC: $n=8$, PCE-VEH: $n=11$, PCE-THC: $n=10$).

e) Az akut THC meghosszabbítja az aréna középső részén töltött időt ($p=0,005$ PCE-VEH vs. PCE-THC, CTRL-VEH és CTRL-THC: $n=8$, PCE-VEH: $n=11$, PCE-THC: $n=10$).

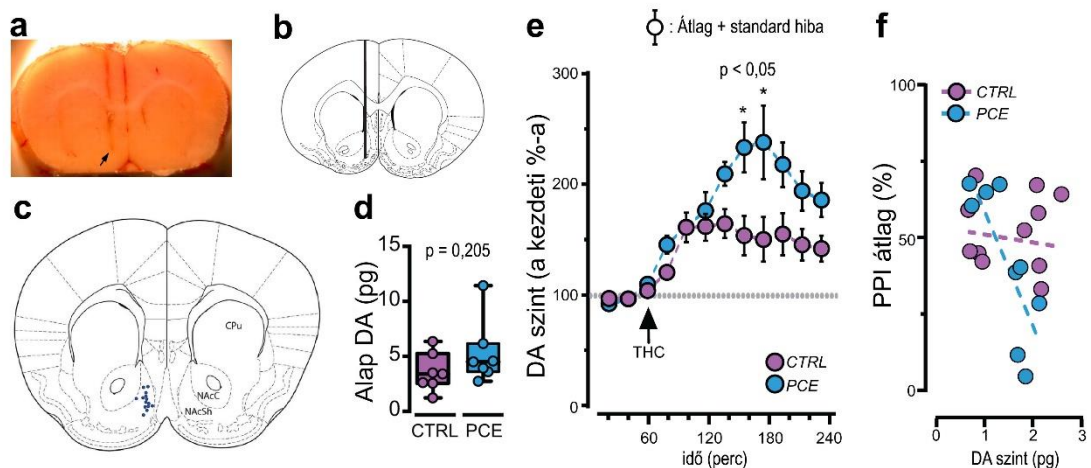
Az adatokat kétutats ANOVA módszerrel elemeztük, amelyet Tukey-féle teszt követett.

6.2.1.4 Fokozott dopaminfelszabadulás

A következőkben azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a PCE csoport utódaiban a VTA dopaminerg sejtjeinek fokozott serkentetősége együtt jár-e azok kimeneteinek megnövekedett aktivitásával, azaz több dopamin szabadul-e fel belőlük, mint a kontroll csoport állataiból.

Ehhez élő állatok agyában mértük a dopamin felszabadulását, méghozzá a ventrális tegmentális terület egyik fő célpontjában, a nucleus accumbens shell részében (NAcS) (25. ábra/a-c). Célunk eléréséhez agyi mikrodialízis alkalmazására volt szükség, ami azt jelenti, hogy az élő állatok agyából nagyon precíz módon mintát tudunk venni korábban beültetett elektróda segítségével, és ebben a mintában tudjuk mérni a neurotranszmitterek, esetünkben a dopamin szintjét nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia segítségével.

A viselkedési kísérletekkel összhangban azt találtuk, hogy habár alapállapotban az extracelluláris dopaminszintekben nincs különbség a CTRL és PCE állatok nucleus accumbensében (25. ábra/d), de akut THC alkalmazása során a PCE csoport állatai nagyobb dopaminszint-emelkedéssel reagáltak, mint a CTRL állatok. Ez arra utalhat, hogy az anyai THC-adagolás következtében a PCE állatok mezolimbikus dopaminerg rendszere deszenzitizálódhatott, így csak magasabb dopaminszintekre képes reagálni. Ezen kívül azt is megfigyeltük, hogy a prepulzus gátlás csökkenésének mértéke összefügg a mért dopamin szintekkel (25. ábra/f) a PCE állatokban.



25. ábra A PCE-kezelés fokozott dopaminfelszabadulást okoz a nucleus accumbensben akut THC hatására (Frau, Miczán és mtsai. [122], módosítva)

a) Reprezentatív ábra a nucleus accumbens shell részében elhelyezett mikrodialízis próbáról. A nyíl a próba hegyét mutatja (N=7).

b) Sematikus ábra a próba elhelyezkedéséről az agyban (függőleges vonal, nucleus accumbens shell, AP: +1,5, L: +/- 0,7, V: -7.0 a bregmától) – Paxinos és Watson 2007-es ábrája alapján.

c) Az általunk végzett kísérletek próbáinak valós helyzete. NAcSh: nucleus accumbens shell, NAcC: nucleus accumbens core, CPu: caudate/putamen.

d) A THC adagolás előtti dopaminszintek megegyeznek ($p=0,205$, párosítatlan t -teszt, N=7 csoportonként)

e) Az akut THC-adagolás nagyobb dopamin felszabadulást okoz a PCE-kezelt patkányok nucleus accumbens shell részében ($p<0,05$, Sidak-féle teszt).

f) A pre-pulse inhibition értéke inverz korrelációt mutat a NAcSh dopaminszintjeivel a THC-kezelt PCE utódokban. Az adatok illesztése lineáris regresszióval történt ($r^2=0,62$, $p=0,01$; CTRL: $n=11$, PCE: $n=9$).

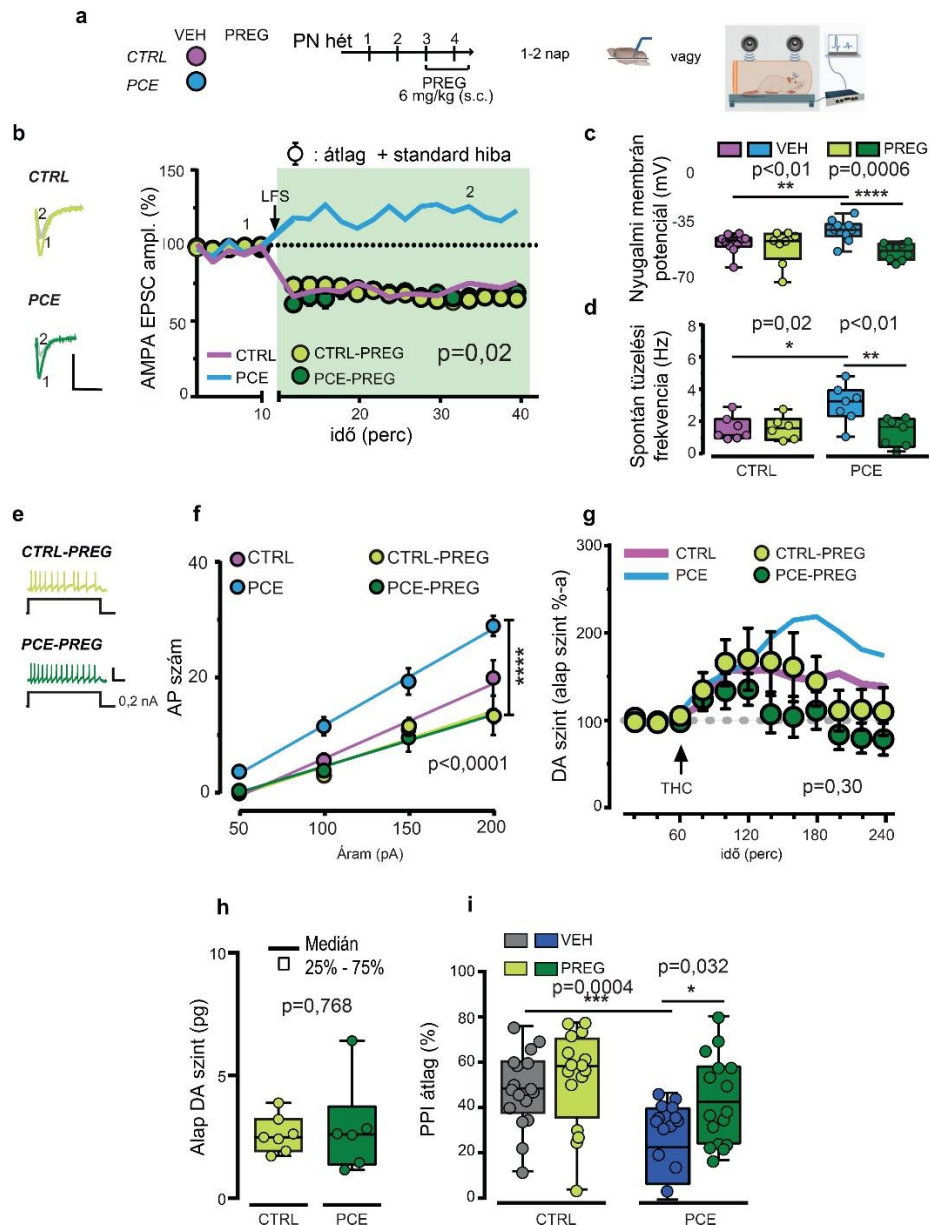
6.2.1.5 A pregnenolon szerepe a THC kezelés hatásainak kivédésében

A PCE-nek kitett utódok fenotípusának enyhítésére nem állnak jelenleg rendelkezésre megelőző stratégiák [71]. Az endofenotípus feltérképezése kiemelkedően fontos abból a

szempontból, ha tesztelni szeretnénk olyan gyógymódokat, amik alkalmazhatóak a hosszú távon kialakuló pszichiátriai betegségek korai, akár még tünetmentes stádiumában [78], [147], [150].

Az amerikai egyesült államokbeli FDA (Food and Drug Administration) szervezet által elfogadott pregnenolon (PREG) nevű neuroszteroid gáttal szab több a skizofréniával kapcsolatos tünetnek (mint például a pszichomotoros agitáció és a PPI zavarok [151]), ezen kívül az endokannabinoid rendszer negatív regulátora [152]. Ezen információk birtokában feltételeztük, hogy a PCE utódok rövid posztnatális pregnenolon kezelése megfelelő lehet a PCE okozta változások visszafordítására a VTA dopaminerg neuronjainak tekintetében. Ehhez pregnenolont (6 mg/kg) vagy annak hordozóanyagát adagoltuk szubkután 9 napon keresztül napi egyszer a 15. és 23. életnap között, és az elektrofiziológiai tesztek 1 vagy 2 nappal az utolsó beadás után végeztük el, amikor a szer már kiürült az agyból (26. ábra/a).

