

# **Neuroimmunológiai interakciók proteomikai vizsgálata**

**Doktori (Ph.D.) értekezés**

**Györffy Balázs András**

**Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,  
Biológia Doktori Iskola, Molekuláris, sejt- és neurobiológia  
doktori program**

**A doktori iskola vezetője: Dr. Erdei Anna**

**A doktori program vezetője: Dr. Juhász Gábor**

**Témavezető: Dr. Kékesi Adrienna Katalin, egyetemi docens**



**Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,  
Biológiai Intézet, Proteomikai Laboratórium és MTA-ELTE NAP  
B Neuroimmunológiai Kutatócsoport**

**Budapest**

**2017**

# Tartalomjegyzék

<b>Rövidítésjegyzék.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Bevezetés .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés.....</b>	<b>8</b>
2.1. A neuroimmunológiai kölcsönhatások általános jellemzése.....	8
2.1.1. A központi idegrendszer és az immunrendszer kapcsolatának korai vizsgálata és mai felfogásunk az elszigetelt központi idegrendszerről .....	8
2.1.2. A központi idegrendszer és az immunrendszer kapcsolódási pontjai és a köztük zajló kommunikáció.....	11
2.2. A korai egyedfejlődés során jelentkező immunaktiváció és pszichiátriai betegségek kialakulása .....	19
2.3. A felnőttkori perifériás immunaktiváció epileptogenezist fokozó hatása .....	27
2.3.1. Az epilepszia jellemzése és kialakulásának neuroimmunológiai vonatkozásai .....	27
2.3.2. Az abszensz epilepszia jellemzőinek és állatmodelljeinek bemutatása .....	33
2.4. Az immunrendszer elemeinek fiziológiás és kóros szerepe a központi idegrendszerben – a komplementrendszer és a szinapszisok eltávolítása.....	37
2.4.1. A komplementrendszer elemeinek rövid bemutatása.....	37
2.4.2. A komplementrendszer szerepe a szinapszisok eltávolításában .....	39
<b>3. Célkitűzések.....</b>	<b>44</b>
3.1. A prenatális immunaktiváció rövid és hosszú távú proteomikai hatásának vizsgálata .....	44
3.2. A felnőttkori immunaktiváció hatásának proteomikai vizsgálata – a gyulladás epileptogenezist fokozó hatásának molekuláris háttere .....	45
3.3. Egy fiziológiás neuroimmunológiai interakció bemutatása: a komplementrendszer szinapszisok eltávolításában játszott, felnőttkori szerepének proteomikai vizsgálata .....	45
<b>4. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>46</b>
4.1. A felhasznált anyagok .....	46
4.2. A kísérletekhez felhasznált állatok és kezelésük .....	46
4.2.1. A felhasznált patkányok és kezelésük az 1. vizsgálatban .....	47
4.2.2. A felhasznált patkányok és kezelésük a 2. vizsgálatban .....	48
4.2.3. A felhasznált egerek és kezelésük a 3. vizsgálatban .....	48
4.3. Humán agyminták felhasználása.....	48
4.4. A teljes szöveti minták feldolgozása és szubcelluláris frakcionálási eljárások .....	49
4.4.1. A teljes agyszöveti minták feldolgozása.....	49
4.4.2. A szinaptoszóma frakció preparálása.....	49
4.4.3. Pre- és posztzinaptikus membrán frakciók preparálása.....	50
4.5. Elektronmikroszkópos vizsgálat .....	51
4.6. Western blot .....	52
4.7. Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis .....	55
4.7.1. IEF/SDS-PAGE .....	55
4.7.2. 16-BAC/SDS-PAGE.....	57

4.8. Tandem tömegspektrometriai (MS/MS) fehérjeazonosítás .....	58
4.9. Kétdimenziós Western blot.....	60
4.10. Immunhisztokémia.....	61
4.11. A szinaptoszómák immunjelölése.....	62
4.12. Áramlási citometria és fluoreszcencia-aktivált sejtszortírozás (FACS).....	64
4.13. Konfokális mikroszkópia.....	65
4.14. Bioinformatikai analízis és irodalomkutatás.....	66
4.15. Statisztikai analízis.....	67
<b>5. Eredmények.....</b>	<b>68</b>
5.1. A prenatális immunaktiváció rövid és hosszú távú proteomikai hatásának vizsgálata.....	68
5.1.1. A prenatális immunaktiváció rövid távú hatásai – az embrionális nagyagykéreg proteomjának áthangolása.....	68
5.1.1.1. Az anyai testhőmérséklet változása a kezelést követően .....	68
5.1.1.2. Az embrionális telencephalonban kimutatható proteomikai változások 24 órával a kezelés után.....	68
5.1.1.3. A telencephalon proteomikai elemzésével kapott eredmények értékelése .....	70
5.1.2. A prenatális immunaktiváció által indukált hosszú távú változások – az adolescens utódok nagyagykérgi fejlődési zavara a proteom változásainak tükrében .....	73
5.1.2.1. Az alomméret és az utódok ivari eloszlásának változása az immunaktiváció hatására.....	73
5.1.2.2. A nagyagykérgi mintákon végzett szubszinaptikus frakcionálás validálása.....	73
5.1.2.3. A nagyagykérgi szinaptikus proteom változása adolescens korban, a prenatális immunaktiváció következtében.....	76
5.1.2.4. A proteomikai eredmények validálása a Vdac1 fehérje mennyiségének kvantifikálásával .....	88
5.1.2.5. A Camk2a fehérje változása a posztzinaptikus kompartmentben – a prefrontális agykérgi régió érintettsége .....	89
5.2. A perifériás gyulladás agyi proteomra kifejtett hatásának vizsgálata .....	91
5.2.1. A fronto-parietális agykéreg és thalamus proteomjának megváltozása 12 órával az LPS-kezelést követően.....	92
5.2.2. A gyulladás, epilepszia és az alvás-ébrenléti ciklus kapcsolata – a proteomikai adatok összhangja az élettani változásokkal.....	96
5.2.3. Az LPS-indukált NFκB-út vonal jelentősége a KIR-i fehérjekészlet módosulásában .....	97
5.3. A központi idegrendszeri komplementrendszer szerepe a szinaptikus működésben – a C1q-jelölt szinapszisok jellemzése .....	100
5.3.1. A C1q fehérje kimutatása a szinaptikus régióban – elsősorban preszinaptikus lokalizáció .....	101
5.3.2. A C1q-jelölt szinaptoszómák szortolásának bemutatása .....	103
5.3.3. A C1q-jelölt szinaptoszómák proteomjának karakterizálása .....	105
5.3.4. A lokális, szinaptikus apoptotikus mechanizmus szerepet játszik a szinapszisok C1q-jelölésében.....	108
5.3.5. A potenciális C1q-kötőpartner, neuronális pentraxin 1 vizsgálata .....	112
<b>6. Megbeszélés .....</b>	<b>116</b>

6.1. A patológiás agyfejlődésért felelőssé tehető prenatális gyulladási reakció rövid és hosszú távú neuroproteomikai hatásainak értelmezése .....	116
6.2. A felnőttkori, perifériás gyulladási reakció által indukált fokozott epileptogenezisben szerepet játszó neuroproteomikai változások értelmezése .....	120
6.3. A komplementrendszer által közvetített szinapszis-vesztés háttérben álló szinaptikus proteom-változások értelmezése.....	122
<b>Összefoglalás.....</b>	<b>125</b>
<b>Summary.....</b>	<b>126</b>
<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>127</b>
<b>Hivatkozásjegyzék.....</b>	<b>127</b>

## Rövidítésjegyzék

16-BAC – benzildimetil- <i>n</i> -hexadecilammónium-klorid	FITC – fluoreszcein izothiociánát
2-D DIGE – kétdimenziós differenciál gélelektroforézis	FSC – előre irányuló fényszórás
ACSF – mesterséges agy-gerincvelői folyadék	GABA – gamma-aminovajsav
AMPA – $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav	HPA-tengely – hypothalamus-agyalapi mirigy-mellékvese tengely
ASD – autizmus spektrum zavar	i.p. – intraperitoneális
AU – mesterséges egység	IEF – izoelektromos fókuszálás
BSA – szarvasmarha szérum albumin	IFN $\gamma$ – interferon-gamma
Ctx – cortex (a dolgozatban: fronto-parietalis nagyagykéreg)	IL-1B – interleukin-1 béta
Cy – cyanine fluoreszcens festék	IL-6 – interleukin-6
dIPFC – dorsolateralis prefrontalis nagyagykéreg	KIR – központi idegrendszer
DMF – dimetil-formamid	LPS – lipopoliszacharid
DTT – dithiothreitol	MS/MS – tandem tömegspektrometria
EASE-érték – “Expression Analysis Systematic Explorer” érték	NF $\kappa$ B – nukleáris faktor kappa B
FACS – fluoreszcencia-aktivált sejtszortírozás	Nptx1 – neuronális pentraxin 1
	NRT – nucleus reticularis thalami
	OVLТ – organum vasculosum lamina terminalis
	PAGE – poliakrilamid gélelektroforézis
	PB – foszfát puffer
	PBS – foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldat
	pI – izoelektromos pont

PMT – fotoelektron-sokszorozó cső  
poly(I:C) – poliinozin-policitidinsav  
PPI – pre-pulzus inhibíció  
PRE – preszinaptikus frakció  
PSD – posztzinaptikus frakció  
Psd95 – posztzinaptikus denzitás fehérje  
95  
SDS – nátrium-dodecil-szulfát  
SET-puffer – szacharóz/EDTA/Tris puffer  
Sod1 – szuperoxid diszmutáz  
SSC – oldalra irányuló fényszórás  
SWD – tüske-hullám kisülés  
Syp – szinaptofizin  
TBS – Tris-pufferelt fiziológiás sóoldat  
TBS-T – Tween-20 tartalmú TBS puffer

TGF – transzformáló növekedési faktor  
TGF- $\beta$  – transzformáló növekedési faktor-  
béta  
Th – thalamus  
TLR4 – toll-szerű receptor 4  
TNF $\alpha$  – tumor nekrozis faktor-alfa  
Trf2 – telomer ismétlődés-kötő faktor 2  
fehérje  
WAG/Rij – Wistar-Albino-Glaxo/Rijswijk

A proteomikai vizsgálatok során  
azonosított fehérjék teljes neve a 3., 4., 5.,  
8. és 9. *táblázatban* található.

## 1. Bevezetés

Mai ismereteink szerint az élő szervezet fiziológias működése az egymással folyamatos párbeszédben álló ideg-, immun- és endokrinrendszer összehangolt tevékenységének eredménye. Bár e rendszerek alkotóelemei, lokalizációjuk és működési mechanizmusaik alapvetően specifikusak, egyre több kutatási eredmény mutat rá interakcióik szerepére fiziológias életfunkciókban és jelentőségükre számos betegség pathomechanizmusában. E rendszerek közötti kommunikáció lehetősége a szervezet egyre több pontján bizonyított, amivel párhuzamosan az információ továbbítását végző, ismert közös mediátorok száma is gyarapszik. Mindezek mellett ma már tudunk olyan, korábban specifikusnak vélt molekuláris kaskádokról is, amelyek klasszikusan ismert szerepükön túl más rendszerekben is funkcionálnak.

Jelen dolgozat témája különböző neuroimmunológias kölcsönhatások jelentőségével és közös molekuláris mechanizmusok szerepével kapcsolatos, új kísérleti eredményeink bemutatása. A dolgozatban a korai egyedfejlődési stresszként értelmezhető prenatális immunaktiváció rövid és hosszú távú hatása, a felnőttkori gyulladási reakció epileptogenezisben játszott szerepe, valamint a fiziológias szerepet betöltő, központi idegrendszerben jelenlévő komplementrendszer és a szinaptikus molekuláris mechanizmusok közti kapcsolat kutatási eredményei kerülnek bemutatásra. Minden esetben arra a kérdésre keressük a választ, hogy az immunrendszer által mediált mechanizmusok molekuláris szinten hogyan befolyásolják a központi idegrendszert.

A prenatális immunaktiváció szerepet játszhat különböző pszichiátriai betegségek kialakulásában. Jelentőségét elsősorban a skizofrénia és autizmus megjelenésével kapcsolatban írták le (Meyer és mtsai., 2011). Alaposan karakterizált, rágsáló és főemlős állatmodelleken sikerült bebizonyítani, hogy a korai ontogenetikus környezet komplex megváltozása olyan viselkedési, anatómiai, valamint molekuláris/neurokémias tünetek és kóros elváltozások megjelenéséhez vezet, amelyek szoros kapcsolatban állnak a humán betegségeknel megfigyeltekkel (Boksa, 2010; Bauman és mtsai., 2014). A jelenség mechanisztikus háttere, a rendkívül intenzív kutatómunka ellenére, napjainkban azonban csak kevésbé ismert. A juvenilis, illetve felnőttkorban megjelenő és tesztelhető patológias tünetek kiváltásában a prenatális immunaktiváció időpontja, időtartama és súlyossága játsza a főszerepet (Meyer és mtsai., 2009a). Az egyes patogének közvetlen hatásával szemben pedig valószínűsíthető, hogy egy, az anyai immunreakcióban gyökerező mechanizmus felelős az utódban kialakuló központi idegrendszeri fejlődési zavarokért. A dolgozat első részében a

kísérletesen kiváltott anyai immunreakció proteomikai hatását mutatjuk be, közvetlenül a beavatkozás után, a fejlődő, embrionális nagyagykéregre, illetve azt, hogy mindez részleteiben miként befolyásolja az adolescens korú utódok neokortikális szinapszisainak fehérjekészletét.

A felnőttkori perifériás gyulladási reakció, a szorosan szigetelő vér-agy gát ellenére, szintén befolyással bír a központi idegrendszeri funkciókra. Ennek egy ismert példája az immunaktiváció abszensz epilepsziás rohamokat indukáló hatása (Vezzani és mtsai., 2011). A főleg gyermekkorban jelentkező, tipikus abszensz epilepsziás rohamok váratlanul fellépő, rövid ideig (néhány másodpercig) tartó tudatvesztéssel járnak (Panayiotopoulos, 1999). A tünetek megjelenésekor jellemző, hiperszinkron thalamokortikális konnektivitásért minden bizonnyal örökletes tényezők (is) felelősek (Crunelli és Leresche, 2002). A genetikai háttér jelentőségének tükrében indokoltá vált a betegség egyik elterjedten használt állatmodelljének, a genetikailag abszensz epilepsziás rohamok generálására hajlamos, ún. WAG/Rij patkánytörzsnek a vizsgálata (Coenen és Luijtelaa, 2003). Korábbi kutatások alapján ismert, hogy az epileptoid aktivitás fokozható az állatokban, mind perifériásan (Kovács és mtsai., 2006), mind centrálisan (Kovács és mtsai., 2011) indukált immunaktiváció által. A dolgozatban prezentált vizsgálatban a perifériás gyulladást követő, thalamikus és fronto-parietalis agykérgi, teljes szöveti proteomban bekövetkező változásokat mutatjuk be WAG/Rij patkányokban. A kutatás célja elsősorban a megváltozó fehérjék gyulladási molekuláris kaszkádokkal való potenciális kapcsolatának elemzése.

A fejlődő és érett központi idegrendszer plaszticitása többek közt a szinaptikus kapcsolatok kialakulásának/megerősödésének és eliminációjának egyensúlyára vezethető vissza. Az elmúlt években ismertté vált, hogy az aktivitásfüggő szinaptikus plaszticitásban tradicionálisan az immunrendszerből ismert mechanizmusok is szereppel bírnak (Boulanger, 2009). Az egyik ilyen kulcsfontosságú elem a komplementrendszer. Az immunrendszerben a patogének és egyéb elemek (pl. elpusztult sejtek) szelektív megjelölésében és eltávolításában funkcionáló komplementrendszer a központi idegrendszerben fiziológias körülmények között a szinapszisok eliminációjában vesz részt (Stevens és mtsai., 2007). A folyamat egyfajta fiziológias neuroimmunológiai kölcsönhatásnak fogható fel, amelyben a neuronok környezetét monitorozó, aktivációra és fagocitózisra képes immunsejtek, a rezidens makrofág, mikroglia sejtek, a komplement-jellel ellátott szinapszisokat szelektíven eltávolítják (Miyamoto és mtsai., 2013). Ez a mechanizmus bizonyítottan szerepet játszik az egyedfejlődés alatti, aktivitásfüggő, programozott szinapszisszám-csökkentésben (Stevens és mtsai., 2007), valamint ismert, hogy részt vesz az epilepszia (Chu és mtsai., 2010), továbbá

neurodegeneratív kórképek kialakulásában is (Stephan és mtsai., 2012). Jelen munkában azt vizsgáltuk, hogy hogyan tér el a komplement-jellel ellátott szinapszisok fehérjekészlete felnőtt egerek nagyagykérgében a nem jelölt szinapszisokétól. Ennek ismerete segíthet a komplement-függő szinaptikus plaszticitás és kóros szinapszis-vesztés molekuláris hátterének felderítésében.

## **2. Irodalmi áttekintés**

### **2.1. A neuroimmunológiai kölcsönhatások általános jellemzése**

#### **2.1.1. A központi idegrendszer és az immunrendszer kapcsolatának korai vizsgálata és mai felfogásunk az elszigetelt központi idegrendszerről**

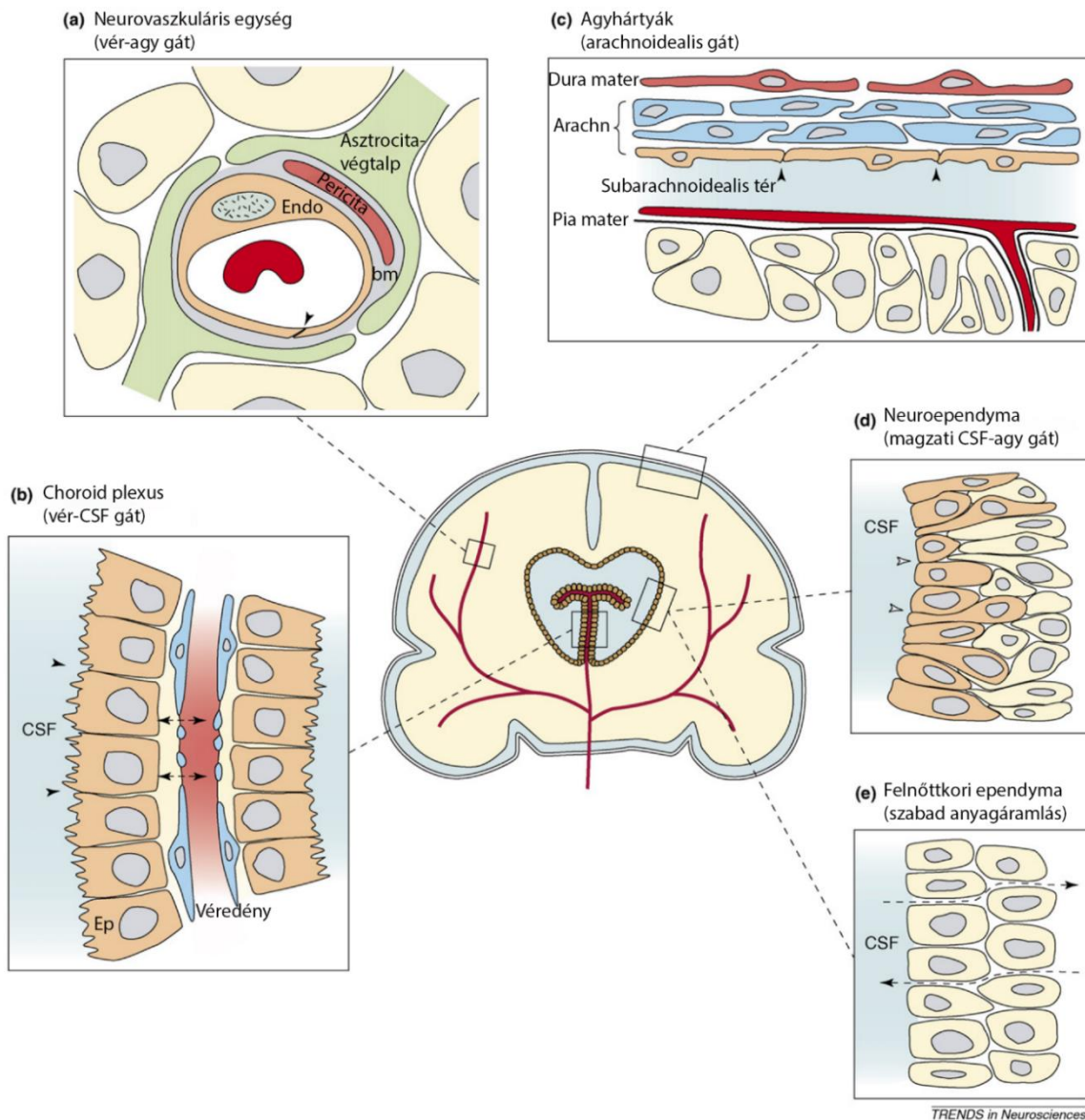
A központi idegrendszert (KIR-t) tradicionálisan, immunológiailag a szervezet kiváltságos tagjának tekintik, amely megkülönböztetés a fiziológias körülmények között a szisztémás immunrendszertől való elszigeteltségnek köszönhető. Ennek az elképzelésnek az alapja, hogy a szervezet bizonyos pontjai az általános megfigyeléssel szemben, képesek testidegen anyagok (ún. „allograft”-ok) befogadására. E területek közé tartozik tehát az agy (Shirai, 1921; Murphy és Sturm, 1923), vagy a szem elülső kamrája (van Dooremaal, 1873), amelyeket a kilökődéshez vezető immunreakció generálásának hiánya alapján neveztek el ún. „immunprivilegizált” területeknek (Medawar, 1948; összefoglalva, Niederkorn, 2006 közleményében).