A PREG kezelés visszaállította a hosszú távú depressziót (LTD) a kontroll szintre a dopaminerg sejtek serkentő szinapszisaiban (26. ábra/b), anélkül, hogy a kontroll állatok szinaptikus transzmisszióját befolyásolná. Ezen túl a PREG enyhítette a PCE-kezelés miatt kialakult dopamin neuron túlserkenthetőséget, amit a nyugalmi membrán potenciál (26. ábra/c) és a spontán (26. ábra/d), valamint a kiváltott (26. ábra/e, f) akciós potenciálok megfigyelésével mutattunk meg. A pregnenolon szelektíven akadályozta meg az akut THC okozta magasabb dopaminszinteket a nucleus accumbens shell részében (26. ábra/g, h), és a PCE utódok THC-indukálta szomatoszenzoros kapuzási zavarait is helyreállította (26. ábra/i). Mindent egybevetve ezek az eredmények azt jelzik, hogy a pregnenolon enyhíteni tudja a PCE-kezelés okozta hiperdopaminerg állapotot, és megelőzi az akut THC-kezelés negatív hatásait.



26. ábra A pregnenolon enyhíti a szinaptikus plaszticitásbeli, dopamin neuron aktivitásbeli és viselkedésbeli különbségeket a PCE-kezelt utódokban (Frau, Miczán és mtsai. [122], módosítva)

a) Pregnenolon kezelés: a 3-4. posztnatális hétben, szubkután 6 mg/kg.

b) Pregnenolon hatása az alacsony frekvenciás stimulációs kísérletben (LFS, 1 Hz, kezdete nyíljal jelölve, $p=0,02$, PCE-VEH vs. PCE-PREG, kétutas RM-ANOVA Sidak-féle teszttel, $N=4$). A vastag vonalak a 23. ábra eredményeit mutatják. A példa jelalakok -70 mV-on felvett jeleket mutatnak LFS előtt (1) és után (2) (kalibráció: 5 ms, 100 pA).

c) A pregnenolon visszaállítja a PCE-kezelt utódban a CTRL értékére a nyugalmi membránpotenciált ($p=0,0006$, PCE-VEH vs. PCE-PREG, $p<0,01$, PCE-VEH vs. CTRL-VEH, kétutas RM-ANOVA Sidak-féle teszttel, $N=5$ csoportonként).

d) A pregnenolon visszaállítja a dopaminerg sejtek spontán tüzelési frekvenciáját a PCE-kezelt utódban a CTRL értékére ($p<0,01$, PCE-VEH vs. PCE-PREG, $p=0,02$, PCE-VEH vs. CTRL-VEH, kétutas RM-ANOVA Sidak-féle teszttel, $N=5$ csoportonként).

e) Kiváltott tüzelés reprezentatív jelalakjai pregnenolon-kezelt utódokban (kalibráció: 400 ms, 100 mV).

f) A pregnenolon visszaállítja a kiváltott tüzelést a CTRL értékre ($p<0,0001$, PCE-VEH vs. PCE-PREG, kétutas RM-ANOVA Sidak-féle teszttel, $N=6$ és 7).

g) A pregnenolon kezelés csökkenti a THC hatását a nucleus accumbens dopamin szintjére ($p=0,30$ kétutas RM-ANOVA Sidak-féle teszttel, $N=7$ és 6). A vastag vonalak a 25. ábra adatait jelképezik.

h) Nincs különbség az alap dopaminszintekben a pregnenolonnal kezelt CTRL és PCE állatok között ($p=0,768$, kétmintás t -teszt, $N=7$ és 6).

i) A pregnenolon kivédi a THC-kezelés hatásait a PPI-re a PCE-kezelt utódokban ($p=0,032$, PCE-THC-VEH vs. PCE-THC-PREG, $p=0,0004$, CTRL-THC-VEH vs. PCE-THC-VEH, Tukey-féle teszt, CTRL-THC-VEH: $N=17$, CTRL-THC-PREG, PCE-THC-VEH, PCE-THC-PREG: $N=16$).

6.2.2 Összefoglalás és az eredmények alkalmazási lehetőségei

A projekt keretén belül bebizonyítottuk, hogy az anyai THC-kezelés sokrétű molekuláris, celluláris és szinaptikus változást okoz, mely sérült dopamin funkcióhoz vezet a fiatal hím patkányokban. A VTA dopaminerg neuronjainak ilyen mértékben növekedett serkenthetőségét már felismerték, mint pszichiátriai betegségekhez vezető idegrendszeri fejlődési kockázati tényezőt. Ez megnyilvánulhat rendellenes asszociatív tanulásban vagy a jutalmazási rendszer megváltozott működésében, illetve a klinikai tanulmányok szempontjából nézve olyan maladaptív viselkedésekben, mint az affektív diszreguláció, a pszichózis és a függőségekre való fogékonyság [67], [75], [78]. Az is lehetséges, hogy a THC-t fogyasztó anyák gyermekeinek amygdalájában és nucleus accumbensében mért csökkent dopamin D2 receptor expresszió [153], [154] ennek a hiperdopaminerg módnak lehet az adaptív következménye, és hozzájárulhat a pszichiátriai betegségekre való növekedett sebezhetőséghez is [79].

Az eredmények alapján az a véleményünk, hogy a hiperdopaminerg állapot és a szinapszis-specifikus átalakulás fontos neurobiológiai sarokkövek, melyek elősegítetik az anyai kannabisz használattal összefüggő fogékonysági endofenotípus kialakulását. Ez azért fontos, mert a preklinikai és klinikai vizsgálatok szintén mutattak jelentős oksági összefüggést a skizofrénia és a mezostriális dopamin diszfunkció között, különösen az emelkedett dopamin szintézis és felszabadulás szempontjából [80]. Ezen kívül pozitron emissziós tomográfias tanulmányok találtak összefüggést a THC-okozta megnövekedett dopamin-felszabadulás és a THC-indukálta pszichózis genetikai kockázata között [155], amely nagyfokú családi halmozódást mutat [156]. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a PCE-kezelt utódok a kannabisz felhasználóknak egy olyan részét jelképezik, akik érzékenyek a THC-indukálta pszichózisra [157], ezért a PCE lehet egy kockázati tényező, mely már gyermekkortól nagyobb fogékonyságot okoz a pszichotikus epizódokra [78]. Mivel a PCE-indukálta dopamin diszreguláció akár THC-függő téveszmékre és hallucinációkra is hajlamosíthat, a PCE releváns, befolyásolható prediktora lehet ezen tünetek pszichiátriai rendellenességgé válásához.

Az eredményeink összhangban vannak azzal, hogy korábban megmutatták a pregnenolonról, hogy az endokannabinoid rendszer negatív regulátoraként rácsálókban védelmet nyújt akut THC-mérgezéssel szemben [152] és a skizofrénia egy modelljében is jótékony hatásának bizonyult [151]. Mivel ez egy jól tolerálható, az FDA által engedélyezett, súlyos mellékhatásoktól mentes szer [152], kutatásunknak ígéretes transzlációs lehetőségei vannak a marihuánát használó kismamák gyermekeinek körében. Eredményeink újabb kutatási irányokat nyitnak a PCE-kezelés hatásának vizsgálatára más anatómiailag és funkcionálisan

heterogén, különböző axonális vetítéssel bíró dopamin alcsoportok felé, hiszen a mi kutatásunk a VTA laterális részére fókuszált, mely a nucleus accumbens shell laterális részébe vetít elsősorban [139].

Végül fontos hangsúlyozni, hogy a PCE-kezelt állatok dopaminerg neuronjainak potencírozott állapota hasonlít az *in utero* kokainnak vagy alkoholnak kitett utódokban megfigyeltekhez [144], [145]. Ezért mivel az orvosok általában felhívják a várandós nők figyelmét arra, hogy ne fogyasszanak alkoholt vagy kokaint a terhességük alatt, hiszen árthat a magzatnak, a kísérleteink alapján az is hangsúlyozandó, hogy tájékoztassák őket a kannabiszhasználat következményeiről is; annál is inkább, mert sok fórumon alulbecslik az anyai kannabiszfogyasztással kapcsolatos idegrendszeri fejlődési káros hatások kockázatát [70], [71]. Mivel a kannabiszt legalizálni kívánó törekvések világszerte terjednek, ezért várható, hogy egyre több gyermek születik majd méhen belüli kannabisznak való kitettséggel a következő évtizedekben. Tehát a jelen kutatás azért is fontos, hogy kiemelje a kiterjedt neurobiológiai maladaptív folyamatokat, melyek növelik az utódok fogékonyságát a neuropszichiátriai rendellenességekre.

7 A szerző publikációi

[J1] L. Barna*, B. Dudok*, **V. Miczán**, A. Horváth, Z. I. László, and I. Katona, “Correlated confocal and super-resolution imaging by VividSTORM,” *Nat. Protoc.*, vol. 11, no. 1, pp. 163–183, 2016.

[J2] Barna L., Dudok B., **Miczán V.**, Horváth A., Katona I., „3. Fényszimpózium. A CB₁ kannabinoid receptor sejtípus-specifikus eloszlásának vizsgálata VividSTORM segítségével”, *Magyar Tudomány*, vol. 177, no. 1 pp. 35-38., 2016.

[J3] R. Frau*, **V. Miczán***, F. Traccis, S. Aroni, C. I. Pongor, P. Saba, V. Serra, C. Sagheddu, S. Fanni, M. Congiu, P. Devoto, J. F. Cheer, I. Katona* and M. Melis*, „Prenatal THC exposure produces a hyperdopaminergic phenotype rescued by pregnenolone”, *Nat. Neurosci.*, vol. 22 no. 12, pp. 1975-1985, 2019.

[J4] **V. Miczán**, K. Kelemen, J. R. Glavinics, Z. I. László, B. Barti, K. Kenesei, M. Kisfali, I. Katona, „NECAB1 and NECAB2 are consensus calcium-binding proteins of the CB₁ -positive interneuron population in the mouse forebrain”, *Cerebral Cortex*, vol., no., pp. 2021. elfogadva, megjelenés előtt

[J5] Z. I. László*, Z. Lele*, M. Zöldi, **V. Miczán**, F. Mógor, G. M. Simon, K. Mackie, I. Kacs Kovics, B. F. Cravatt, and I. Katona, “ABHD4-dependent developmental anoikis safeguards the embryonic brain,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–16, 2020.

[C1] **V. Miczán**, „Investigation of the subcellular distribution of CB₁ cannabinoid receptors with correlated confocal and superresolution STORM microscopy” *PhD Proceedings Annual Issues of The Doctoral School Faculty of Information Technology and Bionics* 10 pp. 85-88. (2015)

[C2] **V. Miczán**, „VividSTORM: a new software for the correlated visualization and analysis of pixel intensity-based and localization microscopy data”, *PhD Proceedings Annual Issues of The Doctoral School Faculty of Information Technology and Bionics* 11 pp. 75-78. (2016)

[C3] **V. Miczán**, „Novel analysis tools for correlated confocal and super-resolution microscopy”, *PhD Proceedings Annual Issues of The Doctoral School Faculty of Information Technology and Bionics* 12: pp. 28-28., (2017)

[C4] **V. Miczán**, B. Dudok, L. Barna, A. Horváth, I. Katona, „Probing identified synapses at the nanoscale: developing software tools for visualization and analysis of correlated confocal-

and STORM super-resolution microscopy” *International Brain Research Organization Workshop (IBRO)*, 16-17 January, 2014, Debrecen (poszter)

[C5] **V. Miczán**, B. Dudok, L. Barna, A. Horváth, I. Katona, „VividSTORM: a new software for the correlated visualization and analysis of pixel intensity-based and localization microscopy data” *Frontiers in Neurophotonics Symposium (FINS)*, 3-6 October, 2015, Quebec City (poszter)

[C6] **V. Miczán**, L. Barna, B. Dudok, A. Horváth, J. R. Glavinics, Z. I. László, I. Katona, „VividSTORM: a novel open-source software for super-resolution and confocal microscopy images” *Society for Neuroscience (SFN) Meeting*, 12-16 November, 2016, San Diego (poszter)

[C7] **V. Miczán**, J. R. Glavinics, A. Horváth, L. Barna, B. Dudok, Z. I. László, I. Katona, „New features in VividSTORM promote correlated super-resolution and confocal microscopy” *Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Regional Meeting*, 20-23. September 2017, Pécs (poszter)

[C8] **V. Miczán**, K. Kelemen, J. R. Glavinics, Z. I. László, I. Katona, „Calcium-binding protein profile of CB₁ cannabinoid receptor-positive interneurons in the hippocampus, neocortex and basolateral amygdala”, *EMBO Workshop Cortical interneurons in health and disease*, 17 – 20 June 2018, Costa d’En Blanes (poszter)

[C9] **V. Miczán**, K. Kelemen, J. R. Glavinics, Z. I. László, B. Barti, K. Kenesei, M. Kisfali, I. Katona, „NECAB1 and NECAB2 are consensus calcium binding proteins of the CB₁ -positive interneuron population in the mouse forebrain” *Cannabinoid Function in the CNS Gordon Research Conference (GRC)* 21-26 July 2019, Castelldefells (poszter)

[C10] B. Barti, B. Dudok, K. Kenesei, **V. Miczán**, M. Ledri, I. Katona „Presynaptic nanoscale receptor/effector ratio controls neurotransmitter release probability at hippocampal GABAergic synapses” *Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Regional Meeting*, 20-23 September 2017, Pécs (poszter)

[C11] B. Barti, B. Dudok, K. Kenesei, **V. Miczán**, M. Ledri, G. Y. Balla, I. Soltész, I. Katona „The intra/perisynaptic CB₁ cannabinoid receptor pool tonically controls GABA release at mouse hippocampal synapses” *Society for Neuroscience (SFN) Meeting*, 3-7 November, 2018, San Diego (poszter)

[C12] B. Barti, B. Dudok, **V. Miczán**, K. Kenesei, G. Y. Balla, M. Ledri, D. Zala, Z. Lenkei, I. Soltész, I. Katona „Molecular stoichiometry of CB₁ receptors and the release machinery

predicts tonic cannabinoid control of GABA release” *Cannabinoid Function in the CNS Gordon Research Conference (GRC)* 21-26 July 2019, Castelldefells (poszter)

[C13] J. R. Glavinics, **V. Miczán**, B. Dudok, Z. I. László, I. Katona “Nanoscale Bayesian clustering-based characterization of the presynaptic molecular architecture at GABAergic synapses” *Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Regional Meeting*, 20-23. September 2017, Pécs (poszter)

[C14] J. R. Glavinics, **V. Miczán**, K. Kelemen, Z. I. László, I. Katona “NECAB1 and NECAB2 are the two major calcium-binding proteins of the CB1 cannabinoid receptor-positive GABAergic interneuron population in the neocortex, hippocampus and the basolateral amygdala” *Society for Neuroscience (SFN) Meeting*, 3-7 November, 2018, San Diego (poszter)

[C15] K. Kenesei, M. Ledri, B. Tóth, B. Dudok, B. Barti, **V. Miczán**, G. Horvai, I. Katona „Differential contribution of diacylglycerol lipase-alpha to phasic and tonic endocannabinoid signaling at hippocampal GABAergic synapses” *Society for Neuroscience (SFN) Meeting*, 12-16 November, 2016, San Diego (poszter)

[C16] K. Kenesei, M. Ledri, B. Barti, B. Tóth, B. Dudok, **V. Miczán**, G. Horvai, J. Szabadics, I. Katona „Persistent cannabinoid control of GABA release does not require diacylglycerol lipase-alpha, the synaptic endocannabinoid-synthesizing enzyme” *Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Regional Meeting*, 20-23. September 2017, Pécs (poszter)

[C17] K. Kenesei, B. Barti, M. Ledri, M. Kisfali, B. Tóth, **V. Miczán**, J. R. Glavinics, K. Kelemen, G. Horvai, I. Katona „Differential contribution of diacylglycerol lipase-alpha to phasic and tonic endocannabinoid signaling” *Cannabinoid Function in the CNS Gordon Research Conference (GRC)* 21-26 July 2019, Castelldefells (poszter)

8 Irodalomjegyzék

- [1] D. Usoskin, A. Furlan, S. Islam, H. Abdo, P. Lönnerberg, D. Lou, J. Hjerling-Leffler, J. Haeggström, O. Kharchenko, P. V. Kharchenko, S. Linnarsson, and P. Ernfors, “Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing,” *Nat. Neurosci.*, vol. 18, no. 1, pp. 145–153, 2015.
- [2] A. Zeisel, A. B. M̂oz-Manchado, S. Codeluppi, P. Lönnerberg, G. La Manno, A. Juréus, S. Marques, H. Munguba, L. He, C. Betsholtz, C. Rolny, G. Castelo-Branco, J. Hjerling-Leffler, and S. Linnarsson, “Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq,” *Science*, vol. 347, no. 6226, pp. 1138–1142, 2015.
- [3] S. Darmanis, S. A. Sloan, Y. Zhang, M. Enge, C. Caneda, L. M. Shuer, M. G. H. Gephart, B. A. Barres, and S. R. Quake, “A survey of human brain transcriptome diversity at the single cell level,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 23, pp. 7285–7290, 2015.
- [4] T. Klausberger and P. Somogyi, “Neuronal diversity and temporal dynamics: The unity of hippocampal circuit operations,” *Science*, vol. 321, no. 5885, pp. 53–57, 2008.
- [5] N. A. O’Rourke, N. C. Weiler, K. D. Micheva, and S. J. Smith, “Deep molecular diversity of mammalian synapses: Why it matters and how to measure it,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 13, no. 6, pp. 365–379, 2012.
- [6] D. Choquet and A. Triller, “The Dynamic Synapse,” *Neuron*, vol. 80, no. 3, pp. 691–703, 2013.
- [7] A. Ludanyi, L. Eross, S. Czirjak, J. Vajda, P. Halasz, M. Watanabe, M. Palkovits, Z. Magloczky, T. F. Freund, and I. Katona, “Downregulation of the CB1 Cannabinoid Receptor and Related Molecular Elements of the Endocannabinoid System in Epileptic Human Hippocampus,” *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 12, pp. 2976–2990, 2008.
- [8] K. M. Jung, M. Sepers, C. M. Henstridge, O. Lassalle, D. Neuhofer, H. Martin, M. Ginger, A. Frick, N. V. Dipatrizio, K. MacKie, I. Katona, D. Piomelli, and O. J. Manzoni, “Uncoupling of the endocannabinoid signalling complex in a mouse model of fragile X syndrome,” *Nat. Commun.*, vol. 3, p. 11, 2012.
- [9] Z. Nusser, “A new approach to estimate the number, density and variability of receptors at central synapses,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 11, no. 3, pp. 745–752, 1999.
- [10] M. Masugi-Tokita and R. Shigemoto, “High-resolution quantitative visualization of glutamate and GABA receptors at central synapses,” *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 17, no. 3, pp. 387–393, 2007.
- [11] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess, “Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution,” *Science*, vol. 313, no. 5793, pp. 1642–