A felfogást, miszerint a KIR határozottan elkülönül a szervezet egyéb rendszereitől, így az immunrendszertől is, a transzplantációs kísérletekkel párhuzamosan szintén alátámasztani látszott a megfigyelés, miszerint a perifériásan az érrendszerbe juttatott anyagok (például vitális festékek) nem jutnak be a KIR-be (Ehrlich, 1885; Bouffard, 1906; Goldmann, 1909; összefoglalva Bechmann és mtsai., 2007 és Saunders és mtsai., 2014 közleményekben). Az úttörő vizsgálatokért felelős Paul Ehrlich interpretációja szerint a KIR szövetének más szervekétől eltérő festékek iránti affinitása felelős a jelölődés hiányáért (Ehrlich, 1906). A nagy horderejű kezdeti vizsgálatokat követően azonban rövidesen kiderült, hogy a használt anyagok centrálisan beadva kötődnek az agyszövethez, tehát valójában fizikai akadály gátolja azok bejutását a perifériáról a KIR-be (Goldmann, 1913). Mindezen jelenségekért a KIR érhálózatának nagyfokú szigetelőképességét tartották felelősnek – egyesek már a kezdeti felfedezésektől fogva (Lewandowsky, 1900). A fizikai akadály



meglétét később már embrionális korú kísérleti állatokban is bizonyították (Weed, 1917). Ugyanakkor, csak évtizedekkel később sikerült strukturális magyarázatot találni a KIR érhálózata alkotta, ún. vér-agy gát specifikus tulajdonságaira. A fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok kimutatták, hogy szoros kapcsolatok („tight junction”-ök) révén az agyi endothél sejtek rendkívüli módon zárnak a luminális oldal és a KIR-i parenchyma között, illetve a sejteken keresztül folyó transzport is lényegesen kisebb mértékű, mint bizonyos perifériás szervek esetén, amelyet a kevesebb mikropinocitotikus vezikula is sugallt (Reese és Karnovsky, 1967). Mindezek mellett ismertté vált, hogy a mobilis immunsejtek, a perifériáról induló agyi inváziója bár lehetséges, de szintén rendkívül limitált, fiziológias körülmények között a perivaszkuláris területeken túl (összefoglalva, Ransohoff és mtsai., 2003; Mrass és Weninger, 2006).

Bizonyítást nyert tehát, hogy bizonyos barrierék egyedülálló elszigeteltséget biztosítanak a KIR számára, lehetővé téve a passzív anyagtranszport nagyfokú korlátozását. Ez alól kivételt az ún. cirkumventrikuláris szervek képeznek (lásd: 2.1.2. *alfejezet*). E barrieréket – az agyra korlátozva – az alábbi elemek képezik: i) a vér-agy gát, melyet az ér luminális oldala felől, az egymással szoros kapcsolatokkal („tight junction”) kapcsolódó endothél sejtek, valamint számos egyéb sejt, sejtalkotó, és nem-sejtes elem képez (pl. periciták, asztrocita végtalpak és a bazális membrán), ii) a vér-cerebrospinalis folyadék gát a choroid plexus epitheliális sejtjeinek (ependymasejtek) szintjén, iii) a subarachnoidealis térben lévő cerebrospinalis folyadék–lágymeningeális agyhártya (arachnoidea) gát és iv) a korai ontogenezis során meglévő cerebrospinalis folyadék–agy gát az agykamrák falát képező neuroepithelium szintjén (*1. ábra*; Neuwelt és mtsai., 2011). Az elszigeteltség a szisztémás immunrendszer elemeivel szemben is fennáll, amelyek közti párbeszéd így speciális kapcsolódási pontokra korlátozódik fiziológias körülmények között (lásd: 2.1.2. *alfejezet*). E szigetelő elemek sérülése, például mechanikai behatás vagy immunreakció következtében, súlyos következményekkel jár, hiszen a kialakuló ödéma a legkülső agyhártya, a dura mater és a csontos elemek által határolt KIR-ben visszafordíthatatlan károkat okoz (Marmarou, 2007).



**1. ábra.** A fejlődő és felnőtt agyat határoló gátak. (a) A vér-agy gátat alkotó neurovaszkuláris egység elemei. A gát elszigeteli a központi idegrendszeri véredények luminális oldalát a központi idegrendszeri parenchymától. Az endothelialis sejtek (*Endo*) szoros sejtkapcsolatokon („tight junction”, *nyílhegy*) keresztül inter-endothelialis gátat képeznek. E sejteket, illetve az ezek szomszédságában lévő pericitákat bazális membrán (*bm*) veszi körül. Az asztrociták végtalpai szintén az egység részei. (b) A vér-CSF (agy-gerincvelői folyadék) gát felépítése, amely a choroid plexus területére lokalizálódik. A choroid plexus véredényeinek fala fenesztrált, így a vér-agy gátnál jóval szabadabb anyagmozgást tesz lehetővé (*nyilak*), ugyanakkor az epithelialis sejtek (*Ep*) közti apicalis tight junction-ök (*nyílhegyek*) meggátolják a kontrollálatlan transzportot. (c) Az agyhártyák által képzett meningealis gát. A dura mater véredényeinek fala fenesztrált, ugyanakkor az arachnoidea (*Arachn*) bizonyos sejtjei között található tight junction-ök megakadályozzák a

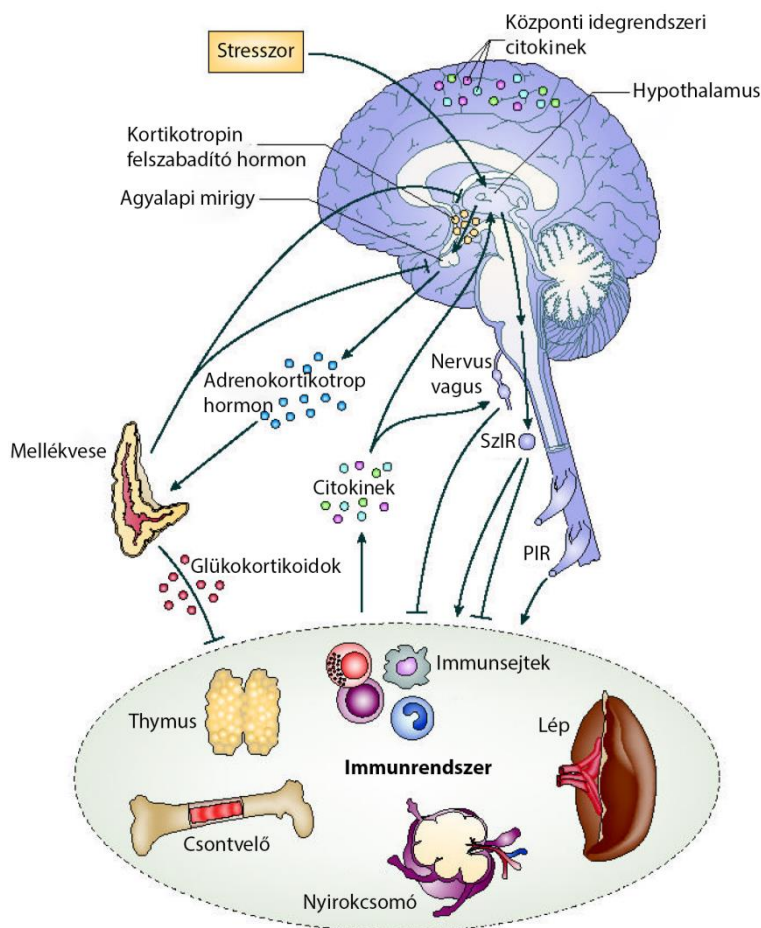
subarachnoideális teret kitöltő CSF átjutását az apicalis agyhártya-rétegek felé. Az arachnoidea és a pia mater felszínén lévő véredények fala szorosan zár, ugyanakkor nem rendelkeznek a pericitákkal és asztrocita végtalpakkal. (d) A csak magzati korban jellemző neuroependymalis gát, ahol a szorosan egymáshoz kapcsolódó neuroependymalis sejtek fizikai barriert képeznek (*nyílt nyílhegyek*) a nagyobb molekulák átjutásának. (e) Az érett ependyma, amely már nem képez jól záró gátat – legalábbis a fehérjék méreténél nem nagyobb molekulák számára – a központi idegrendszeri parenchyma és az agykamrák közt (Saunders és mtsai., 2008, nyomán).

### **2.1.2. A központi idegrendszer és az immunrendszer kapcsolódási pontjai és a köztük zajló kommunikáció**

A KIR „immunprivilegizált” helyzetének és a határoló gátak szigetelő tulajdonságának ellenére a neuroimmunológiai kommunikáció lehetősége egyre több folyamatban vált nyilvánvalóvá. A következőkben bemutatjuk a neuroimmunológiai kölcsönhatások általános jelentőségét, azok anatómiai, sejtés és molekuláris vonatkozásainak összefoglalásával (2. ábra).

A talán legjobban feltárt neuroimmunológiai kapcsolat, minden bizonnyal a stresszválaszban egyedülálló fontosságú hypothalamus–agyalapi mirigy–mellékvese tengely (*hypothalamic–pituitary–adrenal axis*, HPA-tengely), illetve az immunválasz közti interakció. A szimpatikus idegrendszeri hatásra aktiválódó HPA-tengely egymást visszacsatolással szabályozó endokrin elemei végső soron fokozzák a glükokortikoidok mellékvesekéregből történő felszabadulását. A glükokortikoidok nagyon hatékony immunszuppresszásként hatnak, amely jelenség felfedezéséért, illetve a rheumatoid arthritis betegség kezelésében való alkalmazhatóságának felismeréséért (Hench és mtsai., 1950) 1950-ben Edward C. Kendall, Tadeus Reichstein és Philip S. Hench megosztott orvosi Nobel-díjban részesült. Megemlítendő, hogy a glükokortikoidok immunszuppresszáns hatásukat elsősorban hosszú távon fejtik ki – így jelentőségük például krónikus stressz esetén fontos –, míg egy akut stresszválasz során jelentkező glükokortikoid-szint emelkedés immunválaszserkentő hatású lehet (Dhabhar és McEwen, 1999). A glükokortikoidok anti-inflammatorikus hatásukat génexpressziós szinten fejtik ki az immunkompetens sejtekben. A glükokortikoidok receptoraikhoz kötődve a sejtmagban bizonyos anti-inflammatorikus hatást kifejtő fehérjék génjének promóter régiójában található glükokortikoidra-érzékeny elemekhez kötődve

fokozzák e gének transzkripcióját. A pro-inflammatorikus faktorok szintjének emelkedésének megakadályozása pedig különböző, immunválasz során aktiválódó jelátviteli kaszkádok (pl. nukleáris faktor kappa B (NF $\kappa$ B)-útvonala) gátlásával valósul meg (összefoglalva, Barnes, 1998). A stresszorokra adott szimpatikus idegrendszeri válaszreakció által felszabadult glükokortikoidok immunszuppressziós hatását rendkívül elterjedten hasznosítják, hiszen analógiáik hatékonyan gátolják sok, pro-inflammatorikus túlsúllyal jellemezhető betegséget, így a már említett rheumatoid arthritis, asztma, és számos (további) autoimmun betegség tüneteit (Boumpas és mtsai., 1993; Rhen és Cidlowski, 2005). A HPA-tengely és az immunrendszer közötti kommunikáció azonban nem egyirányú, mivel számos szekretált citokin (pl. interleukin-1 béta (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), tumor nekrosis faktor-alfa (TNF $\alpha$ ), interferon-gamma (IFN $\gamma$ )) fokozza a HPA-tengely működését. A negatív visszacsatolásként működő mechanizmus révén, fokozott glükokortikoid szekréció szükséges a pro- és anti-inflammatorikus egyensúly helyreállításához immunaktiváció esetén (Besedovsky és del Rey, 2000). A glükokortikoidok hatása a KIR területén is megnyilvánul, mivel, többek közt ismert, hogy glükokortikoid receptorok vannak jelen számos KIR-i régióban is (Aronsson és mtsai., 1988), ami szintén reciprok neuroimmunológiai kommunikációra utal.



**2. ábra.** Az ideg- és immunrendszer főbb kapcsolódási pontjai. A stresszor hatására megváltozó központi idegrendszeri, agyi citokinek által is befolyásolt egyensúlyban megnyilvánuló zavar a hypothalamus-ból az agyalapi mirigyen át a mellékvesekéregbe, molekuláris kaszkádokon keresztül vezető úton befolyásolja az immunrendszer elemeinek működését. Szintén hatással bír az immunrendszer tevékenységére a nervus vagus és egyéb paraszimpatikus

(PIR), továbbá szimpatikus (SzIR) idegrendszeri elemek működése. Az immunrendszer elsősorban a szisztémás citokinek szekrécióján keresztül befolyásolja az idegrendszer állapotát (Sternberg, 2006, nyomán).

A hypothalamus–agyalapi mirigy tengely egyéb endokrin szervek hormontermelésére és szekréciójára hatva szintén befolyással bír az immunrendszer működésére, és egyre több hormon esetében derült fény azok immun-modulációs hatására. Mindezek következtében beszélhetünk a hypothalamus–agyalapi mirigy–pajzsmirigy (Kruger, 1996; Wang és Klein, 2001), illetve a hypothalamus–agyalapi mirigy–ivarszervek tengelyének immunfunkciókat szabályozó hatásáról (Tanriverdi és mtsai., 2003).

A szimpatikus idegrendszer közvetlenül is képes az immunszervek szabályozására, azok beidegzésén keresztül. Ismert a csecsemőmirigy (Williams és Felten, 1981), a csontvelő (Felten és mtsai., 1985), a fejlődő (Ackerman és mtsai., 1989) és érett lép (Bellinger és mtsai., 1989), és nyirokcsomók (Felten és mtsai., 1984) szimpatikus idegrendszeri, noradrenerg beidegzése. A felszabadult noradrenalin, a mellékvesevelőből származó másik fontos katekolamin, az adrenalin hatásához hasonlóan, általánosságban gátolja a gyulladási

reakcióhoz szükséges folyamatokat, így a pro-inflammatorikus citokinek és antitestek szekrécióját, valamint a limfociták proliferációját és migrációját (Elenkov, 2007). Mindemellett, ennek ellenkezője, a gyulladási reakció catekolaminok általi, helyi indukciója is kimutatható, minden bizonnyal az immunreakció lokalizálásának céljából (Elenkov, 2007). A catekolaminok szintézise és szekréciója nem korlátozódik az idegsejtekre: leírták termelésüket a fagocitákban és limfocitákban, amelyek ezen túlmenően, a szekretált catekolaminok visszavételére is képesek (Flierl és mtsai., 2008). A paraszimpatikus idegrendszer szintén hatékony immunmodulátor szerepű, elsősorban a bolygóideg (nervus vagus) kiterjedt hálózatának köszönhetően. Mint azt egy nagy horderejű vizsgálatban kimutatták, a bolygóideg által felszabadított acetilkolin *in vitro* csökkenti a makrofágok pro-inflammatorikus citokin-felszabadítását, illetve *in vivo* korlátozza a máj által szintetizált tumor nekrosis faktor (TNF) mennyiségét, bakteriális endotoxin-indukált gyulladási reakció során (Borovikova és mtsai., 2000). Az ún. anti-inflammatorikus kolinerg útvonal működése hozzájárul a pro-inflammatorikus állapot megszüntetéséhez, amelyben kulcsfontosságú tehát a bolygóideg efferens hatása, illetve egy specifikus acetilkolin receptor, az alfa 7-es alegységet tartalmazó  $\alpha 7nAChR$  jelenléte az immunsejteken (Pavlov és mtsai., 2009). A bolygóideg limfoid szerveket történő közvetlen beidegzése azonban vita tárgyát képezi (Kenney és Ganta, 2014). A bolygóideg afferens ágainak igen nagy jelentősége van az immunaktiváció érzékelésében és az információ továbbításában a KIR felé. Ismert, hogy bizonyos perifériás pro-inflammatorikus citokinek (pl. IL-1B) képesek a bolygóideget aktiválni, ami az ingerületet KIR-i magjába, a nucleus tractus solitarius-ba vezeti (Maier és mtsai., 1998). A továbbított jel pedig elérhet más agytörzsi magokat, valamint a hypothalamust, és ez utóbbi aktiválódása a HPA-tengely beindítását, így a gyulladási reakció általános csökkentését okozza (Tracey, 2009).

Bár a rendkívül hatékony szigetelő vér-agy gát szinte teljes egészében gátat szab a periféria és az agyi parenchyma közti szabad anyagáramlásnak, az ún. cirkumventrikuláris szervek területén, az agyi kapillárisokat alkotó endothél és egyéb sejtcsoportok nem képeznek tökéletesen szigetelő határt. A vér-agy gát hiánya itt továbbá sűrű vaszkularizációval párosul. Az agykamrák szomszédságában elhelyezkedő cirkumventrikuláris szervek közé tartozó area postrema, a subfornicalis szerv és az organum vasculosum lamina terminalis (OVLT), elsősorban szenzoros régiókként kapcsolatot teremtenek a periféria és a KIR között (Johnson és Gross, 1993), míg a másik csoportot a szekretoros neurohypophysis (illetve egyes klasszifikációkban az eminentia mediana), a tobozmirigy, illetve a subcommisuralis szerv képezi (Duvernoy és Risold, 2007). Az exogén pirogéneket (pl. bakteriális endotoxin) és a

szisztémás gyulladási reakció mediátorait (pl. számos pro-inflammatorikus citokint) egyaránt képesek közvetlenül érzékelní a szenzoros cirkumventrikuláris szervek, és elsősorban az OVLТ sejtei. Az ennek következtében beinduló, lokális citokin- és prosztaglandin-szintézis pedig kulcsfontosságú például a láz kialakulásában (Roth és mtsai., 2004).