- 1645, 2006.
- [12] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, and M. D. Mason, “Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy,” *Biophys. J.*, vol. 91, no. 11, pp. 4258–4272, 2006.
- [13] M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, “Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM),” *Nat. Methods*, vol. 3, no. 10, pp. 793–795, 2006.
- [14] M. Sauer, “Localization microscopy coming of age: From concepts to biological impact,” *J. Cell Sci.*, vol. 126, no. 16, pp. 3505–3513, 2013.
- [15] J. Requejo-Isidro, “Fluorescence nanoscopy. Methods and applications,” *J. Chem. Biol.*, vol. 6, no. 3, pp. 97–120, 2013.
- [16] M. Yamanaka, N. I. Smith, and K. Fujita, “Introduction to super-resolution microscopy,” *Microscopy*, vol. 63, no. 3, pp. 177–192, 2014.
- [17] M. Maglione and S. J. Sigrist, “Seeing the forest tree by tree: Super-resolution light microscopy meets the neurosciences,” *Nat. Neurosci.*, vol. 16, no. 7, pp. 790–797, 2013.
- [18] M. G. L. Gustafsson, “Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy,” *J. Microsc.*, vol. 198, no. 2, pp. 82–87, 2000.
- [19] S. W. Hell and J. Wichmann, “Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy,” *Opt. Lett.*, vol. 19, no. 11, p. 780, 1994.
- [20] A. Oddone, I. V. Vilanova, J. Tam, and M. Lakadamyali, “Super-resolution imaging with stochastic single-molecule localization: Concepts, technical developments, and biological applications,” *Microsc. Res. Tech.*, vol. 77, no. 7, pp. 502–509, 2014.
- [21] B. Dudok, L. Barna, M. Ledri, S. I. Szabó, E. Szabadits, B. Pintér, S. G. Woodhams, C. M. Henstridge, G. Y. Balla, R. Nyilas, C. Varga, S. H. Lee, M. Matolcsi, J. Cervenak, I. Kacs Kovics, M. Watanabe, C. Sagheddu, M. Melis, M. Pistis, *et al.*, “Cell-specific STORM super-resolution imaging reveals nanoscale organization of cannabinoid signaling,” *Nat. Neurosci.*, vol. 18, no. 1, pp. 75–86, 2015.
- [22] S. H. Lee, M. Ledri, B. Tóth, I. Marchionni, C. M. Henstridge, B. Dudok, K. Kenesei, L. Barna, S. I. Szabó, T. Renkecz, M. Oberoi, M. Watanabe, C. L. Limoli, G. Horvai, I. Soltesz, and I. Katona, “Multiple forms of endocannabinoid and endovanilloid signaling regulate the tonic control of GABA release,” *J. Neurosci.*, vol. 35, no. 27, pp. 10039–10057, 2015.
- [23] T. J. Younts, H. R. Monday, B. Dudok, M. E. Klein, B. A. Jordan, I. Katona, and P. E. Castillo, “Presynaptic Protein Synthesis Is Required for Long-Term Plasticity of GABA Release,” *Neuron*, vol. 92, no. 2, pp. 479–492, 2016.

- [24] S. H. Lee, B. Dudok, V. K. Parihar, K. M. Jung, M. Zöldi, Y. J. Kang, M. Maroso, A. L. Alexander, G. A. Nelson, D. Piomelli, I. Katona, C. L. Limoli, and I. Soltesz, “Neurophysiology of space travel: energetic solar particles cause cell type-specific plasticity of neurotransmission,” *Brain Struct. Funct.*, vol. 222, no. 5, pp. 2345–2357, 2017.
- [25] A. Dani, B. Huang, J. Bergan, C. Dulac, and X. Zhuang, “Superresolution Imaging of Chemical Synapses in the Brain,” *Neuron*, vol. 68, no. 5, pp. 843–856, 2010.
- [26] L. Barna, B. Dudok, V. Miczán, A. Horváth, Z. I. László, and I. Katona, “Correlated confocal and super-resolution imaging by VividSTORM,” *Nat. Protoc.*, vol. 11, no. 1, pp. 163–183, 2016.
- [27] Z. I. László, Z. Lele, M. Zöldi, V. Miczán, F. Mógor, G. M. Simon, K. Mackie, I. Kacs Kovics, B. F. Cravatt, and I. Katona, “ABHD4-dependent developmental anoikis safeguards the embryonic brain,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–16, 2020.
- [28] M. Heilemann, S. Van De Linde, M. Schütt pelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, and M. Sauer, “Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 47, no. 33, pp. 6172–6176, 2008.
- [29] G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bates, and X. Zhuang, “Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging,” *Nat. Methods*, vol. 8, no. 12, pp. 1027–1040, 2011.
- [30] M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey, and X. Zhuang, “Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes,” *Science*, vol. 317, no. 5845, pp. 1749–1753, 2007.
- [31] M. Lakadamyali, “Super-resolution microscopy: Going live and going fast,” *ChemPhysChem*, vol. 15, no. 4, pp. 630–636, 2014.
- [32] S. A. Jones, S. H. Shim, J. He, and X. Zhuang, “Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells,” *Nat. Methods*, vol. 8, no. 6, pp. 499–505, 2011.
- [33] S.-H. Shim, H. P. Babcock, X. Zhuang, B. Huang, G. Zhong, C. Xu, J. C. Vaughan, G.-Q. Bi, X. Wang, and C. Xia, “Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 35, pp. 13978–13983, 2012.
- [34] G. Zhong, J. He, R. Zhou, D. Lorenzo, H. P. Babcock, V. Bennett, and X. Zhuang, “Developmental mechanism of the periodic membrane skeleton in axons,” *Elife*, vol. 3, pp. 1–21, 2014.
- [35] S. Van De Linde, A. Löschberger, T. Klein, M. Heidbreder, S. Wolter, M. Heilemann, and M. Sauer, “Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes,” *Nat. Protoc.*, vol. 6, no. 7, pp. 991–1009, 2011.

- [36] T. J. Gould, V. V Verkhusha, and S. T. Hess, “Imaging biological structures with fluorescence photoactivation localization microscopy,” *Nat. Protoc.*, vol. 4, no. 3, pp. 291–308, 2009.
- [37] H. D. MacGillavry and T. A. Blanpied, “Single-molecule tracking photoactivated localization microscopy to map nano-scale structure and dynamics in living spines,” *Curr. Protoc. Neurosci.*, vol. 1, no. 65, pp. 1–19, 2013.
- [38] A. Löschberger, C. Franke, G. Krohne, S. van de Linde, and M. Sauer, “Correlative super-resolution fluorescence and electron microscopy of the nuclear pore complex with molecular resolution,” *J. Cell Sci.*, vol. 127, no. 20, pp. 4351–4355, 2014.
- [39] P. Marquez-Neila, L. Baumela, and L. Alvarez, “A morphological approach to curvature-based evolution of curves and surfaces,” *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. 36, no. 1, pp. 2–17, 2014.
- [40] M. J. Bezaire and I. Soltesz, “Quantitative assessment of CA1 local circuits: Knowledge base for interneuron-pyramidal cell connectivity,” *Hippocampus*, vol. 23, no. 9, pp. 751–785, 2013.
- [41] T. F. Freund and G. Buzsáki, “Interneurons of the hippocampus,” *Hippocampus*, vol. 6, no. 4, pp. 347–470, 1998.
- [42] K. A. Pelkey, R. Chittajallu, M. T. Craig, L. Tricoire, J. C. Wester, and C. J. McBain, “Hippocampal gabaergic inhibitory interneurons,” *Physiol. Rev.*, vol. 97, no. 4, pp. 1619–1747, 2017.
- [43] D. W. Wheeler, C. M. White, C. L. Rees, A. O. Komendantov, D. J. Hamilton, and G. A. Ascoli, “Hippocampome.org: A knowledge base of neuron types in the rodent hippocampus,” *Elife*, vol. 4, no. 2015, pp. 1–28, 2015.
- [44] K. D. Harris, H. Hochgerner, N. G. Skene, L. Magno, L. Katona, C. Bengtsson Gonzales, P. Somogyi, N. Kessaris, S. Linnarsson, and J. Hjerling-Leffler, “Classes and continua of hippocampal CA1 inhibitory neurons revealed by single-cell transcriptomics,” *PLoS Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 1–37, 2018.
- [45] M. J. Berridge, “Neuronal calcium signaling,” *Neuron*, vol. 21, pp. 13–26, 1998.
- [46] M. J. Berridge, M. D. Bootman, and H. L. Roderick, “Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, no. 7, pp. 517–529, 2003.
- [47] M. J. Berridge, P. Lipp, and M. D. Bootman, “The versatility and universality of calcium signalling,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 11–21, 2000.
- [48] M. Blaustein, “Calcium transport and buffering in neurons,” *Trends Neurosci.*, vol. 11, no. 10, pp. 438–443, 1988.
- [49] A. Alpár, J. Attens, J. Mulder, T. Hökfelt, and T. Harkany, “The renaissance of Ca²⁺-binding proteins in the nervous system: Secretagoin takes center stage,” *Cell. Signal.*,

- vol. 24, no. 2, pp. 378–387, 2012.
- [50] C. Andressen, I. Blümcke, and M. R. Celio, “Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells,” *Cell Tissue Res.*, vol. 271, no. 2, pp. 181–208, 1993.
- [51] B. Schwaller, M. Meyer, and S. Schiffmann, “‘New’ functions for ‘old’ proteins: The role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice,” *Cerebellum*, vol. 1, no. 4, pp. 241–258, 2002.
- [52] S. Sugita, A. Ho, and T. C. Südhof, “NECABs: A family of neuronal Ca²⁺-binding proteins with an unusual domain structure and a restricted expression pattern,” *Neuroscience*, vol. 112, no. 1, pp. 51–63, 2002.
- [53] H. Wu, D. Li, Y. Shan, B. Wan, S. Hexige, J. Guo, C. Wu, and L. Yu, “EFCBP1/NECAB1, a brain-specifically expressed gene with highest abundance in temporal lobe, encodes a protein containing EF-hand and antibiotic biosynthesis monooxygenase domains,” *DNA Seq.*, vol. 18, no. 1, pp. 73–79, 2007.
- [54] G. Bernier, W. Vukovich, L. Neidhardt, B. G. Herrmann, and P. Gruss, “Isolation and characterization of a downstream target of Pax6 in the mammalian retinal primordium,” *Development*, vol. 128, no. 20, pp. 3987–94, 2001.
- [55] L. Canela, R. Luján, C. Lluís, J. Burgueño, J. Mallol, E. I. Canela, R. Franco, and F. Ciruela, “The neuronal Ca²⁺-binding protein 2 (NECAB2) interacts with the adenosine A_{2A} receptor and modulates the cell surface expression and function of the receptor,” *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 36, no. 1, pp. 1–12, 2007.
- [56] L. Canela, V. Fernández-Dueñas, C. Albergaria, M. Watanabe, C. Lluís, J. Mallol, E. I. Canela, R. Franco, R. Luján, and F. Ciruela, “The association of metabotropic glutamate receptor type 5 with the neuronal Ca²⁺-binding protein 2 modulates receptor function,” *J. Neurochem.*, vol. 111, no. 2, pp. 555–567, 2009.
- [57] M.-D. Zhang, S. Barde, E. Szodorai, A. Josephson, N. Mitsios, M. Watanabe, J. Attems, G. Lubec, G. G. Kovács, M. Uhlén, J. Mulder, T. Harkany, and T. Hökfelt, “Comparative anatomical distribution of neuronal calcium-binding protein (NECAB) 1 and -2 in rodent and human spinal cord,” *Brain Struct. Funct.*, vol. 221, no. 7, pp. 3803–3823, 2016.
- [58] M. D. Zhang, G. Tortoriello, B. Hsueh, R. Tomer, L. Ye, N. Mitsios, L. Borgius, G. Grant, O. Kiehn, M. Watanabe, M. Uhlén, J. Mulder, K. Deisseroth, T. Harkany, and T. G. M. Hökfelt, “Neuronal calcium-binding proteins 1/2 localize to dorsal root ganglia and excitatory spinal neurons and are regulated by nerve injury,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 12, pp. 1149–1158, 2014.
- [59] B. Zimmermann, F. Girard, Z. Mészàr, and M. R. Celio, “Expression of the calcium binding proteins Necab-1,-2 and -3 in the adult mouse hippocampus and dentate