Mára ismertté vált, hogy az immunsejtek nélkülözhetetlen szerepet játszanak mind az ontogenezis során, mind az érett KIR működésében. Különbséget kell azonban tennünk a mezoderális eredetű, KIR-i makrofág, mikroglia sejtek és a perifériáról a KIR-be vándorló leukociták között. Bár a mikroglia sejtek eredete hosszú idő óta vita tárgyát képezi (összefoglalva, Saijo és Glass, 2011), mai tudásunk szerint a korai embriogenezis időszakában vándorolnak a fejlődő KIR-be keletkezésük helyéről, a szikzacskóból (Ginhoux és mtsai., 2010). Feltételezhető tehát, hogy a mikroglia sejtek ismert proliferációja felnőttkorban (Lawson és mtsai., 1992) szintén a lokális mikroglia sejtek készletéből indul. Mindemellett fontos megemlíteni, hogy az embriogenezist követő proliferáció kizárólagos, lokális, KIR-i eredete máig nem teljesen elfogadott, és egyes hipotézisek valószínűsítik, hogy káros behatások által indukált mikrogliózis során nemcsak a helyi, reaktív mikroglia sejtek és látens mikroglia-progenitorok szerepe, hanem a perifériás, csontvelői eredetű monociták proliferációja és KIR-i penetrációja is jelentős (összefoglalva, Li és Zhang, 2016). A mikroglia sejtek nélkülözhetetlen szerepet játszanak a fiziológiás működésben és a patológias körülmények során indukált válaszreakcióban is. Megannyi fiziológiás funkcióik közül rendkívül lényeges, hogy részt vesznek a számfeletti sejtek, illetve szinaptikus kapcsolatok aktivitásfüggő eltávolításában az egyedfejlődés alatt és a felnőttkorban egyaránt (összefoglalva, Hanisch és mtsai., 2013). Érdekes módon, a mikroglia sejtektől minden bizonnyal eltérő eredetűek más KIR-i makrofág sejtpopulációk (pl. perivaszkuláris makrofágok, choroid plexus makrofágok), és posztnatális korban keletkezésük helye a csontvelő (összefoglalva, Prinz és Priller, 2014).

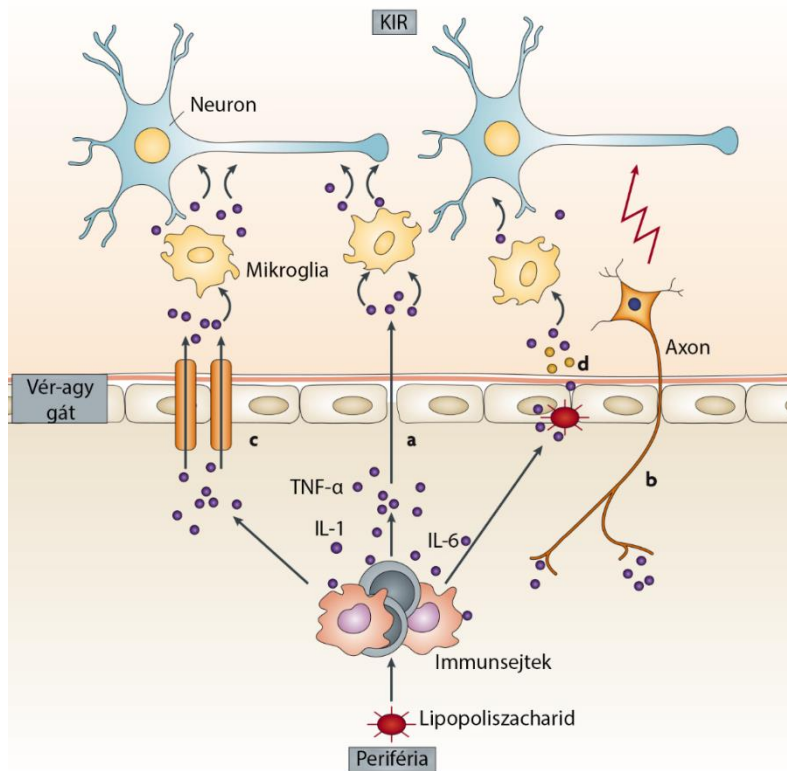
Napjainkban egyre több adat támasztja alá a szisztémás immunrendszer-eredetű sejtek szerepét is a KIR-i funkciókban. A már említett, nem mikroglia-típusú KIR-i makrofágokon (Prinz és Priller, 2014) túl, kulcsfontosságú a számos modulátor molekula (pl. hisztamin, szerotonin) szekréciójára és a gyors efferens immunfunkciók ellátására képes hízósejtek csoportja (Dong és mtsai., 2014). Igazolták a perifériás eredetű T-sejtek, illetve dendritikus sejtek jelenlétét is, amelyek bejutása valószínűsíthetően az alábbi három területre korlátozódik: i) fiziológiás körülmények között minden bizonnyal a legjelentősebb a choroid plexus érhálózatából a cerebrospinális folyadékba történő mozgás, ii) átjutás a posztkapilláris venulákon keresztül a subarachnoideális, és a perivaszkuláris, ún. Virchow-Robin térbe, és

iii) migráció a posztkapilláris venulákon keresztül a perivaszkuláris területre a KIR-i parenchymában (ez utóbbi esetben a leukociták keresztül haladnak a vér-agy gáton is) (Ransohoff és mtsai., 2003).

Szükséges megemlíteni, hogy a neuroimmunológiai reciprok kapcsolat egyik komponense a cerebrospinális folyadék összeköttetése a cervikális nyirokcsomókkal. Bár a cerebrospinális folyadék legnagyobb része az arachnoidealis villusokon keresztül visszajut a szisztémás vérkeringésbe, egy része a limfatikus rendszerbe torkollik (Cserr és Knopf, 1992). A legújabb vizsgálatok pedig fényt derítettek a dura materhez kapcsolt nyirokrendszerre is (Louveau és mtsai., 2015). Az agyhártyák, a perivaszkuláris tér és kis mértékben a KIR-i parenchyma folyamatos monitorozásának jelentősége a dinamikusan cserélődő, KIR-i leukocita populációk által pedig egyre inkább igazoltá válik (Ousman és Kubes, 2012).

A fentiek alapján látható, hogy a citokinek a legfontosabb és legjobban kutatott immunmediátor molekulák közé tartoznak, amelyek nélkülözhetetlenek a neuroimmunológiai kommunikációban is. A citokinek rendkívül sok tagot számláló családja alapvető szerepet játszik a KIR fejlődésében, hiszen fiziológias körülmények közt is érintett a neuro- és gliogenezisben, tehát a KIR-i sejtek keletkezésében és differenciációjukban (Deverman és Patterson, 2009). Az érett KIR, a fent leírtaknak megfelelően pedig számos ponton biztosítja a citokinek hatásának közvetlen és közvetett kifejtését ép vér-agy gát mellett is (3. ábra). Bizonyítottá vált az agyrégióként és citokin-típusonként eltérő hatékonyságú, telítési transzport rendszerek jelenléte, amelyekről általánosan elmondható, hogy a vérből a KIR-be egyirányúsított citokin-szállítást teszik lehetővé (összefoglalva, Banks, 2005). A citokin és vér-agy gát interakció pedig fontos közvetítője lehet a szisztémás gyulladás KIR irányába történő továbbterjedésének, mivel a citokin-kötődés által indukált jelátviteli útvonalak növelik a vér-agy gát permeabilitását az endothél sejtek közti paracelluláris transzport, leukocita infiltráció, stb., elősegítésével (Pan és mtsai., 2011). A citokinek a cirkumventrikuláris szervek területén szintén közvetlen KIR-i hatást fejthetnek ki (Roth és mtsai., 2004). A közvetett citokin-szignalizáció egyik eleme a vérerek lumenoldala felőli citokin-kötődés által indukált abluminális, KIR-i parenchyma felé irányuló citokin szekréció. Ismert, hogy minderre az endothél sejtek és periciták is képesek (Fabry és mtsai., 1993), még hozzá polarizált módon, a citokin-szignál érkezésének irányával ellentétes oldali szekrécióval (Verma és mtsai., 2006). A citokin-jeltovábbítás negyedik bizonyított útja végül, a már említésre került bolygóideg-mediált útvonal (Maier és mtsai., 1998).



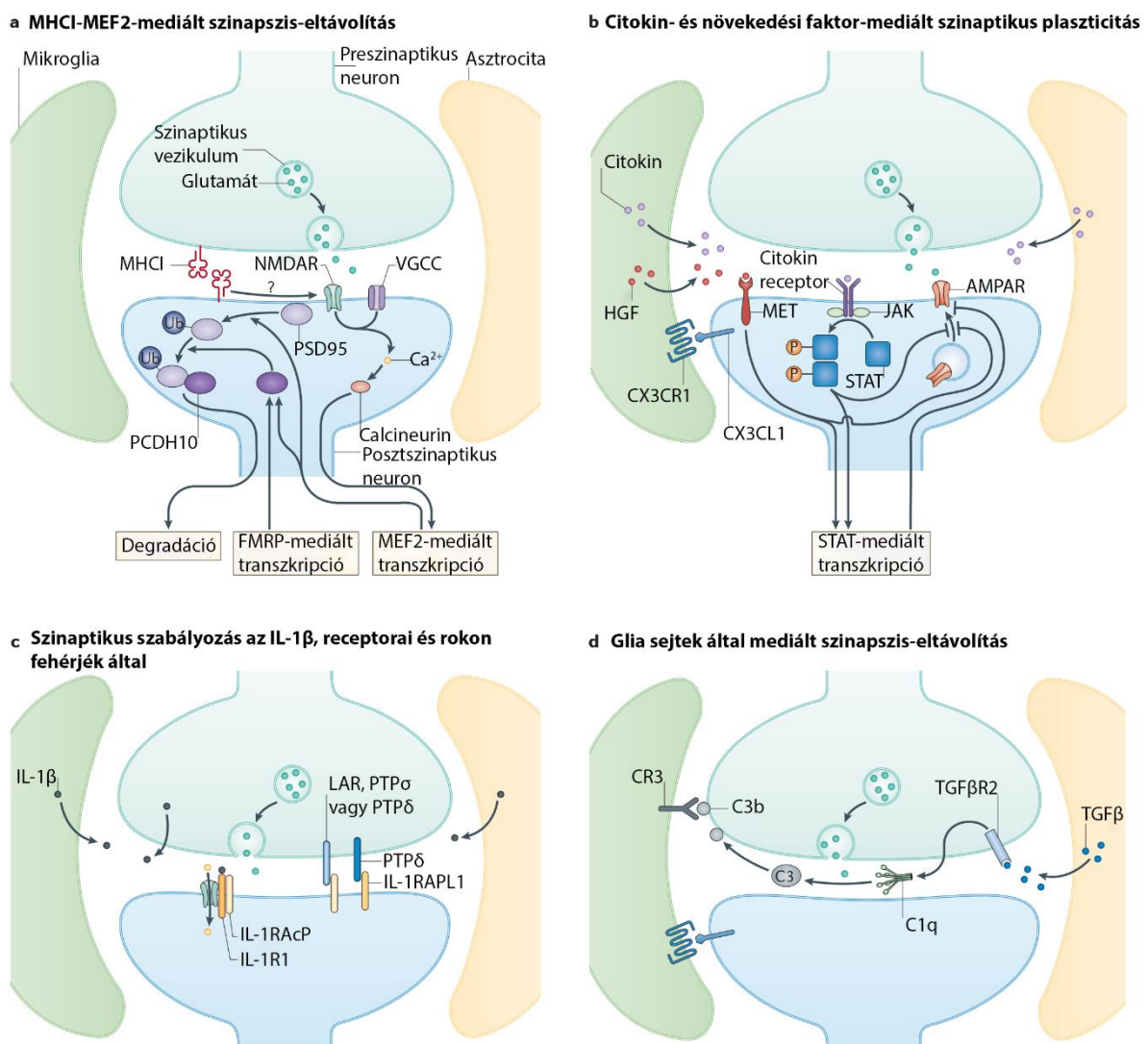


**3. ábra.** A perifériális citokinek által használt útvonalak a központi idegrendszer működésének befolyásolására. (a) A citokinek átjutása a véráramból a központi idegrendszeri (KIR-i) parenchymába a cirkumventrikuláris szervek területén. (b) A perifériás citokinek hatásának továbbítása bizonyos szenzoros agyidegeken (pl. nervus vagus) keresztül, azok

afferens jeltovábbító útvonala által. (c) A vér-agy gátban található telítési transzport-rendszer végzi a citokinek közvetlen átjutását a KIR-i parenchymába az intakt vér-agy gát jelenléte mellett is. (d) Citokinek és egyéb immun-aktív elemek szintézise és a KIR-i parenchyma felé történő szekréciója a vér-agy gát elemei által a periféria felől érkező citokin-szignalizáció következtében. A citokinek hatásának centrális megjelenése másodlagos, elsősorban mikroglia sejtek által végzett, lokális citokin-kibocsátást válthat ki (Seruga és mtsai., 2008, nyomán).

Érdekes módon, tradicionálisan az immunrendszerből ismert, immunfolyamatokban kulcsfontosságú mechanizmusok és molekulák is alapvető szerepet játszanak a KIR lokális működésében. A KIR-ben is expresszálandó, „immunmolekulák” közé számos, klasszikusan a veleszületett immunitásban szerepet játszó fehérjét írtak le, így a komplementrendszer klasszikus, alternatív és lektin útvonalának elemeit (Veerhuis és mtsai., 2011), pro- és anti-inflammatorikus citokineket és receptoraikat (Bartfai és Schultzberg, 1993; Deverman és Patterson, 2009), az ún. *toll*-szerű receptorokat (toll-like receptor 1-9, TLR1-9) (Hanke és Kielian, 2011). Az adaptív immunrendszer elemei közül pedig elsősorban a fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex, MHC) KIR-i jelenléte említésre méltó, mely alapvető szerepet játszik a neuronális plaszticitásban (Shatz, 2009). Fontos felhívni a figyelmet arra, hogy a felgyülemlett adatok alapján a felsorolt

immunmolekulák expressziója nem korlátozódik kizárólag az immunrendszer aktivációjával járó, pl. KIR-i gyulladásai vagy autoimmunitásban gyökerező folyamatokra. Fehérjénként, sejtípusonként, agyrégióként és fejlődési állapotonként ugyan eltérő mennyiségben, de detektálható a jelenlétük fiziológiai körülmények közt is. Az egy glutamáterg szinapszisban megtalálható immun-mediátor molekulák csoportját és szinaptikus működésben játszott szerepüket a 4. ábra mutatja be.



**4. ábra.** Immunmediátor molekulák egy glutamáterg szinapszisban. (a) Az elsősorban N-metil-D aszpartát receptorokon (NMDAR) és feszültségfüggő kalciumcsatornákon (VGCC) keresztül megnőtt intracelluláris kalcium-szint kiváltja a myocita-specifikus serkentő faktor 2 (MEF2) aktiválódását, a szinaptikus fő hisztokompatibilitási komplex 1 (MHC1) molekulák által indított, calcineurin-kapcsolt jelátviteli útvonal által, mely végső soron a szinaptikus

erősség csökkenéséhez vezet. A MEF2 fehérje a fragilis X mentális retardációs fehérje 1-gyel (FRMP) közösen elősegíti a fontos posztszinaptikus fehérje, posztszinaptikus denzitás fehérje 95 (PSD95), protokadherin 10 (PCDH10)-mediált ubiquitinációját (Ub) és lebontását. (b) A citokinek és bizonyos növekedési faktorok (pl. hepatocita növekedési faktor (HGF)) citokin, illetve hepatocita növekedési faktor receptor (MET) fehérjékhez kötődve, elsősorban a Janus-kináz/transzkripció jelátvivő és aktivátor (JAK/STAT) útvonal aktiválásával váltják ki az  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav (AMPA) receptorok (AMPA) internalizációját/degradációját. A neuronális sejtváندorlásban és neuritnövekedésben kulcsfontosságú neuronális kemokinek (pl. CX3CL1) gliális receptorokhoz (pl. CX3CR1) kapcsolódnak. (c) Az interleukin-1 béta (IL-1 $\beta$ ) receptorához, az IL-1R1-hez kötődve a receptorhoz toborozza az IL-1 receptor kiegészítő fehérjét (IL-1RAcP), amely fokozza az NMDAR-jelátvitelt. Az IL-1RAcP a preszinaptikus tirozin foszfatáz- $\sigma$  (PTP  $\sigma$ ), PTP $\delta$  és leukocitákban közös antigénnel kapcsolt fehérjéhez (LAR), míg a rokon, IL-1R kiegészítő fehérje-szerű receptor 1 (IL-1RAPL1) a PTP $\delta$  molekulához kapcsolódva befolyásolja a szinaptikus plaszticitást. (d) Az asztrocitális transzformáló növekedési faktor-béta (TGF $\beta$ ) a neuronális TGF $\beta$ -receptor 2 (TGF $\beta$ R2) fehérjéhez kötődve kiváltja a C1q fehérje szekrécióját, amely a neuron felszínén előidézi a C3 fehérje hasítását C3b komponenssé. Ez utóbbit a mikroglia sejtek felismerik a C3 receptorokon (CR3) keresztül, és eltávolítják az így „megjelölt” szinapszisokat. A kemokin-jelátviteli útvonal szintén szerepet játszhat a szinapszis-eltávolításban (Estes és McAllister, 2015, nyomán).

## **2.2. A korai egyedfejlődés során jelentkező immunaktiváció és pszichiátriai betegségek kialakulása**

A korai egyedfejlődés alatt az élő szervezet rendkívül kiszolgáltatott a környezetének. Az ekkor jelentkező káros környezeti hatások pedig hosszú távú, sokszor az egész életre szóló következményekkel bírnak. A pre- és perinatális periódus kiemelt jelentőségére utal, hogy számos KIR-t érintő betegség kialakulása esetén ismert ma már a korai fejlődésben gyökerező zavar.