- gyrus,” *Brain Res.*, vol. 1528, pp. 1–7, 2013.
- [60] G. Unal, A. Joshi, T. J. Viney, V. Kis, and P. Somogyi, “Synaptic targets of medial septal projections in the hippocampus and extrahippocampal cortices of the mouse,” *J. Neurosci.*, vol. 35, no. 48, pp. 15812–15826, 2015.
- [61] I. Katona and T. F. Freund, “Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease,” *Nat. Med.*, vol. 14, no. 9, pp. 923–930, 2008.
- [62] R. Nyilas, L. C. Gregg, K. MacKie, M. Watanabe, A. Zimmer, A. G. Hohmann, and I. Katona, “Molecular architecture of endocannabinoid signaling at nociceptive synapses mediating analgesia,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 29, no. 10, pp. 1964–1978, 2009.
- [63] P. Pacher, S. Bátkai, and G. Kunos, “The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy,” *Pharmacological Reviews*, vol. 58, no. 3, pp. 389–462, 2006.
- [64] N. D. Volkow, R. D. Baler, W. M. Compton, and S. R. B. Weiss, “Adverse Health Effects of Marijuana Use,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 370, no. 23, pp. 2219–2227, 2014.
- [65] SAMHSA, “Results from the 2010 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings,” 2011.
- [66] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, “Legal Topic Overviews: Possession of Cannabis for Personal Use,” 2012.
- [67] A. Alpár, V. Di Marzo, and T. Harkany, “At the tip of an iceberg: Prenatal marijuana and its possible relation to neuropsychiatric outcome in the offspring,” *Biol. Psychiatry*, vol. 79, no. 7, pp. 33–45, 2016.
- [68] Q. L. Brown, A. L. Sarvet, D. Shmulewitz, S. S. Martins, M. M. Wall, and D. S. Hasin, “Trends in marijuana use among pregnant and nonpregnant reproductive-aged women, 2002-2014,” *JAMA*, vol. 317, no. 2, pp. 207–209, 2017.
- [69] B. Dickson, C. Mansfield, M. Guiahi, A. A. Allshouse, L. M. Borgelt, J. Sheeder, R. M. Silver, and T. D. Metz, “Recommendations from cannabis dispensaries about first-trimester cannabis use,” in *Obstetrics and Gynecology*, 2018, vol. 131, no. 6, pp. 1031–1038.
- [70] N. D. Volkow, W. M. Compton, and E. M. Wargo, “The Risks of Marijuana Use During Pregnancy,” *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 317, pp. 129–130, 2017.
- [71] L. M. Jansson, C. J. Jordan, and M. L. Velez, “Perinatal marijuana use and the developing child,” *JAMA - Journal of the American Medical Association*, vol. 320, no. 6, pp. 545–546, 2018.
- [72] I. Galve-Roperh, V. Chiurchiù, J. Díaz-Alonso, M. Bari, M. Guzmán, and M. Maccarrone, “Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 633–650, 2013.
- [73] M. Maccarrone, M. Guzmán, K. MacKie, P. Doherty, and T. Harkany, “Programming

- of neural cells by (endo)cannabinoids: From physiological rules to emerging therapies,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 15, no. 12, pp. 786–801, 2014.
- [74] C. S. Wu, C. P. Jew, and H. C. Lu, “Lasting impacts of prenatal cannabis exposure and the role of endogenous cannabinoids in the developing brain,” *Future Neurol.*, vol. 6, no. 4, pp. 459–480, 2011.
- [75] C. V. Morris, J. A. Dinieri, H. Szutorisz, and Y. L. Hurd, “Molecular mechanisms of maternal cannabis and cigarette use on human neurodevelopment,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 34, no. 10, pp. 1574–1583, 2011.
- [76] A. C. Huizink, “Prenatal cannabis exposure and infant outcomes: Overview of studies,” *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, vol. 52, pp. 45–52, 2014.
- [77] N. M. De Genna, G. A. Richardson, L. Goldschmidt, N. L. Day, and M. D. Cornelius, “Prenatal exposures to tobacco and cannabis: Associations with adult electronic cigarette use,” *Drug Alcohol Depend.*, vol. 188, pp. 209–215, 2018.
- [78] J. D. Fine, A. L. Moreau, N. R. Karcher, A. Agrawal, C. E. Rogers, D. M. Barch, and R. Bogdan, “Association of Prenatal Cannabis Exposure with Psychosis Proneness among Children in the Adolescent Brain Cognitive Development (ABCD) Study,” *JAMA Psychiatry*, vol. 76, no. 7, pp. 762–764, 2019.
- [79] N. D. Volkow, J. S. Fowler, G.-J. Wang, and J. M. Swanson, “Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications,” *Mol. Psychiatry*, vol. 9, pp. 557–569, 2004.
- [80] A. A. Grace, “Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression,” *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 17, no. 8, pp. 524–532, 2016.
- [81] M. A. P. Bloomfield, A. H. Ashok, N. D. Volkow, and O. D. Howes, “The effects of δ 9-tetrahydrocannabinol on the dopamine system,” *Nature*, vol. 539, no. 7629, pp. 369–377, 2016.
- [82] J. Bourque, M. H. Afzali, and P. J. Conrod, “Association of cannabis use with adolescent psychotic symptoms,” *JAMA Psychiatry*, vol. 75, no. 8, pp. 864–866, 2018.
- [83] M. Di Forti, D. Quattrone, T. P. Freeman, G. Tripoli, C. Gayer-Anderson, H. Quigley, V. Rodriguez, H. E. Jongasma, L. Ferraro, C. La Cascia, D. La Barbera, I. Tarricone, D. Berardi, A. Szöke, C. Arango, A. Tortelli, E. Velthorst, M. M. Bernardo, C. M. Del-Ben, *et al.*, “The contribution of cannabis use to variation in the incidence of psychotic disorder across Europe (EU-GEI): a multicentre case-control study,” *The Lancet Psychiatry*, vol. 6, no. 5, pp. 427–436, 2019.
- [84] J. W. Buckholtz, M. T. Treadway, R. L. Cowan, N. D. Woodward, S. D. Benning, R. Li, M. S. Ansari, R. M. Baldwin, A. N. Schwartzman, E. S. Shelby, C. E. Smith, D. Cole, R. M. Kessler, and D. H. Zald, “Mesolimbic dopamine reward system

- hypersensitivity in individuals with psychopathic traits,” *Nat. Neurosci.*, vol. 13, no. 4, pp. 419–421, 2010.
- [85] D. H. Geschwind and J. Flint, “Genetics and genomics of psychiatric disease,” *Science*, vol. 349, no. 6255, pp. 1489–1494, 2015.
- [86] T. R. Insel, “Rethinking schizophrenia,” *Nature*, vol. 468, no. 7321, pp. 187–193, 2010.
- [87] A. L. Heffernan and D. J. Hare, “Tracing Environmental Exposure from Neurodevelopment to Neurodegeneration,” *Trends in Neurosciences*, vol. 41, no. 8, pp. 496–501, 2018.
- [88] K. A. Richardson, A. K. Hester, and G. L. McLemore, “Prenatal cannabis exposure - The ‘first hit’ to the endocannabinoid system,” *Neurotoxicology and Teratology*, vol. 58, pp. 5–14, 2016.
- [89] K. C. Young-Wolff, L. Y. Tucker, S. Alexeeff, M. A. Armstrong, A. Conway, C. Weisner, and N. Goler, “Trends in self-reported and biochemically tested Marijuana use among pregnant females in California from 2009-2016,” *JAMA*, vol. 318, no. 24, pp. 2490–2491, 2017.
- [90] M. Ashburner, C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin, *et al.*, “Gene ontology: Tool for the unification of biology,” *Nat. Genet.*, vol. 25, no. 1, pp. 25–29, 2000.
- [91] S. Carbon, H. Dietze, S. E. Lewis, C. J. Mungall, M. C. Munoz-Torres, S. Basu, R. L. Chisholm, R. J. Dodson, P. Fey, P. D. Thomas, H. Mi, A. Muruganujan, X. Huang, S. Poudel, J. C. Hu, S. A. Aleksander, B. K. McIntosh, D. P. Renfro, D. A. Siegele, *et al.*, “Expansion of the gene ontology knowledgebase and resources: The gene ontology consortium,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. D1, pp. D331–D338, 2017.
- [92] S. Carbon, A. Ireland, C. J. Mungall, S. Shu, B. Marshall, S. Lewis, J. Lomax, C. Mungall, B. Hitz, R. Balakrishnan, M. Dolan, V. Wood, E. Hong, and P. Gaudet, “AmiGO: Online access to ontology and annotation data,” *Bioinformatics*, vol. 25, no. 2, pp. 288–289, 2009.
- [93] A. Neu, C. Földy, and I. Soltesz, “Postsynaptic origin of CB1-dependent tonic inhibition of GABA release at cholecystokinin-positive basket cell to pyramidal cell synapses in the CA1 region of the rat hippocampus,” *J. Physiol.*, vol. 578, no. 1, pp. 233–247, 2007.
- [94] Y. Fukudome, T. Ohno-Shosaku, M. Matsui, Y. Omori, M. Fukaya, H. Tsubokawa, M. M. Taketo, M. Watanabe, T. Manabe, and M. Kano, “Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct

- suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 19, no. 10, pp. 2682–2692, 2004.
- [95] B. Huang, W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang, “Three-Dimensional Super-Resolution Reconstruction Microscopy,” *Science*, vol. 319, pp. 810–813, 2008.
- [96] H. Babcock, Y. M. Sigal, and X. Zhuang, “A high-density 3D localization algorithm for stochastic optical reconstruction microscopy,” *Opt. Nanoscopy*, vol. 1, no. 1, pp. 1–10, 2012.
- [97] S. J. Holden, S. Uphoff, and A. N. Kapanidis, “DAOSTORM: An algorithm for high-density super-resolution microscopy,” *Nat. Methods*, vol. 8, no. 4, pp. 279–280, 2011.
- [98] A. Baddeley and R. Turner, “Spatstat: an R package for analyzing spatial point patterns,” *J. Stat. Softw.*, vol. 12, no. 6, pp. 1–42, 2005.
- [99] R. Frau, M. Orrù, M. Puligheddu, G. L. Gessa, G. Mereu, F. Marrosu, and M. Bortolato, “Sleep deprivation disrupts prepulse inhibition of the startle reflex: Reversal by antipsychotic drugs,” *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, vol. 11, no. 7, pp. 947–955, 2008.
- [100] G. Paxinos and C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th ed. San Diego, CA: Academic Press, 2007.
- [101] P. Devoto, G. Flore, G. Longu, L. Pira, and G. L. Gessa, “Origin of extracellular dopamine from dopamine and noradrenaline neurons in the medial prefrontal and occipital cortex,” *Synapse*, vol. 50, no. 3, pp. 200–205, 2003.
- [102] M. Melis, C. Sagheddu, M. De Felice, A. Casti, C. Madeddu, S. Spiga, A. L. Muntoni, K. Mackie, G. Marsicano, G. Colombo, M. P. Castelli, and M. Pistis, “Enhanced endocannabinoid-mediated modulation of rostromedial tegmental nucleus drive onto dopamine neurons in sardinian alcohol-preferring rats,” *J. Neurosci.*, vol. 34, no. 38, pp. 12716–12724, 2014.
- [103] S. W. Johnson and R. A. North, “Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs,” *J. Physiol.*, vol. 450, no. 1, pp. 455–468, 1992.
- [104] M. Melis, S. Scheggi, G. Carta, C. Madeddu, S. Lecca, A. Luchicchi, F. Cadeddu, R. Frau, L. Fattore, P. Fadda, M. Grazia Ennas, M. Paola Castelli, W. Fratta, B. Schilstrom, S. Banni, M. Graziella de Montis, and M. Pistis, “PPAR α regulates cholinergic-driven activity of midbrain dopamine neurons via a novel mechanism involving $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors,” *J. Neurosci.*, vol. 33, no. 14, pp. 6203–6211, 2013.
- [105] M. S. Cembrowski, J. L. Bachman, L. Wang, K. Sugino, B. C. Shields, and N. Spruston, “Spatial Gene-Expression Gradients Underlie Prominent Heterogeneity of CA1 Pyramidal Neurons,” *Neuron*, vol. 89, no. 2, pp. 351–368, 2016.
- [106] J. R. Ecker, D. H. Geschwind, A. R. Kriegstein, J. Ngai, P. Osten, D. Polioudakis, A.

- Regev, N. Sestan, I. R. Wickersham, and H. Zeng, “The BRAIN Initiative Cell Census Consortium: Lessons Learned toward Generating a Comprehensive Brain Cell Atlas,” *Neuron*, vol. 96, no. 3, pp. 542–557, 2017.
- [107] N. Habib, Y. Li, M. Heidenreich, L. Swiech, I. Avraham-Davidi, J. J. Trombetta, C. Hession, F. Zhang, and A. Regev, “Div-Seq: Single-nucleus RNA-Seq reveals dynamics of rare adult newborn neurons,” *Science*, vol. 353, no. 6302, pp. 925–928, 2016.
- [108] E. Z. Macosko, A. Basu, R. Satija, J. Nemesh, K. Shekhar, M. Goldman, I. Tirosh, A. R. Bialas, N. Kamitaki, E. M. Martersteck, J. J. Trombetta, D. A. Weitz, J. R. Sanes, A. K. Shalek, A. Regev, and S. A. McCarroll, “Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets,” *Cell*, vol. 161, no. 5, pp. 1202–1214, 2015.
- [109] A. Paul, M. Crow, R. Raudales, M. He, J. Gillis, and Z. J. Huang, “Transcriptional Architecture of Synaptic Communication Delineates GABAergic Neuron Identity,” *Cell*, vol. 171, no. 3, pp. 522–539.e20, 2017.
- [110] B. Tasic, V. Menon, T. N. Nguyen, T. K. Kim, T. Jarsky, Z. Yao, B. Levi, L. T. Gray, S. A. Sorensen, T. Dolbeare, D. Bertagnolli, J. Goldy, N. Shapovalova, S. Parry, C. Lee, K. Smith, A. Bernard, L. Madisen, S. M. Sunkin, *et al.*, “Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics,” *Nat. Neurosci.*, vol. 19, no. 2, pp. 335–346, 2016.
- [111] A. Zeisel, H. Hochgerner, P. Lönnerberg, A. Johnsson, F. Memic, J. van der Zwan, M. Häring, E. Braun, L. E. Borm, G. La Manno, S. Codeluppi, A. Furlan, K. Lee, N. Skene, K. D. Harris, J. Hjerling-Leffler, E. Arenas, P. Ernfors, U. Marklund, *et al.*, “Molecular Architecture of the Mouse Nervous System,” *Cell*, vol. 174, no. 4, pp. 999–1014.e22, 2018.
- [112] A. I. Gulyás, K. Tóth, P. Dános, and T. F. Freund, “Subpopulations of GABAergic neurons containing parvalbumin, calbindin D28k, and cholecystokinin in the rat hippocampus,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 312, no. 3, pp. 371–378, 1991.
- [113] P. Fuentealba, T. Klausberger, T. Karayannis, W. Y. Suen, J. Huck, R. Tomioka, K. Rockland, M. Capogna, M. Studer, M. Morales, and P. Somogyi, “Expression of COUP-TFII nuclear receptor in restricted gabaergic neuronal populations in the adult rat hippocampus,” *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 5, pp. 1595–1609, 2010.
- [114] J. Somogyi, A. Baude, Y. Omori, H. Shimizu, S. El Mestikawy, M. Fukaya, R. Shigemoto, M. Watanabe, and P. Somogyi, “GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 19, no. 3, pp. 552–569, 2004.

- [115] F. Wang, J. Flanagan, N. Su, L. C. Wang, S. Bui, A. Nielson, X. Wu, H. T. Vo, X. J. Ma, and Y. Luo, “RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues,” *J. Mol. Diagnostics*, vol. 14, no. 1, pp. 22–29, 2012.
- [116] I. Katona, B. Sperlagh, A. Sık, A. Kafalvi, E. S. Vizi, K. Mackie, and T. F. Freund, “Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons,” *J. Neurosci.*, vol. 19, no. 11, pp. 4544–4558, 1999.
- [117] G. Marsicano and B. Lutz, “Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 11, no. 12, pp. 4213–4225, 1999.
- [118] K. Tsou, K. Mackie, M. C. Sanudo-Pena, and J. M. Walker, “Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation,” *Neuroscience*, vol. 93, no. 3, pp. 969–975, 1999.
- [119] S. H. Lee, C. Foldy, and I. Soltesz, “Distinct endocannabinoid control of GABA release at perisomatic and dendritic synapses in the hippocampus,” *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 23, pp. 7993–8000, 2010.
- [120] J. L. Wiley, M. M. O’Connell, M. E. Tokarz, and M. J. Wright, “Pharmacological effects of acute and repeated administration of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in adolescent and adult rats,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 320, no. 3, pp. 1097–1105, 2007.
- [121] M. A. ElSohly, Z. Mehmedic, S. Foster, C. Gon, S. Chandra, and J. C. Church, “Changes in cannabis potency over the last 2 decades (1995-2014): Analysis of current data in the United States,” *Biol. Psychiatry*, vol. 79, no. 7, pp. 613–619, 2016.
- [122] R. Frau, V. Miczan, F. Traccis, S. Aroni, C. I. Pongor, P. Saba, V. Serra, C. Sagheddu, S. Fanni, M. Congiu, P. Devoto, J. F. Cheer, I. Katona, and M. Melis, “Prenatal THC exposure produces a hyperdopaminergic phenotype rescued by pregnenolone,” *Nat. Neurosci.*, vol. 22, no. 12, pp. 1975–1985, 2019.
- [123] D. M. Lovinger, “Presynaptic modulation by endocannabinoids,” *Handb. Exp. Pharmacol.*, vol. 184, pp. 435–477, 2008.
- [124] F. Matyas, G. M. Urban, M. Watanabe, K. Mackie, A. Zimmer, T. F. Freund, and I. Katona, “Identification of the sites of 2-arachidonoylglycerol synthesis and action imply retrograde endocannabinoid signaling at both GABAergic and glutamatergic synapses in the ventral tegmental area,” *Neuropharmacology*, vol. 54, no. 1, pp. 95–107, 2008.
- [125] O. O. Glebov, R. E. Jackson, C. M. Winterflood, D. M. Owen, E. A. Barker, P. Doherty, H. Ewers, and J. Burrone, “Nanoscale Structural Plasticity of the Active Zone Matrix Modulates Presynaptic Function,” *Cell Rep.*, vol. 18, no. 11, pp. 2715–2728,

2017.