A korai stressz-tényezők között, hosszú távú következményeit tekintve kiemelt jelentőségű az immunaktiváció szerepe. Az elsősorban a születést megelőző, prenatális, anyai immunaktiváció és bizonyos KIR-i betegségek kialakulása közti kapcsolat felismerése több évtizeddel ezelőttre datálható. Ezekben a legelső, epidemiológiai vizsgálatokban összefüggést

mutattak ki az anya terhessége során elszenvedett fertőzések és az utódban kialakuló skizofrénia között (Mednick és mtsai., 1988; Torrey és mtsai., 1988; Barr és mtsai., 1990; Sham és mtsai., 1992). Ezzel összefüggésben említendő, hogy a járványok, elsősorban téli hónapokra eső megjelenése és a családi halmozódást nem mutató skizofrén betegek téli hónapokra eső születési tendenciája közti asszociáció hívta életre a skizofréniahoz köthető „születési évszak” teóriát is (Pulver és mtsai., 1983; Watson és mtsai., 1984). A kezdeti munkákban ugyanakkor direkt kapcsolat helyett mindössze különböző járványok és a terhesség ideje közti átfedés alapján állapítottak meg korrelációt a prenatális fertőzés és bizonyos betegségek kialakulása között, amely komoly limitációnak tekinthető (összefoglalva, Brown, 2011). A későbbiekben közvetlen bizonyítékok is alátámasztották bizonyos, fejlődési zavarral kapcsolt pszichiátriai betegségek és a prenatális fertőzés közti összefüggést. A terhes anyák vérszérumán végzett vizsgálatok során kimutatták, hogy fertőzésre utaló molekuláris jellemzők, pl. virális (Buka és mtsai., 2001a; Brown és mtsai., 2004a) vagy egysejtű (Brown és mtsai., 2005) patogén elleni specifikus ellenanyagok és citokinek (Buka és mtsai., 2001b; Brown és mtsai., 2004b) jelenléte korrelációban áll az utódban a skizofrénia és más pszichotikus mentális betegségek kialakulásával.

Egyéb vizsgálatok pedig kapcsolatot mutattak ki a prenatális fertőzések és további pszichiátriai betegségek, így főként az autizmus (Chess, 1971; Markowitz, 1983; Yamashita és mtsai., 2003; Brown és mtsai., 2014), valamint a major depresszió (Machón és mtsai., 1997) és bipoláris zavar (Parboosing és mtsai., 2013; Canetta és mtsai., 2014), illetve egyéb KIR-i fejlődési rendellenességek, mint például a cerebrális parézis (Grether és Nelson, 1997; Wu és Colford, 2000) és bizonyos gyerekkori epilepsziás kórképek (Whitehead és mtsai., 2006; Sun és mtsai., 2008) között. Az elmúlt évtizedekben egyre precízebb metodikai eszköztárral mutattak rá a prenatális gyulladásra, mint kockázati tényezőre számos KIR-i betegség esetén. A kezdeti epidemiológiai és ökológiai – mindössze a születési idő és a járványtani adatok összevetésével kapott – vizsgálati eredmények után ma már szerológiai és magzatvízből kimutatott molekuláris markerek is bizonyították tehát hajlamosító szerepét. A napjainkig felhalmozott adatok alapján pedig kiemelendők a felsorolt betegségek közül a skizofrénia és az autizmus spektrum zavarok közé sorolható kórképek, mint a prenatális gyulladással leginkább összefüggésbe hozott betegségek.

A skizofrénia a lakosság ~1%-át érintő, alapvető viselkedési, kognitív és affektív klinikai tünetei mellett egy rendkívül heterogén betegségrcsoportnak tekinthető (Saha és mtsai., 2005). A páciensek tünetei hagyományosan három csoportra oszthatók. Az ún. pozitív tünetek közé a pszichotikus állapotra jellemző téves érzékelés (hallucináció), téveszmék

(delúziók) és az ekkor megnyilvánuló zavart, összefüggéstelen beszéd tartozik. Az ún. negatív tünetekhez a motivációs és az emocionális állapot kifejezését érintő zavarok sorolhatók. A kognitív funkciózavarok közé pedig az információ-feldolgozási, figyelem- és memóriadeficit tartozik. A betegség diagnosztizálását alapvetően megszabó tünetek mellett fontos figyelembe venni egyéb tényezőket, így a szociális és foglalkoztatottsággal összefüggő deficitet vagy a tünetek fennállásának hosszát (Tandon és mtsai., 2013). A legújabb betegség-diagnosztikai irányelvek pedig már nem különböztetnek meg altípusokat a skizofrénia esetében a korábbi altípusok közti jelentős átfedések és a rájuk jellemző tünetek sokszor tapasztalható dinamikus változásai miatt (Tandon és mtsai., 2013). A kezelési lehetőségek közül elsődleges az antipszichotikumok használata, amelyek a KIR-i dopaminerg rendszer funkciózavarára hatva ugyan a legtöbbször előnyösnek bizonyulnak a pozitív tünetek megszüntetéséhez, ugyanakkor hatástalanok a negatív és kognitív tünetek orvoslásában, és igen súlyos mellékhatásokat (pl. motoros zavarokat) okozhatnak (Miyamoto és mtsai., 2012). A skizofrénia minden bizonnyal jelentős mértékben a genetikai háttér által is meghatározott betegség (Braff és mtsai., 2007). A fent leírtaknak megfelelően azonban számos környezeti faktor hatással lehet a betegség kialakulására, mely tényezők közé az egyedfejlődés korai fázisát érintő és később megjelenő események is tartozhatnak. A korai rizikófaktorok közé a prenatális immunaktiváción túl, többek közt az anyai alultápláltság, pszichológiai stressz, terhesség alatti komplikációk tartoznak, míg a későbbi tényezők közé például a gyermekkori bántalmazás, valamint a serdülőkorú és azt követő kábítószer-fogyasztás és szocioökonómiai jellemzők sorolhatók (összefoglalva, Dean és Murray, 2005). A skizofrénia más fejlődési betegségekenél hosszabb, elnyújtott kifejlődése hívta életre a betegség egyik leggyakrabban említett, ún. „két-ütés” hipotézisét, melynek értelmében egy korai egyedfejlődési faktor (ami lehet genetikai vagy környezeti természetű is) skizofrénia-kiváltó hatásának megjelenéséhez egy későbbi, elsősorban a serdülőkorra, illetve fiatal felnőttkorra eső negatív tényező is szükséges (Maynard és mtsai., 2001).

A skizofrénia mellett a prenatális immunaktivációval legtöbbször korrelációt mutató, szintén KIR-i fejlődési zavarban gyökerező betegség az autizmus (illetve, a jelenlegi nevezéktan szerint az autizmus spektrum zavarok (ASD) családjába eső betegségek). Az autizmus a világ lakosságának kissé kevesebb mint 1%-át érintő betegségcsoport (Williams és mtsai., 2006a), amelynek első leírása Leo Kanner, osztrák-amerikai nemzetiségű pszichiáter nevéhez fűződik (Kanner, 1943). A betegek között jelentős mértékben felülreprezentáltak a férfiak a nőkkel szemben (Werling és Geschwind, 2013). Az autizmus és rokon betegségek csoportosítása gyökeres változásokon ment át az elmúlt 70 évben.

Jelenleg az ASD betegségcsoport klasszifikációja egyesíti a korábban különálló autisztikus zavar, Asperger-szindróma és a másként nem meghatározott pervazív fejlődési zavar alkategóriákat (Volkmar és McPartland, 2014). Az ASD diagnózisának felállítása alapvetően a szociális interakciókban jelentkező, illetve kommunikációs deficit, valamint a repetitív viselkedési formák és rendkívül korlátozott érdeklődési terület korai gyerekkorban megjelenő és tartós jelenlétének függvénye (Volkmar és McPartland, 2014). Az ASD-ben szenvedő páciensek esetén jellemző számos egyéb pszichiátriai, neurológiai betegség tüneteinek megjelenése, tehát az ún. komorbiditás például a figyelemhiányos hiperaktivitás-zavarral, értelmi fogyatékkal, szorongásos zavarral és epilepsziával (Mannion és Leader, 2013). A tünetek súlyosságát tekintve, az ASD-ben szenvedő betegeknél jelentős különbségek állapíthatók meg, bár általánosságban elmondható, hogy a betegek sokszor önálló életvitelre képtelenek, és egész életükben folyamatos ápolásra szorulnak. Akárcsak a skizofrénia esetében, az ASD betegségek kialakulása során is feltételezhető a genetikai háttér erős szerepe (Miles, 2011), ugyanakkor, a korai környezeti faktorok között a továbbiakban részletezett prenatális gyulladási reakció mellett, egyebek közt toxikus kémiai anyagok (pl. ólom, higany, peszticidek), a gesztációs periódus alatt alkalmazott gyógyszerek (pl. az antiepileptikum, valproát), D-vitamin hiány, pszichológiai stressz is megtalálható (összefoglalva, Dietert és mtsai., 2011). Az ASD jelenleg gyógyíthatatlan mentális betegségnek tekinthető, azonban lehetőség van a beteg fejlesztésére az ASD több aspektusát tekintve, elsősorban a korai gyerekkori, speciális és intenzív terápia révén (Warren és mtsai., 2011).

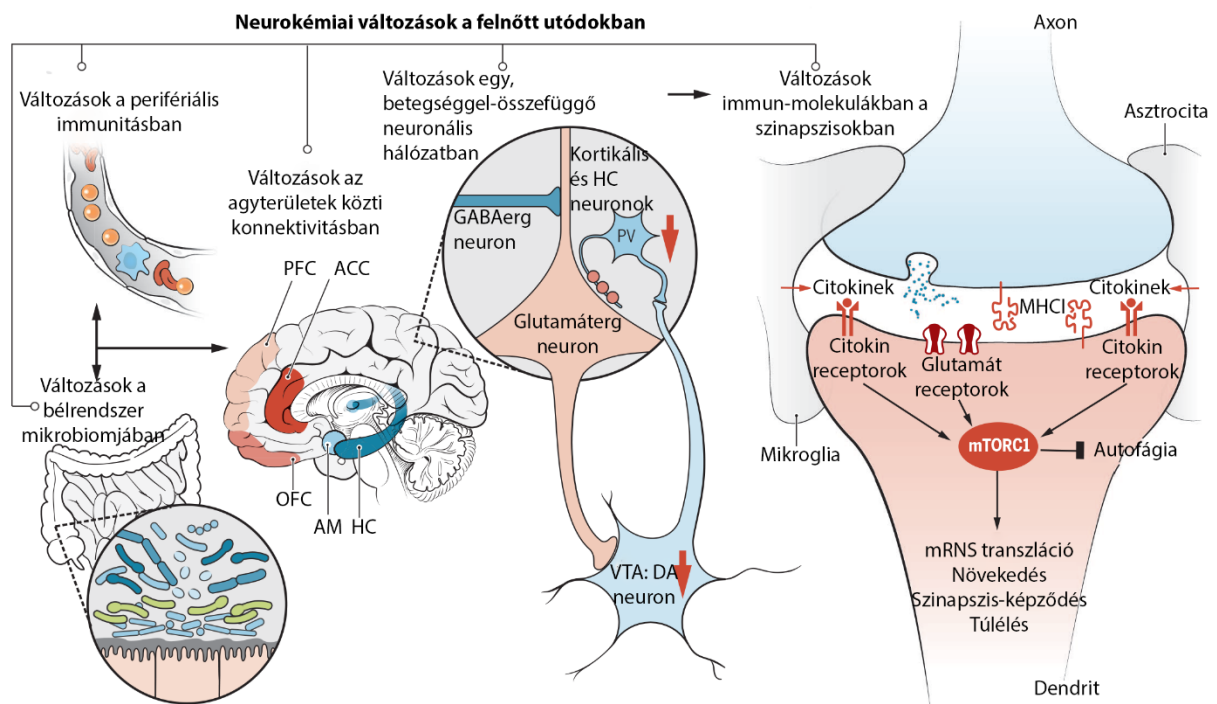
A prenatális immunaktiváció pszichiátriai betegségek, elsősorban a skizofrénia és ASD kialakulásában betöltött szerepének felismerése, a jelenség feltárásához szükséges állatmodellek kifejlesztését és bevezetését eredményezte. Az anyai immunaktiváció állatmodelljeiben a leggyakrabban alkalmazott immunogén ágensek közé elsősorban a poliinozin-policitidinsav (poly(I:C)), lipopoliszacharid (LPS), valamint influenza vírusok tartoznak. Közülük az első kísérletesen alkalmazott immunogén az influenza vírus volt, amelynek alkalmazásával kimutatták, hogy nemcsak sejtes (Cotter és mtsai., 1995; Fatemi és mtsai., 2002) és molekuláris szintű (Fatemi és mtsai., 1998a, b) KIR-i fejlődési zavart, hanem viselkedési abnormalitásokat (Shi és mtsai., 2003) is okoz az utódban a korai ontogenezis során átélt immunaktiváció. A detektált viselkedési eltérések közt az exploratív és szociális viselkedés zavara mellett kimutatható a szenzomotoros gátlás deficitje (az ún. pre-pulzus inhibíció (PPI) zavara) (Shi és mtsai., 2003), és utóbbi a skizofrénia (Parwani és mtsai., 2000) és autizmus (Perry és mtsai., 2007) egyik közös, központi tünete. Az utódok farmakológiai

vizsgálata antipszichotikus és pszichostimuláns szerek alkalmazásával szintén alátámasztotta a humán pszichiátriai betegségekkel való hasonlóságokat (Shi és mtsai., 2003).

A prenatális immunaktiváció és a skizofrénia- és autizmus-szerű tünetek közti kapcsolatot alátámasztó bizonyítékok kezdeti kimutatása után előtérbe került a precíz immunaktiváció kiváltásához használható, már említett virális analóg, poly(I:C) és a Gram-negatív bakteriális endotoxin, LPS alkalmazása. Előnyük, hogy adagolásuk rendkívül szabályozott immunaktivációt tesz lehetővé, tekintve, hogy nem-replikatív természetűek, a korábban alkalmazott vírusokkal ellentétben (Meyer és mtsai., 2009a). A gesztációs idő ismeretében így időben szabályozottan, a kísérlet szempontjából releváns egyedfejlődési periódusban váltható ki anyai immunaktiváció. Természetesen e modellek limitációja, hogy virális és bakteriális antigének önmagukban nem képesek teljes mértékben reprodukálni az intakt, patogén vírusok és baktériumok által kiváltott immunaktivációval összefüggő mechanizmusokat.

A napjainkban egyre elterjedtebben használt, anyai immunaktivációt alkalmazó rágcsáló és kisebb mértékben főemlős állatmodellek számos viselkedési, anatómiai, neurokémiai és egyéb molekuláris különbséget tártak fel a kezelésen prenatálisan átesett utódokban. Az utódok viselkedési eltérései több aspektus szerint is megfeleltethetőek a humán betegeknél tapasztalt patológiás jelenségekkel. Közéjük tartozik a már említésre került PPI-deficit mellett az ún. látens inhibíció (Zuckerman és mtsai., 2003), a szociális viselkedés zavara (Smith és mtsai., 2007; Bauman és mtsai., 2014) és a kommunikációs deficit (Malkova és mtsai., 2012). Az autizmusra specifikus repetitív viselkedési mintázat szintén megfigyelhető a kezelésen átesett egereken (Malkova és mtsai., 2012), illetve makákókon (Bauman és mtsai., 2014). Emellett deficit mutatható ki különböző mechanizmusokon alapuló memórianyomok rögzülésében (Meyer és mtsai., 2008a; Luchicchi és mtsai., 2016) és az explorációs viselkedésben (Smith és mtsai., 2007), illetve több ízben leírták depresszió-szerű tünetek megjelenését is (Babri és mtsai., 2014; Khan és mtsai., 2014). Az anyai kezelés hatására kiterjedt makro-, illetve mikroanatómiai eltérések is mutatkoznak az utódok KIR-ében. A méretét tekintve nagyobb skálájú morfológiai változások között kulcsfontosságú a megnövekedett agyi oldalkamra (Li és mtsai., 2009), amely a skizofrénia egyik központi, agyi, strukturális elváltozása (Owens és mtsai., 1985). Csökkent hippocampalis piramis-sejt-szám és sejt méret (Fatemi és mtsai., 2002), nagyagykérgi sejtes denzitás (Smith és mtsai., 2012) és dendritarborizáció (Coiro és mtsai., 2015) mutatható ki a rágcsálómodellben, illetve dendrit-morfológiai eltérések a főemlős, Rhesus majomban (Weir és mtsai., 2015). A patológiás strukturális eltérések kiterjedtségét

jelzi, hogy a különböző agykérgi területek közti neuronális aktivitás szinkronitásában mutatkozó zavar szintén kimutatható az állatmodellben (Dickerson és Bilkey, 2013). Mindez ugyancsak ismert skizofréniában (Spencer és mtsai., 2003) és ASD-ben (Rippon és mtsai., 2007) szenvedő betegekben. Az idegsejtek vizsgálata során, molekuláris szinten eltéréseket találtak többek közt a dopaminerg (Luchicchi és mtsai., 2016), glutamáterg (Roumier és mtsai., 2008; Holloway és mtsai., 2013) és gamma-aminovajsav (GABAerg) (Richetto és mtsai., 2014; Labouesse és mtsai., 2015) neurotranszmitter-rendszerek komponenseiben, továbbá a sejt migrációban jelentős reelin (Meyer és mtsai., 2006) és a növekedési faktorok között kiemelt fontosságú agyi-eredetű növekedési faktor (BDNF) (Golan és mtsai., 2005) szintjében. Fokozott mikroglia (Juckel és mtsai., 2011) és asztrocita (Samuelsson és mtsai., 2006) aktivációt írtak le a kezelt utódok KIR-ében, amely jelenség hasonlóságot mutat a humán pszichiátriai betegekénél tapasztaltakkal (Patterson, 2009). A prenatális immunaktiváció hatására kialakuló, főbb KIR-i elváltozások bemutatása és a háttérükben álló mechanisztikus magyarázat az 5. ábrán látható.



**5. ábra.** Mechanizmusok, melyek összefüggésbe hozhatók a prenatális immunaktiváció által kiváltott, felnőttkori agyi funkcionális zavarokkal. A bélrendszer abnormális mikrobiomja, az immunrendszer működési zavaaraival együtt, a perifériáról képes befolyásolni a felnőtt központi idegrendszert. Az agyterületek közti, nagy skálájú kapcsolatokat tekintve a fiziológiástól eltérő konnektivitás mutatkozhat a skizofréniában és autizmus spektrum



zavarokban is érintett struktúrák, így a prefrontalis (PFC), anterior cingularis (ACC) és orbito-frontalis (OFC) agykéreg, valamint az amygdala (AM) és hippocampus (HC) között. A lokális neuronális hálózatok szintjén zavart okozhat az agykérgi és hippocampalis régiókban a ventralis tegmentalis area (VTA) dopaminerg neuronjainak (DA), valamint a kortikális parvalbumin-pozitív neuronok (PV) alulműködése. A fiziológiástól eltérő működésért, az egyes szinapszisok szintjén felelősek lehetnek immun-molekulákhoz, így a fő hisztokompatibilitási komplex 1-hez (MHCI) és citokin-jelátvitelhez kapcsolt sejtes folyamatok, melyek – egy lehetséges kulcsszereplőként – a rapamycin emlős/mechanisztikus célpont fehérjén (mTORC1) keresztül, alapvetően befolyásolják a szinaptogenezist és normális szinaptikus működést (Estes és McAllister, 2016, nyomán).

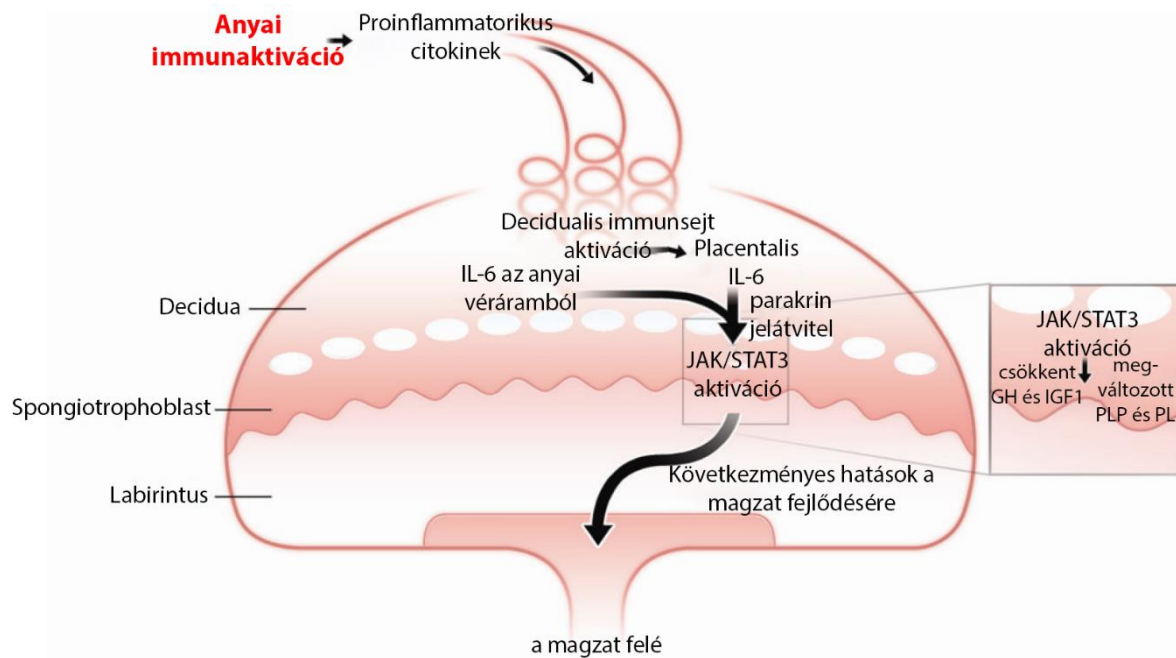
A fent sorolt pathológiás elváltozások, és elsősorban a viselkedési tünetek a legtöbb esetben korfüggő megjelenést mutatnak. Az érési folyamat szükségességének következtében a juvenilis kor előtt többnyire nem, csak az ún. posztpubertális, illetve periadoleszcens kortól tapasztalható a karakterisztikus jelenségek megjelenése (Zuckerman és mtsai., 2003; Romero és mtsai., 2010). A pathológiás állapot kifejlődésének hosszú érési ideje az állatmodellekben jelentős hasonlóságot mutat a skizofrénia hosszú lappangási idejével és a tünetek túlnyomórészt serdülőkor utáni megjelenésével (Walker és Bollini, 2002). További figyelemreméltó jellemzője a prenatális immunaktiváció állatmodelljének, hogy elsősorban a hím utódok érintettek a fejlődési zavarok kialakulásában (Xuan és Hampson, 2014). Ez utóbbi megfigyelés pedig összhangban áll a már említett ténnyel, hogy a férfiak közt nagyobb arányban található ASD-ban szenvedő betegek, mint a nők körében. Az epidemiológiai adatok és az immunaktiváció hatását vizsgáló kísérletek eredményeinek egyik fontos következtetése, hogy a több, különböző típusú patogén mikroorganizmus, illetve immunogén ágens hasonló, pathológiás fenotípus megjelenését indukálja az utódban. Minderre utal, hogy a pszichiátriai betegségek és az anyai fertőzések közti kapcsolatot több, különböző és rendkívül heterogén patogén mikroorganizmusok esetében is leírták (Brown és Derkits, 2010), valamint az állatmodelleken végzett kísérletek hasonló rendellenességeket mutattak ki eltérő típusú immunaktivációs modellekben is (Meyer és mtsai., 2009a). A korai immunaktiváció fejlődési rendellenességben megnyilvánuló végkimenetele, minden bizonnyal sokkal inkább függ a beavatkozás idejétől, időtartamától és az immunogén ágens dozírozásától (Meyer és mtsai., 2009a). Ez a fajta függetlenség a kórokozó típusától és a hasonló fenotípusos eltérések kialakulása az utódokban, minden bizonnyal annak a következménye, hogy míg a patogén ágensek nem jutnak át bizonyos biológiai, fizikai

barriereken (elsősorban a méhlepényben található anyai-magzati határon), addig az anyai immunválasz a magzatra is hatással van (Meyer és mtsai., 2009a). A citokin-szint akut megnövekedése kimutatható az anyai szérumban (Ashdown és mtsai., 2006), a placentában (Urakubo és mtsai., 2001; Ashdown és mtsai., 2006), illetve az amnionfolyadékban (Urakubo és mtsai., 2001), magzati vérplazmában (Ashdown és mtsai., 2006) és agyban (Cai és mtsai., 2000) is az anyai, perifériás immunaktiváció után. A lokális, magzati pro-inflammatorikus reakció bekövetkezik az anyai immunaktiváció indukálásához elterjedten használt, perifériásan bejuttatott LPS (Goto és mtsai., 1994; Ashdown és mtsai., 2006), illetve vírusok (Fatemi és mtsai., 2012; Shi és mtsai., 2005) helyi, fetális megjelenése nélkül is. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy bizonyos vírusok esetében ezzel ellentétes kutatási eredmények felhívták a figyelmet potenciális átjutásukra a placentán keresztül (Aronsson és mtsai., 2002; Driggers és mtsai., 2016). A placenta, illetve a folyamatosan záródó magzati vér-agy gát által alkotott határ szigetelőképesége ellenére kialakuló KIR-i fejlődési rendellenességek kialakulása mutatott rá a gyulladási mediátorok jelentőségére, és mindez elvezetett az anyai immunaktiváció ún. citokin-hipotézisének megalkotásához (Meyer és mtsai., 2009b).

Habár az állatmodelleken végzett vizsgálatok számos agyfejlődési abnormalitást kimutattak, a prenatális immunaktiváció által kiváltott pathológiás, KIR-i ontogenetikus folyamat mechanisztikus jellemzői máig rendkívül kevésbé ismertek. Feltárt ugyanakkor, hogy az anyai immunválasz során felszabadult IL-6 nélkülözhetetlen a kóros állapot kialakulásához (Smith és mtsai., 2007; 6. ábra). Az IL-6 jelentőségét mutatja, hogy további munkák igazolták az általa indukált Janus-kináz 2/transzkripciós jelátvivő és aktivátor 3 (JAK2/STAT3) útvonal szerepét az állatmodell abnormális viselkedési jellemzőinek kialakulásában (Parker-Athill és mtsai., 2009), amely jelátviteli útvonal a placentában aktiválódik az anyai véráramban jelenlévő IL-6 által (Hsiao és Patterson, 2011). Egy másik bizonyítottan kiemelkedő szerepű citokin a segítő T-17 sejtek által termelt interleukin-17a, amely által mediált jelátviteli folyamatok pathológiás agykéreg-struktúrát és autizmus-szerű viselkedési jellemzőket indukálnak egér állatmodellben (Choi és mtsai., 2016). A citokinek fiziológiás egyensúlyának jelentőségét mutatja, hogy az egyik, anti-inflammatorikus folyamatokban is kulcsszereplő citokin, az interleukin-10 koncentrációjának csökkenése és növekedése egyaránt pathológiás elváltozásokért felelős a gesztációs időszakban (Meyer és mtsai., 2008b).

Az anyában indukált, prenatális korban átélt gyulladási reakció tehát komoly következményekkel bírhat az utód KIR-i ontogenezisére nézve. Az állatmodellekben kiváltott pathológiás organogenezis pedig kiterjedt változásokat okoz a molekuláristól egészen a

viselkedési szintig, melyek meglepően nagyfokú átfedést mutatnak a skizofréria- és autizmus-szerű jellemzőkkel, és melyeket napjainkban is egyre intenzívebben kutatnak.



**6. ábra.** Az interleukin-6 hatásai a placentára és magzati fejlődésre az anyai immunaktiváció következtében. Az anyai immunaktiváció során a spirális artériákon keresztül a decidua, spongiotrophoblast és labirintus területére érkező pro-inflammatorikus citokinek kiváltják a placentális sejtek, elsősorban a decidua immunsejtjeinek interleukin-6 (IL-6) szekrécióját. A lokálisan szekretált IL-6 parakrin módon hat a placenta spongiotrophoblast sejtjeire, ami a placentális JAK/STAT3 jelátviteli kaszkád aktiválódásához vezet. Mindez pedig csökkent növekedési hormon (GH) és inzulin-szerű növekedési faktor 1 (IGF1) szintézist, továbbá megváltozott prolaktin-szerű fehérje (PLP) és placentális laktogén (PL) termelést okoz. A patológiás placentális környezet pedig károsan befolyásolja a magzat fejlődését (Patterson, 2011, nyomán).

## 2.3. A felnőttkori perifériás immunaktiváció epileptogenezist fokozó hatása

### 2.3.1. Az epilepszia jellemzése és kialakulásának neuroimmunológiai vonatkozásai

A perifériásan jelentkező gyulladás alapvetően befolyásolhatja az érett KIR-i idegsejtek excitabilitását, így az epileptogenezist. Az epilepszia a lakosság ~1%-át érintő

betegség, amely abnormális neuronális szinkronitás következtében ismétlődően megjelenő epilepsziás rohamokkal karakterizálható. A rohamokat eredetüket és a háttérükben álló mechanizmusokat tekintve parciális és generalizált típusokra oszthatjuk. Míg a parciális, más néven fokális rohamok esetén a kóros hiperszinkronitás egy agyfélteke meghatározott területére korlátozódik, az utóbbi esetben az epileptoid aktivitás egyszerre érinti mindkét agyféltekét (Stafstrom, 2006). A két típuson belüli, klinikai tünetek és elektrofiziológiai elváltozások alapján definiált főbb alkategóriák klasszifikációja sokat módosult az elmúlt évtizedekben (Mindruta és mtsai., 2011). A következőkben röviden bemutatjuk a jelenlegi főbb csoportokat. A parciális rohamokon belül hagyományosan megkülönböztették az eszméletvesztéssel nem járó, ún. egyszerű és az eszméletvesztéssel járó, ún. komplex típusokat (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy [ILAE], 1981). A legújabb klasszifikáció ugyan nem különít el egyszerű és komplex fokális rohamokat, ugyanakkor hangsúlyozza az eszméletvesztés meglétének vagy hiányának jelentőségét (Berg és mtsai., 2010). Megemlítendő, hogy a parciális rohamok evolválódhatnak bilaterális konvulzív rohamokká is (a régi nevezéktan szerint „másodlagosan generalizálódhatnak”). A generalizált rohamokat görcsrel járó, konvulzív és nem-konvulzív típusokra osztjuk. Ezek közül, a konvulzív rohamok jellemzőinek függvényében a továbbiakban nem részletezett myoklonusos, klónusos, tónusos, tónusos-klónusos és atóniás kategóriák különíthetők el. A nem-konvulzív generalizált, ún. abszensz epilepszia három csoportra, a tipikus, atipikus, valamint a speciális jellemzőket is tartalmazó abszensz rohamokra osztható. Végül külön kategóriaként említendő egy a generalizált és fokális rohamoktól különálló csoportot alkotó halmaz is, amelybe a be nem sorolható epileptikus görcsökkel járó betegségek tartoznak (Berg és mtsai., 2010).

A gyulladás epileptogenezist fokozó hatására utaltak azok a vizsgálatok, amelyekben kimutatták, hogy a szteroid és nem-szteroid anti-inflammatorikus anyagok alkalmazása csökkenti bizonyos epileptikus rohamok kialakulásának valószínűségét, kezelésnek ellenálló páciensekben és kísérleti állatokban egyaránt (Klein és Livingston, 1950; Wasserman és mtsai., 1965; Steinhauer és Hertting, 1981; Wallenstein, 1987; Baran és mtsai., 1994). Szintén a gyulladásos reakció jelentőségére utalnak azok a klinikai szempontból rendkívül fontos megfigyelések, amelyek szerint a gyerekkorban jelentkező magas láz rohamok megjelenését indukálhatja (Dubé és mtsai., 2007). Ezek mellett a centrális, KIR-i gyulladás szintén oki tényezőként szerepelhet epilepsziás rohamok fellépésekor, a kiváltó tényezők – így sok patogén mikroorganizmus – ismert száma pedig folyamatosan nő (Rasmussen és mtsai., 1958; Annegers és mtsai., 1988; Farrell és mtsai., 1995; Misra és mtsai., 2008). A

bakteriális és virális fertőzéseken túlmenően fontos megemlíteni a KIR-t érintő autoimmun betegségeket, mint a rohamok kialakulásához vezető gyulladási folyamatok okozóit (McKnight és mtsai., 2005; Bien és mtsai., 2007; Dalmau és mtsai., 2008). Érdekes módon, a korai ontogenezis során bekövetkező pro-inflammatorikus reakció szintén befolyásolhatja a későbbi epileptogenezist. Az anya terhessége alatti immunaktiváció humán páciensekben (Nørgaard és mtsai., 2012), valamint a prenatálisan (Yin és mtsai., 2015) és korai posztnatális korban (Galic és mtsai., 2008) indukált gyulladás rágszálókban szintén növeli a rohamok kialakulásának valószínűségét rövid és hosszú távon egyaránt.

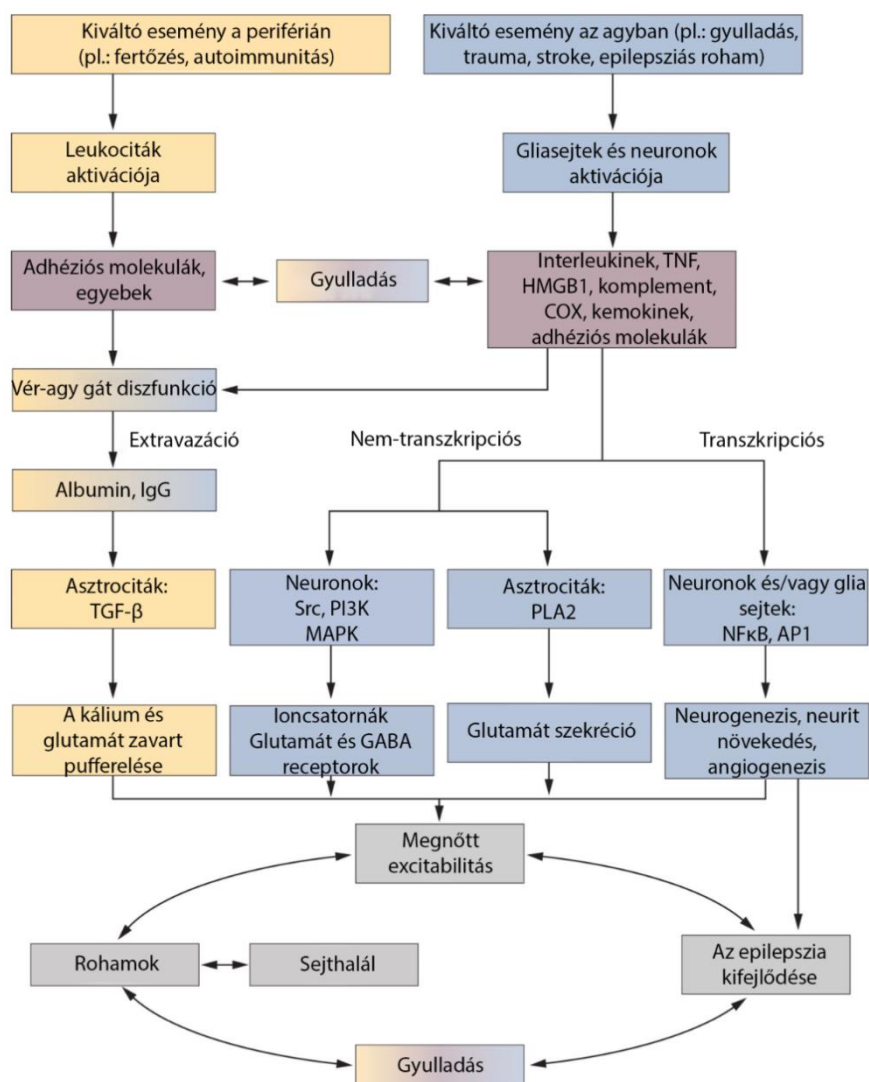
A fentiekkel összhangban, számos tanulmányban leírták bizonyos citokinek abnormális szintjét epilepsziás betegek vérérumában (Virta és mtsai., 2002; Liimatainen és mtsai., 2009; Choi és mtsai., 2011; Wang és mtsai., 2015) és cerebrospinális folyadékában (Peltola és mtsai., 2000; Wang és mtsai., 2015). Bár humán páciensekből nem-invazív módon vett mintákban több más vizsgálatban nem detektáltak szignifikáns citokin-szint különbséget (összefoglalva, Li és mtsai., 2011), ugyanakkor műtéileg eltávolított, releváns agyi régiókban kimutatták bizonyos citokinek magasabb szintjét és egyéb gyulladási markerek jelenlétét (Choi és mtsai., 2009a). Nem szabad megfeledkezni tehát arról a tényről, hogy az epilepsziás rohamok önmagukban is kiválthatnak citokin-szint változásokat, így az epilepsziás rohamok megjelenése és a citokin-szint változások közti ok-okozati kapcsolat sokszor nem egyértelmű. A citokinek családjának további jelentőségére utal, hogy bizonyos tagjainak genetikai polimorfizmusa összefüggésben áll az epilepszia megjelenésével (Chou és mtsai., 2010; Azab és mtsai., 2016). A citokinek mellett egyéb gyulladási markerek megjelenése, illetve szintjének szignifikáns növekedése szintén bizonyítottá vált. Epilepsziás betegekből származó, elsősorban vérérum mintákban leírták a komplementrendszer bizonyos komponenseinek (Başaran és mtsai., 1994), immunglobulinok (Başaran és mtsai., 1989; 1994; Kumar és mtsai., 2013) és perifériális limfociták (Başaran és mtsai., 1989; 1994) szintjének növekedését az elmúlt évtizedekben. Állatmodelleken végzett kísérletek eredményei szintén kiterjedt változások skáláját mutatták ki pro-inflammatorikus molekuláris markerek tekintetében a rohamokat követően. A pro- és anti-inflammatorikus citokinek szintjének gyors, ugyanakkor átmeneti változását a rohamok indukciója után számos agyterületen (Minami és mtsai., 1991; De Simoni és mtsai., 2000; Plata-Salamán és mtsai., 2000), gliasejtekben (Vezzani és mtsai., 2002), valamint neuronokban (Ravizza és Vezzani, 2006) is kimutatták az epilepszia állatmodelljeiben. A citokinek közé sorolt molekulákon kívül egyéb fehérjék, így többek közt a gyulladási jelátvitelben kiemelt fontosságú NFκB (Rong és Baudry, 1996; Voutsinos-Porche és mtsai., 2004) és szignál továbbító és aktivátor

transzkripciós faktorok (STAT; Choi és mtsai., 2003), a gyulladási mediátorok szintézisében kulcsszereplő ciklooxigenáz-2 (COX2; Voutsinos-Porche és mtsai., 2004), komplement komponensek (Aronica és mtsai., 2007), a fő hisztokompatibilitási komplex II, antigénprezentálásban szereplő fehérje (MHC II; Shaw és mtsai., 1994) és leukocita adhézióban és infiltrációban funkcionáló adhéziós molekulák (Fabene és mtsai., 2008) mennyiségének növekedését demonstrálták kísérletes körülmények között. Mindezen adatok az epilepszia és az immunaktiváció kétirányú kapcsolatára utalnak: a gyulladási reakció epileptogenezishez, a rohamok pedig helyi immunaktivációhoz vezetnek (Vezzani és mtsai., 2011). A rohamok kialakulását megelőző perifériás és centrális gyulladás esetén is központi szerepet játszanak a mikroglia sejtek (Riazi és mtsai., 2008), valamint az asztrociták (Robel, 2016). Hasonló módon, a rohamok indukciója után is konzekvensen kimutatható e két gliális sejtpopuláció aktivációja (Niquet és mtsai., 1994), valamint sok esetben idegsejt-pusztulás is (Meldrum, 1993), amelyek elvezethetnek az immunmediátor szerepű molekulák fokozott lokális szintéziséhez és így újabb rohamok kialakulásához. Az ismétlődő epileptoid tevékenység valószínűségét fokozza, hogy a rohamok által indukált helyi gyulladási reakció a vér-agy gát funkció-zavarát, illetve a perifériáról bejutó leukociták KIR-i infiltrációját okozhatja (Oby és Janigro, 2006; Fabene és mtsai., 2008).