- [126] O. Caillard, H. Moreno, B. Schwaller, I. Llano, M. R. Celio, and A. Marty, “Role of the calcium-binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 24, pp. 13372–13377, 2000.
- [127] P. S. Chard, D. Bleakman, S. Christakos, C. S. Fullmer, and R. J. Miller, “Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurones,” *J. Physiol.*, vol. 472, no. 1, pp. 341–357, 1993.
- [128] S. H. Lee, B. Schwaller, and E. Neher, “Kinetics of Ca²⁺ binding to parvalbumin in bovine chromaffin cells: Implications for [Ca²⁺] transients of neuronal dendrites,” *J. Physiol.*, vol. 525, no. 2, pp. 419–432, 2000.
- [129] E. Eggermann and P. Jonas, “How the ‘slow’ Ca²⁺ buffer parvalbumin affects transmitter release in nanodomain-coupling regimes,” *Nat. Neurosci.*, vol. 15, no. 1, pp. 20–22, 2012.
- [130] B. Schwaller, “The continuing disappearance of ‘pure’ Ca²⁺-buffers,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, no. 2, pp. 275–300, 2009.
- [131] I. Bezprozvanny, “Calcium signaling and neurodegenerative diseases,” *Trends Mol. Med.*, vol. 15, no. 3, pp. 89–100, 2009.
- [132] C. W. Heizmann and K. Braun, “Changes in Ca²⁺-binding proteins in human neurodegenerative disorders,” *Trends Neurosci.*, vol. 15, no. 7, pp. 259–264, 1992.
- [133] S. A. Kornilov, N. Rakhlin, R. Kuposov, M. Lee, C. Yrigollen, A. O. Caglayan, J. S. Magnuson, S. Mane, J. T. Chang, and E. L. Grigorenko, “Genome-wide association and exome sequencing study of language disorder in an isolated population,” *Pediatrics*, vol. 137, no. 4, pp. 20152469–20152469, 2016.
- [134] D. C. Schöndorf, M. Aureli, F. E. McAllister, C. J. Hindley, F. Mayer, B. Schmid, S. P. Sardi, M. Valsecchi, S. Hoffmann, L. K. Schwarz, U. Hedrich, D. Berg, L. S. Shihabuddin, J. Hu, J. Pruszk, S. P. Gygi, S. Sonnino, T. Gasser, and M. Deleidi, “IPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson’s disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis,” *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 4028, 2014.
- [135] Y. Sakai, C. A. Shaw, B. C. Dawson, D. V. Dugas, Z. Al-Mohtaseb, D. E. Hill, and H. Y. Zoghbi, “Protein interactome reveals converging molecular pathways among autism disorders,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 3, no. 86, p. 49, 2011.
- [136] M. D. Zhang, J. Su, C. Adori, V. Cinquina, K. Malenczyk, F. Girach, C. Peng, P. Ernfors, P. Löw, L. Borgius, O. Kiehn, M. Watanabe, M. Uhlén, N. Mitsios, J. Mulder, T. Harkany, and T. Hökfelt, “Ca²⁺-binding protein NECAB2 facilitates inflammatory pain hypersensitivity,” *J. Clin. Invest.*, vol. 128, no. 9, pp. 3757–3768, 2018.
- [137] L. Hayardeny, A. Achiron, and M. Gurevich, “Gene expression biomarkers of

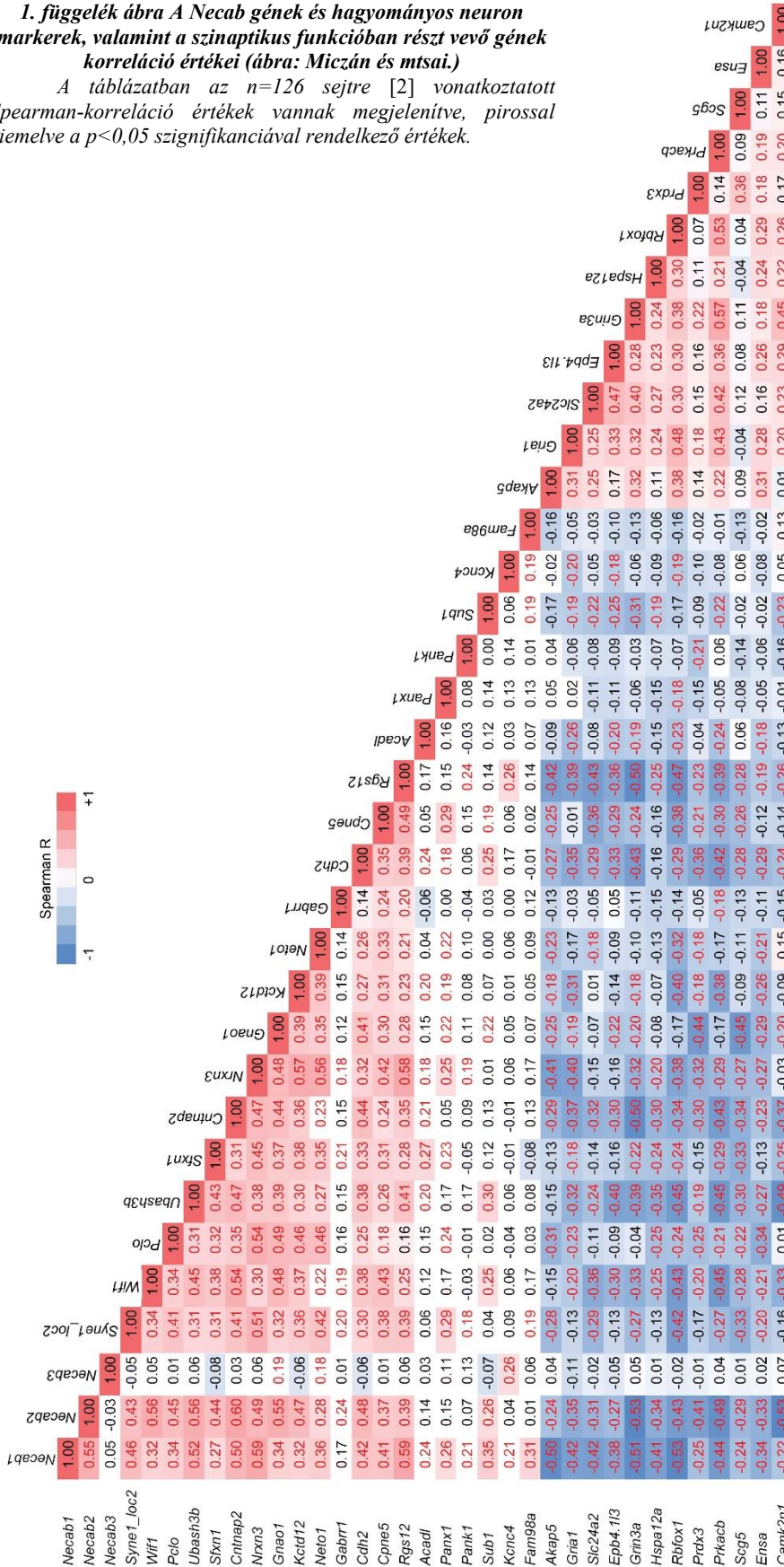
- laquinimod responsiveness,” WO2015038963A1, 2012.
- [138] J. Lim, R. Shoemaker, L. Bookbinder, and D. Anderson, “Diagnosis of rheumatoid arthritis (ra) using differentially methylated loci identified in peripheral blood mononuclear cells, t-cells, b-cells monocytes,” WO20140363142A2, 2012.
- [139] S. Lammel, D. I. Ion, J. Roeper, and R. C. Malenka, “Projection-Specific Modulation of Dopamine Neuron Synapses by Aversive and Rewarding Stimuli,” *Neuron*, vol. 70, no. 5, pp. 855–862, 2011.
- [140] T. Yamaguchi, W. Sheen, and M. Morales, “Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 25, no. 1, pp. 106–118, 2007.
- [141] B. Chieng, Y. Azriel, S. Mohammadi, and M. J. Christie, “Distinct cellular properties of identified dopaminergic and GABAergic neurons in the mouse ventral tegmental area,” *J. Physiol.*, vol. 589, no. 15, pp. 3775–3787, 2011.
- [142] R. Malinow and R. W. Tsien, “Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices,” *Nature*, vol. 346, no. 6280, pp. 177–180, 1990.
- [143] B. G. Wilhelm, S. Mandad, S. Truckenbrodt, K. Kröhnert, C. Schäfer, B. Rammner, S. J. Koo, G. A. Claßen, M. Krauss, V. Haucke, H. Urlaub, and S. O. Rizzoli, “Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins,” *Science*, vol. 344, no. 6187, pp. 1023–1028, 2014.
- [144] C. Bellone, M. Mameli, and C. Lüscher, “In utero exposure to cocaine delays postnatal synaptic maturation of glutamatergic transmission in the VTA,” *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 11, pp. 1439–1446, 2011.
- [145] K. Hausknecht, S. Haj-Dahmane, Y. L. Shen, P. Vezina, C. Dlugos, and R. Y. Shen, “Excitatory synaptic function and plasticity is persistently altered in ventral tegmental area dopamine neurons after prenatal ethanol exposure,” *Neuropsychopharmacology*, vol. 40, no. 4, pp. 893–905, 2015.
- [146] M. J. Thomas, R. C. Malenka, and A. Bonci, “Modulation of long-term depression by dopamine in the mesolimbic system,” *J. Neurosci.*, vol. 20, no. 15, pp. 5581–5586, 2000.
- [147] P. D. McGorry, I. B. Hickie, A. R. Yung, C. Pantelis, and H. J. Jackson, “Clinical staging of psychiatric disorders: A heuristic framework for choosing earlier, safer and more effective interventions,” *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, vol. 40, no. 8, pp. 616–622, 2006.
- [148] M. Sherif, R. Radhakrishnan, D. C. D’Souza, and M. Ranganathan, “Human laboratory studies on cannabinoids and psychosis,” *Biological Psychiatry*, vol. 79, no. 7, pp. 526–538, 2016.
- [149] D. L. Braff, N. R. Swerdlow, and M. A. Geyer, “Gating and habituation deficits in the