Az utóbbi évtizedekben, sok esetben részleteiben is sikerült magyarázatot találni arra, hogy a fentiekben bemutatott gyulladási mediátorok miként képesek megváltoztatni a neuronális excitabilitást. Ahogyan korábban említettük, a perifériásan szintetizált citokinek hatásukat több úton is kifejtethetik a KIR-ben (3. ábra). Akár perifériás eredetű, szisztémás, akár KIR-i eredetű gyulladásról beszélünk, fokozott, lokális, KIR-i citokin expresszió következik be, elsősorban a mikroglia sejtek, asztrociták és periciták által (összefoglalva, Galic és mtsai., 2012). A citokinszint-emelkedésre pedig érzékenyek a KIR-i neuronok, hiszen sejt felszínükön megtalálható számos citokin receptora (összefoglalva, Kronfol és Remick, 2000). A citokinek KIR-i és neuromuszkuláris funkció-preparátumokon, a szinaptikus transzmisszióra kifejtett hatása viszonylag régóta ismert volt, kezdetben ugyan a háttérmechanizmusok ismerete nélkül (Katsuki és mtsai., 1990; Caratsch és mtsai., 1994). Később egyre több adat halmozódott fel a citokinek (pl. IL-1B, IL-6, transzformáló növekedési faktor (TGF)) és a neuronális excitabilitás, valamint szinaptikus plaszticitás közti kapcsolat molekuláris aspektusairól (összefoglalva, Jankowsky és Patterson, 1999; Galic és mtsai., 2012; Vezzani és Viviani, 2015). Elmondható, hogy a receptorukhoz kötött citokinek (különös tekintettel a legtöbb esetben vizsgált IL-1B, IL-6 és TNF $\alpha$ ) számos jelátviteli útvonal és központi szignál transzdukciós molekula bevonásával (pl. NF $\kappa$ B, extracelluláris

szignál-regulált kináz (ERK), protein kináz C (PKC), proto-onkogén tirozin-fehérje kináz (Src)) képesek befolyásolni gyakorlatilag a szinaptikus transzmisszió összes aspektusát, a neurotranszmitter ürüléstől a neurotranszmitter receptor szám szabályozásig (Miller és mtsai., 2013). Az idegsejt hálózatok aktivitásának hiperszinkronná válása tekintetében nagyon fontos, hogy a citokinek bizonyítottan képesek hatékonyan modulálni az idegsejtek membránpotenciálját számos feszültségfüggő ioncsatorna (így több feszültségfüggő Na<sup>+</sup>-, Ca<sup>2+</sup>- és K<sup>+</sup>-csatorna) működését befolyásolva (összefoglalva, Vezzani és Viviani, 2015). Érdekes módon, a citokinek közül ebben a vonatkozásban talán legjobban karakterizált molekula, az IL-1B más jelátviteli útvonalak aktivációját okozza receptorához kötődve neuronokban és asztrocitákban (Huang és mtsai., 2011). Az egyre növekvő számú kísérletes, elektrofiziológiai és molekuláris biológiai munka tehát bizonyítékot és mechanisztikus magyarázatot szolgáltatott több immunmediátor molekula neuronális serkentetőségre gyakorolt hatásáról, amely segíthet a rohamok neuroimmunológiai kölcsönhatásban gyökerező kialakulásának megértésében. Az epileptogenezis gyulladással összefüggő, sejtes és molekuláris mechanizmusainak összefoglalása a 7. ábrán látható.

Végül fontos hangsúlyozni, hogy az epilepszia pathogenezisében számos más, genetikai és a gyulladástól eltérő, környezeti faktor is szerepet játszhat.



**7. ábra.** A gyulladásos folyamatok szerepe az epilepszia pathofiziológiás folyamataiban. A perifériás vagy centrális káros hatások következtében aktiválódó leukociták, illetve gliális és neuronális sejtek gyulladásos mediátorok (pl. interleukinek, kemokinek, adhéziós molekulák, komplement komponensek, tumor nekrosis faktor (TNF), nagy mobilitású csoport fehérje 1 (HMGB1), ciklooxygenáz (COX)) szekrécióját végzik. A perifériás és centrális gyulladásos állapot egyaránt elősegíti a vér-agy gát sérülését, amely, többek közt, albumin és immunoglobulin G (IgG) fehérjék beáramlását és a lokális kálium és glutamát homeosztázis felborulását okozza – melyben az asztrocitális TGF- $\beta$  szignalizáció, és további asztrocitális pro-inflammatorikus molekulák szekréciója is szerepet játszik. A glutamát- és gamma-aminovajsav (GABA)-homeosztázis felborulásához hozzájárulnak gyors változások a neuronális glutamát és GABA receptorok, valamint az asztrocitális glutamát szekréció zavara révén, melyet a neuronális proto-onkogén tirozin-fehérje kináz Src (Src), foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) és mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), valamint az asztrocitális



foszfolipáz A2 (PLA2) jelátviteli útvonal befolyásol. A hosszú távú, neurogenezist, és angiogenezist is érintő módosulásokban komoly szerepe van a nukleáris faktor-kappa B (NFκB) és aktivátor fehérje 1 (AP1) által működő kaszkádoknak. Az így megnőtt neuronális excitabilitás fokozott rohamkeletkezést, ennek következtében sejthalált és további gyulladás folyamatokat indukál, amely „ördögi körben” vezet a tartós epilepsziás állapot kifejlődéséhez (Vezzani és mtsai., 2011, nyomán).

### **2.3.2. Az abszensz epilepszia jellemzőinek és állatmodelljeinek bemutatása**

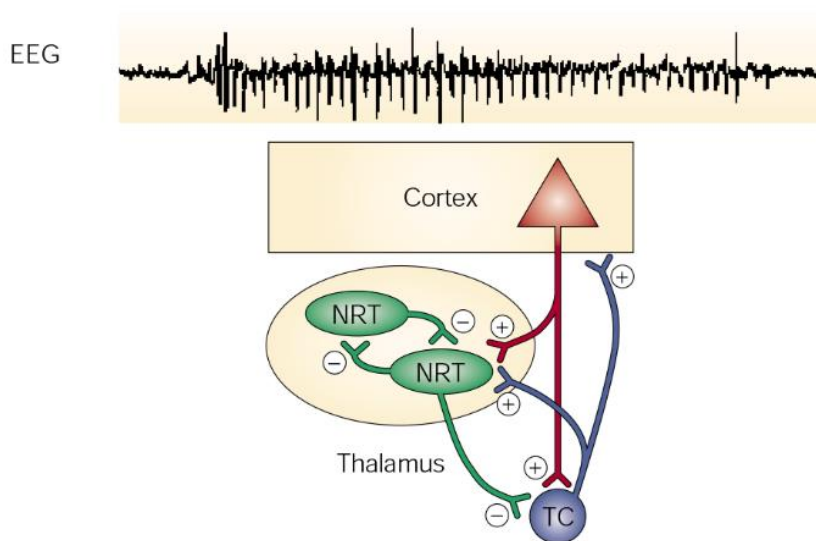
Az abszensz epilepszia (régábbi elnevezéssel: „petit mal” epilepszia) a generalizált rohamok családjába tartozó, főleg gyerek-, illetve juvenilis korban jelentkező betegség. A két életkorban fellépő kórkép tüneteit és indukcióját tekintve is eltér (Hughes, 2009). Általánosságban elmondható, hogy az abszensz epilepsziában szenvedő páciensek a rohamok megjelenésekor rövid ideig, nagyjából 5-20 másodpercig tartó, betegség típusonként eltérő mértékű tudat- és eszméletvesztést élnek át, sokszor az izomtónus megváltozásával, illetve akaratlan izomkontrakció- és relaxáció fellépésével. A klinikailag fontos izomgörcsök (myoklónus) jelenléte, egyéb tünetek mellett, külön betegségeket definiál a legújabb klasszifikáció szerint (Berg és mtsai., 2010). Az abszensz epilepsziás rohamok jól karakterizálhatók elektroencefalográfia (EEG) segítségével, mivel a rendkívül speciális, ún. túske-hullám kisülések („spike-wave discharge”, SWD) detektálhatók megjelenésükkor, tehát az ún. iktális periódusban (Panayiotopoulos, 1999). Klinikai és elektrofiziológiai jellemzők alapján is megkülönböztethető az ún. típusos és atípusos abszensz epilepszia. Az első esetben 3 Hz frekvenciájú SWD detektálható a rohamok alatt, míg az atípusos abszensz epilepszia esetén 2,5 Hz, illetve az alatti frekvenciájú, időnként szabálytalan SWD a domináns. Az atípusos abszensz epilepsziás rohamok során a páciensekre jellemző, hogy jelentősen lecsökken a környezeti ingerekre adott válaszkészség, ugyanakkor a tudatvesztés nem mindig lép fel (Tenney és Glauser, 2013). A nap folyamán többször is kialakuló rohamok megjelenése leggyakrabban szabálytalan ritmusban történik, ugyanakkor, altípusonként eltérő valószínűséggel, de kiváltó oka lehet sok esetben a szapora légzés (hiperventilláció), illetve vizuális stimuláció (Hughes, 2009).

Az abszensz epilepszia, mint sok más epilepsziás kórkép, nagymértékben genetikai tényezők által meghatározott betegség (Gardiner, 1990). A betegség régóta ismert, nagyfokú örökölhetősége mögött (amelyeket humán ikervizsgálati eredmények is alátámasztottak;

Lennox és Jolly, 1954), évtizedekkel ezelőtt is több genetikai faktor szerepét feltételezték (Doose és mtsai., 1973). Később leírták, hogy az érintett gének között számos feszültségfüggő- és ligandvezérelt ioncsatorna szerepel, így többek közt feszültségfüggő, T-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna, feszültségfüggő  $\text{Cl}^-$ -csatorna és GABA-receptor alegységet kódoló gének (összefoglalva, Hughes, 2009), amelyek egyértelműen befolyásolhatják az idegsejtek excitabilitását. A legtöbbször hangsúlyozott GABA-receptor és  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna mutációk mellett, humán genetikai vizsgálatokban számos olyan genetikai polimorfizmust írtak le, köztük ionotróp és metabotróp glutamát, nikotinos acetilkolin receptor alegységeket, feszültségfüggő  $\text{Na}^+$ - és  $\text{K}^+$ -csatornákat, illetve neurotranszmitter transzportereket kódoló génekét, amelyek potenciálisan összefüggenek a betegség megjelenésével (összefoglalva, Crunelli és Leresche, 2002). A genetikai komponens szerepe az abszensz epilepszia állatmodelljeinek felismerésekor, illetve fejlesztésükkor is kulcsfontosságúnak bizonyult.

Az abszensz epilepszia pathomechanizmusának vizsgálatával kapott eredmények alapján a betegség elsősorban az abnormális kortiko-thalamo-kortikális szinkronitásban gyökerezik, ugyanakkor az agykéreg és thalamus rohamok iniciációjában játszott szerepe évtizedek óta vita tárgyát képezi (történeti összefoglalás, Avoli, 2012 közleményében). Az egyik legrégebbi, az '50-es években megalkotott ún. centrencephalikus teória értelmében a középvonali thalamus tehető felelőssé a hiperszinkronitás iniciációjáért (Penfield és Jasper, 1954). A thalamus központi szerepét hangsúlyozta az ún. „thalamikus óra” elmélet, amely rámutatott a thalamus retikuláris magjában található „pacemaker” sejtek tüzelése által generált, a nagyagykéregbe is áttérjedő ritmus jelentőségére (Buzsáki, 1991). A thalamikus teória létjogosultságát azonban számos kísérletes és klinikai vizsgálat megkérdőjelezte a '60-as évektől kezdődően, amely több ún. kortikális teória megszületését eredményezte (összefoglalva, Meeren és mtsai., 2005). A szintén a '60-as években született ún. kortikoretikuláris elmélet pedig rámutatott, hogy a hiperexcitabilis nagyagykéreg a thalamokortikális neuronok ritmikus tüzelésének hatására nem alvási orsók, hanem az SWD-k megjelenését okozza (Gloor, 1968). A kortikális és kortikoretikuláris teóriák egyesítése hívta életre az egyik legújabb, ún. kortikális fókusz hipotézist, amely a somatosensoros agykéreg iniciáló szerepét mondja ki, elsősorban az abszensz epilepszia patkány állatmodelljein végzett vizsgálatok alapján (Meeren és mtsai., 2005). Az anatómiailag és funkcionálisan intakt thalamokortikális kapcsolatok (8. ábra) tehát előfeltételeit képezik a generalizált, abszensz rohamok megjelenésének – a fókuszpontot érintő teóriák közti ellentmondásoktól függetlenül. Természetesen a rohamok nem függetlenek egyéb olyan agyterületektől, mint például a substantia nigra, illetve a striatum, amelyek bidirekcionális

direkt, illetve indirekt kapcsolatban állnak a thalamus-szal és a nagyagykéreggel (Lenkov és mtsai., 2013).



**8. ábra.** A thalamokortikális kapcsolatrendszer vázlatos bemutatása. Az abszensz epilepsziás betegekre jellemző, elektroencefalogramon (EEG) detektálható pathológiás szinkronitás a thalamokortikális hálózat zavarában gyökerezik. A hálózatban a kortikális

piramis sejtek serkentő bemenetet küldenek a thalamus thalamokortikális neuronjai (TC) felé, amelyek szintén glutamáterg szinapszisokat hoznak létre a kortikális piramis sejtekkel. Az agykérgi piramis sejtek ugyanakkor kollaterálisokat adnak a nucleus reticularis thalami (NRT) gátló sejtjeinek is. Az NRT sejtjei kollaterálisokat kapnak továbbá a TC sejtektől is. A kortikális piramis sejtek és TC neuronok közti kommunikációt befolyásolják az NRT idegsejtek a TC sejtek, illetve egymás gátlásán keresztül (Crunelli és Leresche, 2002, nyomán).

A betegség vizsgálatához, sokáig rendkívül elterjedt volt a rohamok kémiai úton történő indukciója, így például a penicillin macskamodell (Fisher és Prince, 1977), illetve a pentiléntetrazol és egyéb farmakológiai rágcáslómodellek (Snead, 1992). Később kimutatták, hogy bizonyos egértörzsek, például a „tottering”, „stargazer”, vagy a „lethargic”, abszensz rohamok generálására hajlamosak (összefoglalva, Frankel, 1999). Az említett egerekre jellemző számos egyéb, elsősorban motoros zavar miatt azonban a humán epilepsziás kórkép modelljeként való alkalmazhatóságuk kérdéses volt. Fontos lépés volt a megfelelő állatmodell keresésében, hogy felfedezték, az állatkísérletes kutatómunkákban általánosan használt Wistar patkánytörzs spontán SWD generálására hajlamos (Vergnes és mtsai., 1982). A SWD-genezist mutató állatok szelektív keresztezésével sikerült létrehozni az abszensz epilepszia egyik legáltalánosabban használt patkány állatmodelljét, az ún. strasbourgi, genetikailag abszensz epilepsziára hajlamos patkányokat (GAERS) (Marescaux és mtsai.,

1992). Egy másik, hasonló megfontolások alapján létrehozott törzs, az ún. Wistar-Albino-Glaxo/Rijswijk (WAG/Rij) patkánytörzs (van Luijteleaer és Coenen, 1986) szintén széleskörűen használttá vált az elmúlt három évtizedben. Az abszensz epilepsziában szenvedő páciensekkel ellentétben ugyanakkor a patkány állatmodellekben a rohamok megjelenése nem korlátozódik a gyermek-/juvenilis korra, hanem későbbi megjelenés (GAERS törzs: ~30. naptól kezdve, WAG/Rij törzs: ~75. naptól kezdve), illetve a kor előrehaladtával egyre növekvő rohamszám jellemző (Crunelli és Leresche, 2002). Eltérés továbbá, hogy az SWD-k frekvenciája magasabb az egér (5-7 Hz) és patkány (7-11 Hz) állatmodellekben is a betegeknél tapasztaltaknál (Crunelli és Leresche, 2002). A klinikumban is alkalmazott antiepileptikus kezelés hatásosnak bizonyult a rohamok kialakulásának meggátlására az említett rágcslómodellekben, így ezek az állatmodellek alkalmasak lehetnek új antiepileptikus szerek tesztelésére (Löschner, 2011). Mind az egér (Frankel, 1999), mind a patkánytörzsekben (Gauguier és mtsai., 2004; Rudolf és mtsai., 2004) sikerült kimutatni több olyan genetikai eltérést, amelyek összefüggésbe hozhatók a rohamok megjelenésével. A leírt genetikai mutációk sok esetben átfedést mutattak a humán populációban felfedezett polimorfizmusokkal, illetve mutációkkal. Mindezek alapján különösen hangsúlyos a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$ -csatorna fehérjét kódoló gének mutációjában, illetve a fehérjék expressziójában megnyilvánuló eltérések szerepe (Cain és Snutch, 2010; Zamponi és mtsai., 2010). Az elsősorban patkány állatmodellekben leírt genetikai eltérések összevetése a humán populációból származó genomikai adatokkal utat nyithat e multigénes betegség kialakulásának jobb megértéséhez. Összességében elmondható, hogy a rágcslómodellek validitását erősíti a genetikai háttér szerepe az abszensz epilepszia kifejlődésében, valamint a humán páciensekre is jellemző spontán roham-genezis, szemben a korábban alkalmazott farmakológiai modellekkel, amelyek sokkal inkább az epilepsziás rohamoknak, mintsem az epilepsziának, mint krónikus betegségnek a vizsgálatára alkalmasak.

Kutatócsoportunkban és együttműködő laboratóriumokban végzett korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a szisztémás LPS-beadás növeli az SWD-aktivitást WAG/Rij (Kovács és mtsai., 2006) és GAERS, valamint Long-Evans patkányokban (Kovács és mtsai., 2014), amely hatás kialakulása nem-szteroid gyulladásgátlókkal megakadályozható. Hasonlóan a perifériás gyulladás-indukcióhoz, az SWD-aktivitás fokozható központi, intracerebroventrikuláris LPS-beadás által is WAG/Rij patkányokban (Kovács és mtsai., 2011).

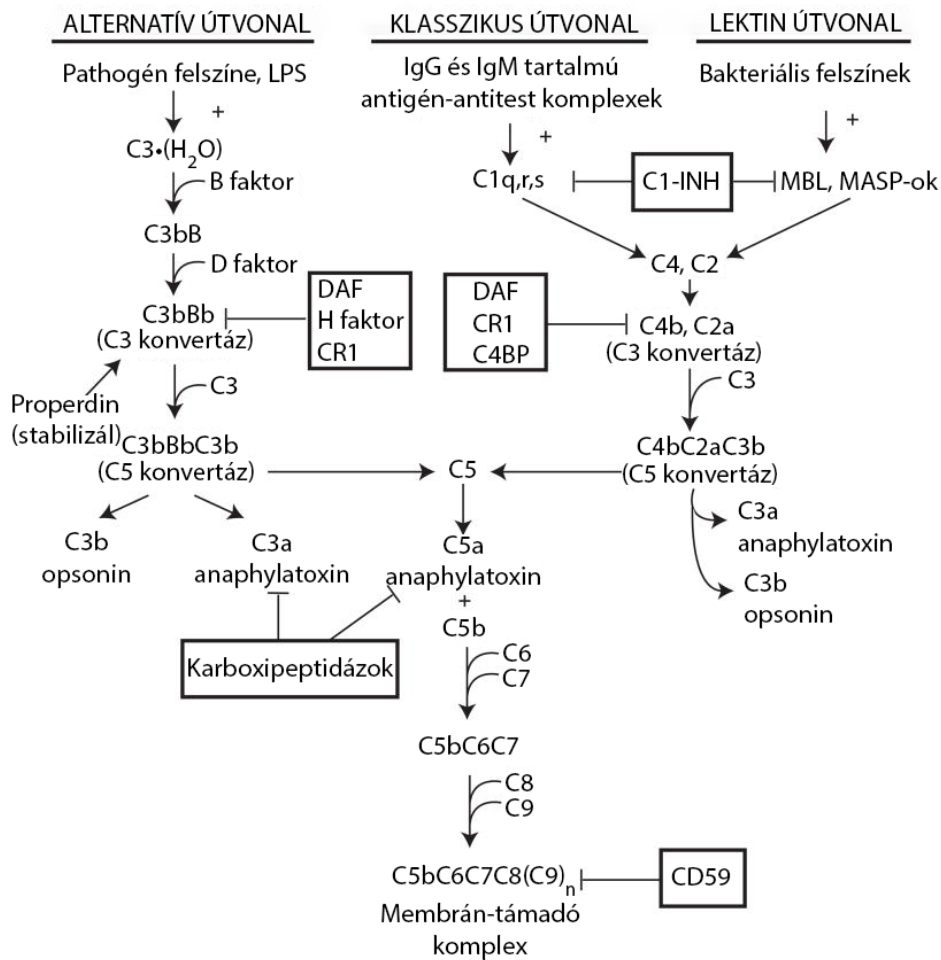
A neuroimmunológiai kölcsönhatás zavara tehát komoly kockázati tényezőt jelent az epilepszia, így az abszensz rohamok megjelenését tekintve – elsősorban az ezt elősegítő genetikai háttérrel rendelkező páciensek esetében. A gyulladásos mediátorok szisztémás és

lokális jelenlétének leírása, immunaktivációt kiváltó környezeti események szerepének felismerése és az immunrendszer-asszociált molekulák genetikai eltéréseinek kimutatása mind ezt erősítették meg az elmúlt évtizedekben. A kutatási terület terápiás jelentőségét pedig jól mutatja, hogy egyre inkább a fejlesztések fókuszába kerül a gyulladáscsökkentő antiepileptikus gyógyszerek tervezése (Vezzani, 2015).

## **2.4. Az immunrendszer elemeinek fiziológiás és kóros szerepe a központi idegrendszerben – a komplementrendszer és a szinapszisok eltávolítása**

### **2.4.1. A komplementrendszer elemeinek rövid bemutatása**

A több mint 30 fehérjéből álló komplementrendszer (Ricklin és mtsai., 2010), a már említetteknek megfelelően a klasszikus, alternatív és lektin útvonalakon keresztül aktiválódhat és a fagocitózisra képes sejtek számára kijelöli (opszonizálja), illetve elpusztítja a szervezetbe jutó patogéneket és egyéb eltávolítandó sejtjes elemeket. A komplementrendszer többek közt inaktív zimogén fehérjékből áll, amelyek egymást szabályosan követő, proteolitikus hasítása következtében aktiválódhat a rendszer. A klasszikus útvonal beindításához a leggyakrabban az antigén és az azt kötő ellenanyag által alkotott komplex szükséges, amelyet az ún. C1 komplexhez tartozó C1q fehérje ismer fel. Az alternatív útvonal, ezzel szemben a C3 komponens spontán hidrolízise következtében, illetve idegen-eredetű fehérjék, lipidek és szénhidrátok kötése révén aktiválódik. Végül, a lektin útvonal a patogénnek felszínén található szénhidrátokat kötő mannóz-kötő lektinek (MBL) és fikolinok segítségével inicializálódik (összefoglalva, Sarma és Ward, 2011). A három útvonal azonban szigorúan nem különül el egymástól, illetve e kaszkádokat számos szabályozó fehérje is gátolhatja (pl. H faktor (Ferreira és mtsai., 2010)) vagy éppen serkentheti (pl. C-reaktív protein, pentraxin 3 (Gewurz és mtsai., 1995)). A három útvonal aktiválódása egyaránt a C3 fehérjén konvergál, majd a kaszkádok közös útvonalának végén alakulhat ki a patogén elpusztítására képes membrán-támadási komplex (MAC) (Müller-Eberhard, 1988). A komplement kaszkád folyamatainak összefoglalása a 9. ábrán látható.



**9. ábra.** A komplementrendszer útvonalainak összefoglalása. Az alternatív, klasszikus és lektin útvonalak összességében rendkívül heterogén ágensek ellen képesek a komplementrendszer aktivációjára, mely kaszkád opsoninok, anaphylatoxinok, illetve az eltávolítandó sejt/mikroorganizmus elpusztítására létrehozott membrán-támadó komplex kialakításával vesz részt a veleszületett immunitásban. A komplement kaszkád komponensein (C1q, C1r, C1s, mannóz-kötő lektin (MBL), mannóz-kötő lektin szerin proteáz (MASP), illetve C2, C3, C4, C5, valamint hasítási termékeik és komplexeik, végül, C7, C8, C9) túl szabályozó faktorok (B faktor, D faktor, properdin) szükségesek a komplement-aktivációhoz. A rendszert számos ponton szabályozó elemek (lebontást elősegítő faktor (DAF), H faktor, komplement receptor 1 (CR1), C1-inhibitor (C1-INH), C4-kötő fehérje (C4BP), karboxipeptidázok és CD59 fehérje) tartják féken (Sarma és Ward, 2011, nyomán).

## 2.4.2. A komplementrendszer szerepe a szinapszisok eltávolításában

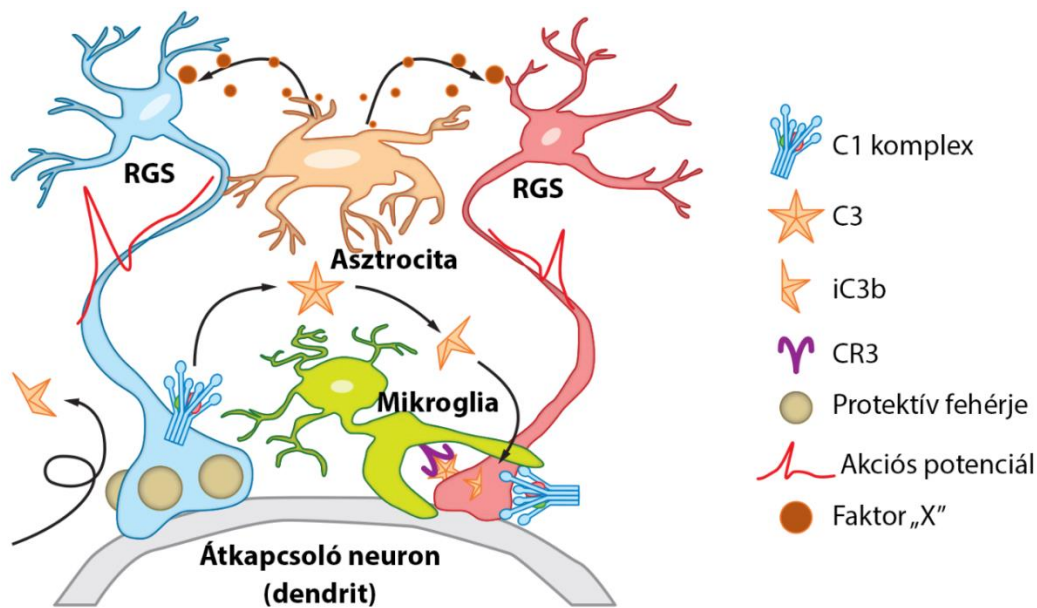
Korábbi vélekedések alapján feltételezték, hogy a komplementrendszer szerepe a KIR-ben az immunrendszer aktivációjával járó pathológiás, gyulladási és degeneratív folyamatokra korlátozódik (Morgan és Gasque, 1996). Meglepetésre, az elmúlt körülbelül két évtizedben napvilágot látott számos olyan kutatási eredmény, amelyekben bizonyították, hogy a komplementrendszer, illetve sok azt szabályozó molekula expresszálódik az elsődleges forrásnak számító májon kívül a KIR-ben is (összefoglalva, Barnum, 1995; Morgan és Gasque, 1996). Ezekben a vizsgálatokban a fehérjék szintézisét elsősorban az asztrocitákban és mikroglia sejtekben, kisebb mértékben pedig idegsejtekben és oligodendrocitákban mutatták ki. Fontos megemlíteni, hogy a korábbi értelmezés szerint a KIR-i komplement-szintézis elsődleges célja a pathológiás hatásra adott gyors immunreakció biztosítása (Morgan és mtsai., 1997). Mindezzel összhangban állt az a régóta ismert jelenség, miszerint a komplement-aktiváció és komplement fehérjék fokozott szintézise kiváltható pathológiás körülmények között, mint a traumás agysérüléskor (Stahel és mtsai., 1998), agyi ischaemia esetén (D'Ambrosio és mtsai., 2001), fertőzések hatására (Stahel és Barnum, 1997) és krónikus neurodegeneratív betegségek, így az Alzheimer-kór következtében (Emmerling és mtsai., 2000), továbbá, *in vitro* körülmények között, pro-inflammatorikus faktorok hatására (Lévi-Strauss és Mallat, 1987; Rus és mtsai., 1992; Perissutti és Tedesco, 1994).

A vizuális rendszer ontogenezisének nagy-áteresztőképességű, molekuláris biológiai vizsgálata során azonban meglepetésre fokozott C1q expressziót fedeztek fel a retinális ganglionsejtekben fiziológiás körülmények között is (Stevens és mtsai., 2007). E nagyhorderejű kutatásban felismerték, hogy a komplementrendszer klasszikus útvonala alapvető fontosságú a retinális ganglionsejtek és a thalamikus relésejtek közti szinapszisok számának fiziológiás szintű, az ontogenezis során programozott szabályozásában. A klasszikus útvonal első eleme, a mintázat-felismerő molekulaként funkcionáló C1q fehérje képes hozzákötödni bizonyos szinapszisokhoz, amelyeket így opsonizál. A C1q-kötés a C3 komplement komponens lerakódását és hasítását eredményezi, és végül a specifikus komplement-receptorokkal (pl. C3-receptor) bíró mikroglia sejtek a kijelölt szinapszisokat fagocitálják. Mindebben asztrociták által szekretált parakrin faktorok, így a TGF- $\beta$  is szükségesek (Bialas és Stevens, 2013). A szinaptikus fagocitózisért felelős mikroglia sejtek a komplement-jellel ellátott szinapszisokat, azok aktivitásának függvényében, szelektíven távolítják el (Schafer és mtsai., 2012). E jelenséget magyarázó modell értelmében tehát a vizuális rendszer ontogenezisének szerves részét képező szinapszisszám csökkenés

háttérben a kevésbé aktív szinapszisok szelektív eltávolítása zajlik (10. ábra; Stephan és mtsai., 2012). A szinaptikus plaszticitás e formájában, a szinaptikus átvitel precíz szabályozásáért szorosan együttműködnek a lokális asztriciták és mikroglia sejtek az extracelluláris komplement fehérjék nélkülözhetetlen közreműködésével. Az egyedfejlődés alatti, fiziológiás és komplement-függő szinapszisszám csökkenés jelentőségét az is mutatja, hogy a transzgenikus, C1q fehérjét nem expresszáló („C1q-knock out”) egerek, a számfeletti szinapszisokkal összefüggő hiperkonnektivitás következtében, epilepsziás rohamok genézisére hajlamosak (Chu és mtsai., 2010; Ma és mtsai., 2013). Leírták továbbá, hogy a C1q fehérje mennyisége a KIR-ben a kor előrehaladtával folyamatos növekedést mutat, habár a jelenség egzakt magyarázata még nem ismert (Stephan és mtsai., 2013).

A komplement fehérjék expresszióját, majd szekréciójukat követő hatásuk sejtspecifikusságának vizsgálatát célzó kutatások eredményei szintén megerősítik a komplementrendszer speciális hatását az idegsejtekre. A komplementrendszer bizonyos elemeinek szintézisére és a kaszkád aktivációjára a neuronok (Thomas és mtsai., 2000), asztriciták (Gasque és mtsai., 1995) és oligodendrociták (Hosokawa és mtsai., 2003) meglepően nagymértékben képesek, a komplement-aktiváció által indukált sejtlízisre az asztriciták mégis sokkal kevésbé érzékenyek, mint e másik két sejtípus (Morgan és Gasque, 1996; Rogers és mtsai., 1996). Ismert továbbá, hogy a C1q fehérje elsősorban az idegsejtekhez kötődik (Fonseca és mtsai., 2004a). A neuronális felszínhez kapcsolódást nagymértékben befolyásolja a felszíni szénhidrát-láncok által alkotott ún. „glycocalyx”, köztük bizonyítottan a sejtfelszíni szialinsav (Linnartz és mtsai., 2012). A szinapszisok komplement-, pontosabban C1q-mediált fagocitózist pedig kizárólag mikroglia sejtek és nem asztriciták végzik (Chung és mtsai., 2013).





**10. ábra.** A kevésbé aktív szinapszisok komplement-mediált, szabályozott eltávolítása a fejlődő vizuális rendszerben. A retinális ganglion sejtek (RGS) az egyedfejlődés kezdetén számfeletti szinaptikus kapcsolatokat képeznek a thalamus dorsalis corpus geniculatum laterale régiójának átkapcsoló neuronjaival. E kapcsolatok programozott eltávolításakor előnyt élveznek az erősebb szinaptikus kontaktusok. A szinapszis-eltávolítás során asztrocitális faktor(ok) (faktor „X”) megnövelik az RGS-ek C1 komplex szintézisét és szekrécióját, amely az alacsonyabb szinaptikus átvitelt mutató, protektív fehérjét nem tartalmazó szinapszisokhoz kötődik. Ennek következtében a C3 komplement komponens iC3b fragmense kijelöli e szinapszisokat mikroglialis fagocitózisra, mely immunsejtek rendelkeznek a felismeréshez szükséges CR3 receptorokkal (Stephan és mtsai., 2012, nyomán).

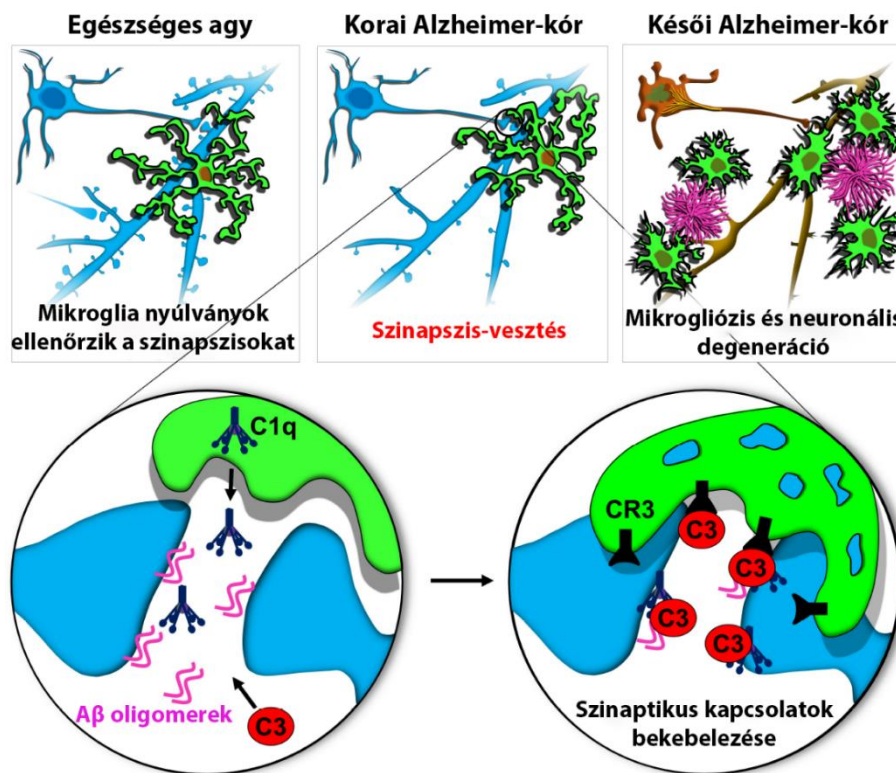
A C1q fehérje felhalmozódása a súlyos neurodegeneratív betegség, Alzheimer-kór pathomechanizmusában kulcsfontosságú kóros fehérjeaggregátumok, így amiloid-plakkok (Eikelenboom és mtsai., 1989) és neurofibrilláris kötegek (Afagh és mtsai., 1996) környezetében régóta ismert, azonban a korábbi munkákban ennek jelentőségét csak a fehérjeaggregátumok által indukált gyulladásos reakcióban feltételezték. Az Alzheimer-kór és a C1q-indukált komplement-aktiváció közti kapcsolat feltárására létrehozott kísérleti állatmodellen, az amiloid- $\beta$ -túltermelő, ugyanakkor, C1q-t nem expresszáló egérmodelleken végzett vizsgálatok rámutattak, hogy a C1q fehérje hiánya ugyan nem befolyásolja az amiloid- $\beta$  aggregátumok felhalmozódását, ellenben korlátozza az idő előrehaladtával jellemző, fokozódó szinapsziszám-vesztést és mikrogliózist (Fonseca és mtsai., 2004b). A

korábban uralkodó nézet szerint a kóros fehérjeaggregátumok megjelenése előtt a C1q fehérje előnyös, neuroprotektív hatású a sejttermelékek eltávolításának elősegítése által, viszont az amiloid-plakkok, illetve neurofibrilláris kötegek felhalmozódása során hozzájárul egy káros, pro-inflammatorikus állapot kialakításához (Tenner és Fonseca, 2006).