- schizophrenia disorders,” *Clin. Neurosci.*, vol. 3, no. 2, pp. 131–9, 1995.
- [150] O. Marín, “Developmental timing and critical windows for the treatment of psychiatric disorders,” *Nat. Med.*, vol. 22, no. 11, pp. 1229–1238, 2016.
- [151] P. Wong, Y. Sze, C. C. R. Chang, J. Lee, and X. Zhang, “Pregnenolone sulfate normalizes schizophrenia-like behaviors in dopamine transporter knockout mice through the AKT/GSK3 β pathway,” *Transl. Psychiatry*, vol. 5, no. 3, p. 528, 2015.
- [152] M. Vallée, S. Vitiello, L. Bellocchio, E. Hébert-Chatelain, S. Monlezun, E. Martin-Garcia, F. Kasanetz, G. L. Baillie, F. Panin, A. Cathala, V. Roullot-Lacarrière, S. Fabre, D. P. Hurst, D. L. Lynch, D. M. Shore, V. Deroche-Gamonet, U. Spampinato, J. M. Revest, R. Maldonado, *et al.*, “Pregnenolone can protect the brain from cannabis intoxication,” *Science*, vol. 343, no. 6166, pp. 94–98, 2014.
- [153] X. Wang, D. Dow-Edwards, V. Anderson, H. Minkoff, and Y. L. Hurd, “In utero marijuana exposure associated with abnormal amygdala dopamine D2 gene expression in the human fetus,” *Biol. Psychiatry*, vol. 56, no. 12, pp. 909–915, 2004.
- [154] J. A. Dinieri, X. Wang, H. Szutorisz, S. M. Spano, J. Kaur, P. Casaccia, D. Dow-Edwards, and Y. L. Hurd, “Maternal cannabis use alters ventral striatal dopamine D2 gene regulation in the offspring,” *Biol. Psychiatry*, vol. 70, no. 8, pp. 763–769, 2011.
- [155] R. Kuepper, J. Ceccarini, J. Lataster, J. van Os, M. van Kroonenburgh, J. M. A. van Gerven, M. Marcelis, K. van Laere, and C. Henquet, “Delta-9-Tetrahydrocannabinol-Induced Dopamine Release as a Function of Psychosis Risk: 18F-Fallypride Positron Emission Tomography Study,” *PLoS One*, vol. 8, no. 7, p. 70378, 2013.
- [156] J. McGrath, J. Welham, J. Scott, D. Varghese, L. Degenhardt, M. R. Hayatbakhsh, R. Alati, G. M. Williams, W. Bor, and J. M. Najman, “Association between cannabis use and psychosis-related outcomes using sibling pair analysis in a cohort of young adults,” *Arch. Gen. Psychiatry*, vol. 67, no. 5, pp. 440–447, 2010.
- [157] M. T. Compton, M. E. Kelley, C. E. Ramsay, M. Pringle, S. M. Goulding, M. L. Esterberg, T. Stewart, and E. F. Walker, “Association of pre-onset cannabis, alcohol, and tobacco use with age at onset of prodrome and age at onset of psychosis in first-episode patients,” *Am. J. Psychiatry*, vol. 166, no. 11, pp. 1251–1257, 2009.

9 Függelék

1. függelék ábra A Necab gének és hagyományos neuron markerek, valamint a szinaptikus funkcióban részt vevő gének korreláció értékei (ábra: Miczán és mtsai.)

A táblázatban az n=126 sejtre [2] vonatkoztatott Spearman-korreláció értékek vannak megjelenítve, pirossal kiemelve a $p < 0,05$ szignifikanciával rendelkező értékek.



10 Rövidítésjegyzék

Rövidítés	Angol/latin elnevezés	Magyar elnevezés
2-AG	2-Arachidonoylglycerol	2-arachidonoil-glicerol
ACSF	Artificial Cerebrospinal Fluid	mesterséges agy-gerincvelői folyadék
AHP	Afterhyperpolarization	hiperpolarizáció utáni
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav
AP	Action Potential	akciós potenciál
AMPT	Alpha-methyl-para-tyrosine	alfa-metil-para-tirozin
AP-5	2-amino-5-phosphonovaleric acid	2-amino-5-foszfopentánsav
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid	1,2-bis(o-aminofenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraacetsav
BDI	Bouton Distribution Index	bouton (axonterminális) eloszlás index
BLA	Basolateral Amygdala	bazolaterális amygdala
BSA	Bovine Serum Albumin	szarvasmarha szérum albumin
CA	Cornu Ammonis	Ammon-szarv, a hippokampusz része
CaBP	Calcium Binding Protein	kalciumkötő fehérje
CADP2	Calcium-Dependent Secretion Activator 2	kalciumfüggő szekréció aktiváló 2
CALB1	Calbindin	calbindin
CALB2	Calretinin	calretinin
CALM	Calmodulin	calmodulin
CBD	Cannabidiol	kannabidiol
CB1	Cannabinoid Receptor Type-1	1-es típusú kannabinoid receptor
CCK	Cholecystokinin	kolecisztokinin
CMLE	Classical Maximum Likelihood Estimation	klasszikus maximum likelihood becslés
CDH2	Cadherin-2	cadherin-2
CNTNAP2	Contactin-associated protein-like 2	Contactin-asszociált fehérje szerű 2
CNR1	Cannabinoid Receptor 1	Cannabinoid receptor 1 génje
CPNE5	Copine 5	copine 5
CPu	Caudate/Putamen	farkasmag/putamen
CTRL	control	kontroll
CV	Coefficient of Variation	variációs együttható
DAG	Diacylglycerol	diacilglicerol
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole	4,6-diamino-2-fenilindol
DG	Dentate Gyrus	gyrus dentatus, "fogazott agytekervény"
DGL-α	Diacylglycerol Lipase- α	diacilglicerol-lipáz- α
DIC	Differential Interference Contrast	differenciál interferencia kontraszt
EGTA	ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid	etilén-glikol-bisz(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacetsav
EM	Electron Microscopy	elektronmikroszkópia
EMCCD	Electron Multiplying Charge Coupled Device	elektronsokszorozó töltés-csatolt eszköz

EPSC	Excitatory Postsynaptic Current	serkentő posztszinaptikus áram
EPSP	Excitatory Postsynaptic Potential	serkentő posztszinaptikus potenciál
FDA	Food and Drug Administration	Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatal
GABA	Gamma-Aminobutyric Acid	gamma-aminovajsav
GD	Gestation Day	gesztációs nap
GO	Gene Ontology	gén ontológia
HC	Hippocampus	hippokampusz
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid	2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-etánszulfonsav
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
IF	Immunfluorescence	fluoreszcens immunfestés
IN	Interneuron	interneuron
IP3	Inositol Trisphosphate	inozitol-triszfoszfát
IPSC	Inhibitory Postsynaptic Current	gátló posztszinaptikus áram
IPSP	Inhibitory Postsynaptic Potential	gátló posztszinaptikus potenciál
ISH	In situ hybridization	in situ hibridizáció
KCTD12	Potassium channel tetramerization domain containing 12	káliumcsatorna tetramerizáló domén tartalmazó fehérje 12
LTD	Long-term Depression	hosszútávú depresszió
LTP	Long-term Potentiation	hosszútávú potenciáció
LFS	Low Frequency Stimulation	alacsony frekvenciás stimuláció
LSD	Least Significant Difference	legkisebb szignifikáns differencia
MACWE	Morphological Active Contours Without Edges	élmentes morfológiai aktív kontúrok
MGL	Monoacylglycerol Lipase	monoacilglicerol-lipáz
mGluR5	Metabotropic Glutamate Receptor 5	metabotrop glutamát receptor 5
MIP	Maximal Intensity Projection	maximális intenzitás projekció
mRNS	messenger Ribonucleic Acid	hírvivő ribonukleinsav
NAcC	Nucleus Accumbens Core	nucleus accumbens core
NAcS	Nucleus Accumbens Shell	nucleus accumbens shell
NECAB1	N-terminal EF-hand Calcium Binding Protein 1	N-terminális EF-kéz kalciumkötő fehérje 1
NECAB2	N-terminal EF-hand Calcium Binding Protein 2	N-terminális EF-kéz kalciumkötő fehérje 2
NETO1	Neuropilin and tolloid-like 1	Neuropillin és tolloid-szerű fehérje 1
NDS	Normal Donkey Serum	normál szamár szérum
NLP	Number of Localization Points	lokalizációs pontok száma
NMDA	N-methyl-D-aspartate	N-metil-D-aszpartát
Nr2f2	Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F member 2 (COUP-TFII gene)	magi receptor alcsalád 2, F csoport, 2-es tagja (a COUP-TFII génje)
NRX3	Neurexin-3-alpha	Neurexin-3-alfa
OCT	Optimal Cutting Temperature	optimális vágási hőmérséklet
O-LM	Oriens-Lacunosum Moleculare	a stratum oriens/ lacunosum

		molecularéban (elhelyezkedő IN)
PALM	Photoactivated Localization Microscopy	fotoaktivációs lokalizációs mikroszkópia
PB	Phosphate Buffer	foszfát puffer
PCE	Prenatal Cannabis Exposure	prenatális kannabisz kezelés
PCLO	Piccolo	piccolo
PFA	Paraformaldehyde	paraformaldehid
PFS	Perfect Focus System	fókuszstabilizáló rendszer
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
PLC-β	Phospholipase C-β	foszfolipáz C-β
PPI	Pre-Pulse Inhibition	prepulzus gátlás
PREG	Pregnenolone	pregnenolon
PSD	Postsynaptic Density	posztzinaptikus denzitás
PSF	Point Spread Function	pontválasz függvény
PVALB	Parvalbumin	parvalbumin
RM-ANOVA	Repeated Measures Analysis of Variance	ismételt mérésees varianciaanalízis
ROI	Region Of Interest	kiválasztott terület
s.c.	subcutaneous	szubkután
SCGN	Secretagoin	secretagoin
SIM	Structured Illumination Microscopy	strukturált megvilágítás mikroszkópia
Slc17a8	solute carrier family 17 member 8 (the vGluT3 gene)	a vGluT3 fehérje génje
SMLM	Single Molecule Localization Microscopy	egyedi molekula lokalizációs mikroszkópia
SS-CTX	Somatosensory Cortex	szomatoszenzoros kéreg
STED	Stimulated Emission Depletion Microscopy	stimulált emisszió depléción mikroszkópia
STORM	STochastic Optical Reconstruction Microscopy	sztochasztikus optikai rekonstrukción mikroszkópia
SYT6	Synaptotagmin 6	synaptotagmin 6
TBS	Tris-buffered Saline	Tris puffer fiziológiás sóval
TEA	Tetraethylammonium chloride	tetraetil-ammónium-klorid
TH	Tyrosin-Hydroxylase	tirozin-hidroxiláz
THC	Delta-9-Tetrahydrocannabinol	delta-9-tetrahidrokannabinol
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence	teljes belső visszaverődés fluoreszcencia
TTX	Tetrodotoxin	tetrodotoxin
VEH	Vehicle	hordozó anyag
VGLuT1	Vesicular Glutamate Transporter 1	vezikuláris glutamát transzporter 1
VGLuT3	Vesicular Glutamate Transporter 3	vezikuláris glutamát transzporter 3
VIAAT	Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter	vezikuláris gátló aminosav transzporter
VTA	Ventral Tegmental Area	ventrális tegmentális terület
WIN	WIN 55,212-2	WIN 55,212-2