Napjainkban a komplement-mediált szinapszisszám-vesztésre fókuszáló kutatások számának növekedésével mélységeiben is egyre inkább sikerült feltárni a jelenség KIR-i betegségekben játszott szerepét, amely szemléletváltáshoz is vezetett. Amióta ismertté vált, hogy a komplementrendszer klasszikus útvonala képes a szinapszisok eltávolításának iniciálására (Stevens és mtsai., 2007), felmerült a lehetősége annak, hogy a komplement-aktiváció a szinapszis- és neuronszám-vesztést nemcsak a fehérjeaggregációt követő gyulladásos reakcióban funkcionálva segíti elő. A legújabb eredmények pedig valóban alátámasztották ezt a teóriát. Transzgenikus, amiloid- $\beta$ -túltermelő, illetve vad típusú, valamint C1q és C3 fehérjét kifejező, illetve C1q- és C3-hiányos állatokon végzett, lokális amiloid- $\beta$  beadással, és időzített, reverzibilis és szelektív C1q-gátlással kiegészített kísérletekben bebizonyították, hogy a szolubilis amiloid- $\beta$  oligomerek a plakkok megjelenése előtt szinaptikus C1q-felhalmozódást okoznak. A C1q-jelölés pedig szinaptikus C3-lerakódáshoz és a szinapszisok, C3-receptort kifejező mikroglia sejtek általi fagocitóziséhez vezet (Hong és mtsai., 2016). A mikroglia sejtek proliferációjának szelektív blokkolása szintén korlátozta a szinapszisok eliminációját az Alzheimer-kór transzgenikus egér állatmodelljeiben (Olmos-Alonso és mtsai., 2016; Spangenberg és mtsai., 2016). Az ún. fronto-temporalis demencia során jelentkező szinapszisszám-vesztésért (Lui és mtsai., 2016), és érdekes módon, az ún. nyugat-nílusi vírus által indukált memóriaromlásért, és kóros szinapszisszám-csökkenésért is (Vasek és mtsai., 2016) szintén ez a mechanizmus tehető felelőssé. Mindezek következtében megalkotható egy egyre inkább támogatott paradigma, amely szerint a kognitív hanyatlással járó betegségek, demenciák és neurodegeneratív kórképek kialakulásának egyik legelső fázisa a fiziológiásnál nagyobb mértékű szinapszisszám-vesztés, amelyet a lokális komplementrendszer és a mikroglia sejtpopulációk közreműködve idéznek elő (11. ábra). A komplementrendszer és a mikroglia sejtek együttműködésével kiváltott szinapszisszám-vesztés megakadályozása ígéretes terápiás lehetőséget nyújthat a neurodegeneratív betegségek kialakulásának, illetve progressziójának megállításában.

Mindezek mellett természetesen nem lehet megfeledkezni a komplementrendszer már említett, ontogenezisben és minden bizonnyal a felnőttkori plaszticitásban játszott szerepéről sem, amely azt sugallja, hogy a szinapszisok komplement komponensekkel való megjelölése

fiziológias körülmények között precízen szabályozott, míg „fékezetlenül” kiterjedt károkat okozhat.



**11. ábra.** A komplement-függő mikrogliális szinapszis-fagocitózis az Alzheimer-kór korai stádiumában. Az egészséges agyban a mikroglia sejtek motilis nyúlványaik segítségével folyamatosan monitorozzák a környezetükben található szinaptikus kapcsolatokat. Az Alzheimer-kór korai fázisában, az amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) oligomerek szinaptikus megjelenése következtében felerősödik a szinapszisok kijelölése mikrogliális fagocitózisra a komplement komponens C1q és C3 szinaptikus lerakódásával. A C3 receptorokat (CR3) expresszáló mikroglia sejtek pedig bekebelezik az így felismert szinapszisokat, mely már erőteljes szinapsziszám-vesztéshez vezet. Mindez megelőzi a késői Alzheimer-kórra jellemző patológiás elváltozásokat, így a plakk-képződés előrehaladásával párhuzamosan fokozódó mikrogliózist és neuronális degenerációt (Hong és mtsai., 2016, nyomán).

### 3. Célkitűzések

Kutatómunkánk célja a fentiekben bemutatott neuroimmunológiai interakciók molekuláris mechanizmusainak feltárása. Az intenzív vizsgálatok ellenére e kölcsönhatások által kifejtett, illetve az ezek háttérében álló molekuláris változások és folyamatok ismerete még rendkívül hiányos, így munkánkat nagy-áteresztőképességű, exploratív vizsgálati módszerrel indítottuk, amelyekkel a fehérjekészletre, illetve annak módosulására koncentráltunk. A továbbiakban bemutatott neuroimmunológiai kölcsönhatások proteomikai, nagy-áteresztőképességű vizsgálati eljárásáról alapvetően elmondható, hogy ún. „unbiased” megközelítést alkalmaz. E stratégia alapelve, hogy a mérési adatok alapján felállított munkahipotézisre fókuszál. A kísérlet során tehát nem egy, vagy néhány kitüntetett, a szakirodalmi információk alapján feltételezhetően releváns fehérje szerepére koncentráltunk, hanem a proteomikai eredményeket alapul véve alakítottuk további kutatómunkánkat.

#### 3.1. A prenatális immunaktiváció rövid és hosszú távú proteomikai hatásának vizsgálata

- A patkányban a gesztációs 13,5. napon, szisztémás, anyai LPS-kezelés hatására, 24 órával később, az embrionális telencephalonban bekövetkező molekuláris változások vizsgálata.
  - A kezelés hatására az embrionális telencephalon teljes szöveti proteomjában megjelenő változások kimutatása kétdimenziós differenciál gélelektroforézis (2-D DIGE) technikával és tömegspektrometriával.
  - A proteomikai eredmények vizsgálata független módszerrel.
  - Az eltérő mennyiségben kimutatott fehérjék funkcionális csoportosítása és a gyulladással összefüggő fehérjeváltozások értelmezése.
- Az előző pontban ismertetett prenatális immunaktiváció hatásának vizsgálata 35 napos, hím utódok szub-szinaptikus proteomjára.
  - Pre- és posztszinaptikus frakciók preparálása patkány nagyagykérgi mintákból, illetve a frakcionálás validálása különböző technikákkal.
  - A kezelés hatására a pre- és posztszinaptikus fehérjekészletben bekövetkező változások vizsgálata proteomikai módszerekkel, különböző gélelektroforetikus technikákat is felhasználva.
  - A proteomikai vizsgálat validálása független módszerrel.

- Az eltérő mennyiségben kimutatott fehérjék funkcionális csoportosítása és a fehérjekészletek bioinformatikai analízise.

### **3.2. A felnőttkori immunaktiváció hatásának proteomikai vizsgálata – a gyulladás epileptogenezist fokozó hatásának molekuláris háttere**

- Az abszensz epilepsziás rohamok generálására genetikailag fokozottan hajlamos, felnőtt WAG/Rij patkányoknak szisztémásan beadott LPS, teljes szöveti proteomra kifejtett hatásának kimutatása az epileptogenezisben elsősorban érintett két agyterületen, a fronto-parietalis agykéregben, illetve a thalamusban.
  - Az eltérő mennyiségben kimutatott fehérjék funkcionális csoportosítása.
  - A fehérjék szakirodalomból ismert kapcsolatainak vizsgálata az epilepsziával, gyulladással és az alvás-ébrenléti ciklussal.
  - A fehérjék szakirodalomból ismert kapcsolatainak vizsgálata a gyulladásos reakcióval összefüggő jelátviteli útvonalakkal, a perifériás gyulladás központi idegrendszeri hatásának jobb megértése érdekében.

### **3.3. Egy fiziológiás neuroimmunológiai interakció bemutatása: a komplementrendszer szinapszisok eltávolításában játszott, felnőttkori szerepének proteomikai vizsgálata**

- A komplementrendszer klasszikus útvonalát aktiváló C1q fehérje vizsgálata szinaptikus preparátumokon.
  - A C1q fehérje kimutatása felnőtt egerek nagyagykérgi szinaptoszómáinak felszínén.
  - A C1q fehérje kimutatása pre- és posztzinaptikus preparátumokban.
  - A C1q fehérje kimutatása humán *post mortem* agymintákban.
  - A potenciális C1q-kötőpartner, neuronális pentraxin 1 (Nptx1) kimutatása egér nagyagykérgi szinaptikus preparátumaiban.
  - A C1q és Nptx1 fehérjék kolokalizációjának vizsgálata.
- A C1q fehérjével ellátott, valamint a nem jelölt szinaptoszómák elkülönítése és a fehérjekészletük összevetése.
  - A C1q-jelölt és nem jelölt szinaptoszómák elválasztása fluoreszcencia-aktivált sejtszortírozás (FACS) segítségével, valamint az elválasztás validálása.

- A különválasztott szinaptoszóma populációk proteomjának összevetése 2-D DIGE technikával és a szignifikánsan eltérő mennyiségben jelenlévő fehérjék azonosítása tömegspektrometriával.
- A megváltozott fehérjék funkcionális csoportosítása.
- A C1q-jelölés háttérében álló molekuláris mechanizmusok bioinformatikai és kísérletes vizsgálata.

## **4. Anyagok és módszerek**

### **4.1. A felhasznált anyagok**

Az alapvető laboratóriumi vegyszereket a Sigma-Aldrich cégtől (St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) vásároltuk. Minden egyéb esetben, és speciális vegyszerek, eszközök, berendezések felhasználásának említésénél feltüntettük a gyártó nevét és származási helyét.

### **4.2. A kísérletekhez felhasznált állatok és kezelésük**

A következőkben felsorolt kísérletekben felhasznált állatokat standard laboratóriumi körülmények között tartottuk, 12-12 órás fény-sötét ciklusban (világos periódus: 8:00-tól 20:00-ig),  $22 \pm 2$  °C-os hőmérsékletű szobákban. Biztosítottuk az állatok táplálékhoz és folyadékhoz való szabad hozzáférését. A kísérletek alatt végig törekedtünk az állatok kontrollálatlan fertőződésének megakadályozására.

A következőkben felsorolt kísérletekben felhasznált állatok tartására és kezelésére minden esetben teljesültek a következőkben leírt követelmények. Az állatok tartása és kezelése során az Európai Közösségek Tanácsa 86/609/EEC kódú direktívájában, az „Állatok védelméről és kíméletéről” szóló, 1998. évi XXVIII. törvényben és az intézményi előírásokban foglaltak szerint jártunk el. Minden esetben törekedtünk az állatok szenvedésének és fájdalmának, valamint a felhasznált állatok számának csökkentésére.

#### 4.2.1. A felhasznált patkányok és kezelésük az 1. vizsgálatban

A kísérletekhez időre párosított, Wistar patkányokat használtunk (CrI:WI törzs; Toxi-Coop Zrt., Budapest, Magyarország). A vemhes patkányok kezelt csoportját ( $n = 6$ ) a gesztáció 13,5. napján kezeltük 1 ml foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldatban (PBS) oldott, intraperitoneálisan (i.p.), 20  $\mu\text{g}/\text{testtömeg kg}$  dózisban beadott lipopoliszachariddal (LPS; *Escherichia coli*, szerotípus: O111:B4; Sigma-Aldrich), míg a kontroll csoportot ( $n = 6$ ) azonos térfogatú PBS-sel. A kezelt és kontroll állatok rektális testhőmérsékletét óránként detektáltuk a következő 3 órában. A kezelt és kontroll állatok testhőmérséklete közti különbségek statisztikai analíziséhez kétmintás, kétvégű, Student-féle  $t$ -próbát használtunk.

A kezelést követően 24 órával a kezelt ( $n = 3$ ) és kontroll ( $n = 3$ ) állatok egy-egy csoportját 1 g/testtömeg kg dózisú uretán i.p. beadásával altattuk. Ezt követően az állatok hasüregét felnyitottuk, a méhüket kiproparáltuk és eltávolítottuk a 14,5 napos embriókat. A még a méhfalal és a magzatburkokkal körülvevett patkány embriókat először jéghideg, mesterséges agy-gerincvelői folyadékba (ACSF) helyeztük. Ezután egyesével kiproparáltuk az embriókat, és leválasztottuk azok kétoldali telencephalonjait. A vemhes anyánként ~12 embrióból származó telencephalon agymintákat  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a későbbi felhasználásukig.

A kezelt ( $n = 3$ ) és kontroll ( $n = 3$ ) anyák másik csoportja zavartalanul megellette kölykeit. A kölyköket a 25. posztnatális napon (P25) különválasztottuk anyjuktól, és nemenként elkülönítve, 3-4 tagú csoportokban tartottuk. A P35. napon 6 kezelt és 6 kontroll hím utódot (anyánként 2-2 utód) i.p. beadott, 1 g/testtömeg kg dózisú uretánnal altattuk. Az utódok agyát eltávolítottuk, jéghideg ACSF-ben rövid ideig mostuk, majd szárazjéggel hűtött Petri-csészén leválasztottuk a kétoldali nagyagykérgeket. A nagyagykéreg mintákat  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a felhasználásukig. Négy kezelt és 4 kontroll, P35 napos hím utódot szintén altattuk, majd transzkardiálisan perfundáltuk azokat. A perfúziót előbb PBS-sel, majd 4% (wt/vol) formaldehid, 0,1 M foszfát puffer (PB), pH 7,4 oldattal végeztük, és a perfundált agyakat eltávolítottuk immunhisztokémiai vizsgálatra való felhasználásra.

A kísérlet során alkalmazott szubcelluláris frakcionálási eljárás validálásához további felnőtt, hím Wistar patkányokat használtunk fel.

#### **4.2.2. A felhasznált patkányok és kezelésük a 2. vizsgálatban**

A kísérlethez 12 db, 6 hónapos, hím WAG/Rij patkányt (ELTE Savaria Egyetemi Központ, Szombathely, Magyarország) használtunk és az állatkísérletes munka Dr. Kovács Zsolttal (ELTE Savaria Egyetemi Központ) kollaborációban készült. A kísérlet kezdetén az állatokat 1 ml fiziológiás sóoldattal, i.p. úton kezeltük naponta egyszer, 3 egymást követő napon. A 3 napos kontroll periódus után a kezelt állatok csoportját ( $n = 6$ ) i.p., 1 mg/testtömeg kg dózisban alkalmazott, 1 ml fiziológiás sóoldatban oldott LPS-szel, míg a kontroll patkányokat ( $n = 6$ ) 1 ml fiziológiás sóoldattal kezeltük. A kezelt és kontroll állatokat 12 órával a beavatkozás után, i.p. beadott, 1 g/testtömeg kg dózisú uretánnal altattuk és agyukat eltávolítottuk. Az agyak ACSF-fel való mosása után, szárazjéggel hűtött Petri-csészén kipreparáltuk a kétoldali fronto-parietalis agykérgeket, valamint a thalamusokat. Az agymintákat  $-80\text{ °C}$ -on tároltuk a későbbi felhasználásukig.

#### **4.2.3. A felhasznált egerek és kezelésük a 3. vizsgálatban**

A kísérletekhez felnőtt (~4 hónapos), hím, Crl:NMRI BR egereket (Toxi-Coop Zrt.) használtunk. Cervikális diszlokáció után eltávolítottuk az agyat, majd azt rövid ideig jéghideg ACSF-ben mostuk. A kétoldali nagyagykérget ezután lehűtött Petri-csészén leválasztottuk, majd a kísérlet követelményeinek megfelelően, a mintát vagy  $-80\text{ °C}$ -on tároltuk, vagy a továbbiakban bemutatandó metodikai eljárásokra használtuk fel közvetlenül azokat.

Bizonyos kísérlek során elvégeztük az állatok transzkardiális perfúzióját is. Ekkor, rövid izoflurán-, majd uretán-altatást (1 g/ testtömeg kg dózis) követően, jéghideg ACSF-fel végeztük el az egerek transzkardiális perfúzióját. A vér ilyen módon történő eltávolítása után végeztük el az agy, majd a nagyagykéreg kipreparálását. Immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzéséhez pedig az egerek elaltatását követően a transzkardiális perfúziót előbb 0,1 M PB, pH 7,4, majd ezt követően, 2% (wt/vol) formaldehid, 0,1 M PB oldatokkal végeztük. Az agyat ezután eltávolítottuk a továbbiak során bemutatott immunhisztokémiai vizsgálatokhoz.

#### **4.3. Humán agyminták felhasználása**

A 3. vizsgálat során felhasznált humán agyminták a Humán Agyszövet Bank és Laboratóriumból származtak, amelyeket az intézmény vezetője, Dr. Palkovics Miklós



bocsátott rendelkezésünkre. Az alanyok neme, életkora, a halálok és a mintagyűjtésig eltelt, *post mortem* idő az 1. táblázatban szerepel.

Minta száma	Nem	Életkor	<i>Post mortem</i> idő	Halálok
#112	férfi	45	3 óra	Légzési elégtelenség
#178	férfi	43	4 óra	Öngyilkosság
#179	nő	70	6 óra	Guillain-Barré szindróma
#180	férfi	73	6 óra	Szívelégtelenség
#199	nő	76	6 óra	Szívelégtelenség
#213	férfi	75	5 óra	Szívelégtelenség

**1. táblázat.** A kísérleti alanyok adatai.

#### **4.4. A teljes szöveti minták feldolgozása és szubcelluláris frakcionálási eljárások**

##### **4.4.1. A teljes agyszöveti minták feldolgozása**

A teljes agyszöveti mintákat mechanikailag homogenizáltuk lízis pufferben (7 M urea, 2 M thiourea, 4% (wt/vol) CHAPS, 20 mM Tris, 5 mM magnézium-acetát), *Sample Grinding Kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, Anglia) alkalmazásával. A homogenizált mintákat ezután  $14\ 000 \times g$ -vel, 1 órán keresztül, 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszó fehérjéit acetonnal egy éjszakán át, -20 °C-on precipitáltuk. A fehérjéket másnap  $14\ 000 \times g$ -vel, 5 percig, 4 °C-on történő centrifugálással leüleptítettük. A felülúszó eltávolítása után a fehérje-pelletet lízis pufferben felszuszpendáltuk és a mintákat -80 °C-on tároltuk felhasználásukig.

##### **4.4.2. A szinaptoszóma frakció preparálása**

A szinaptoszóma frakció preparálása az először Phillips és mtsai., 2001 közleményében publikált, és Hahn és mtsai., 2009 által módosított, szacharóz denzitás-grádiens centrifugálási metodika szerint történt. A preparálás során a mintákat végig 4 °C-on tartottuk, és a homogenizálási lépésekhez előre lehűtött eszközöket használtunk. A nagyagykéreg mintákat először mechanikailag homogenizáltuk 10-10 µl proteáz- és foszfatázgátló koktélt (Sigma-Aldrich) tartalmazó, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 320 mM

szacharóz oldatban, *Dounce, small clearance* szöveti homogenizáló (Sigma-Aldrich) használatával. A homogenizátum szacharóz koncentrációját 1,25 M-ra állítottuk, és a mintára azonos térfogatú, 1 M szacharóz, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> oldatot rétegeztünk. Ezt követően a mintát ultracentrifugáltuk 100 000 × g-vel, 3 órán keresztül, 4 °C-on. A szinaptoszómák frakcióját az 1,25 M és 1 M szacharózt tartalmazó rétegek közötti határról, fecskendővel gyűjtöttük össze. A szinaptoszóma mintákon elvégzett direkt molekuláris biológiai vizsgálatokhoz a mintákat, a munka megkezdéséig -80 °C-on tároltuk. Ebben az esetben, a felolvasztást követően ultrahangos szonikálással a szinaptoszómákat roncsoltuk, a mintákhoz lízis puffert adtunk és a fehérjéit kicsaptuk a 4.4.1. *alfejezetben* leírtak szerint. A szinaptoszóma minták egyéb feldolgozásának leírása a következő alfejezetekben olvasható.

#### **4.4.3. Pre- és posztzinaptikus membrán frakciók preparálása**

A preparáláshoz az először Phillips és mtsai., 2001 közleményében publikált és Hahn és mtsai., 2009 által módosított szubcelluláris frakcionálási protokollt használtuk. A szubzinaptikus frakciók előállítására a 4.4.2. *alfejezetben* leírt metodika szerint preparált szinaptoszóma frakcióból történt. A preparálást közvetlenül a szinaptoszóma frakció előállítására után kezdtük, és a mintákat a munka során végig 4 °C-on tartottuk. A szinaptoszóma frakciót ötszörös térfogatú 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> oldatban felfuszpendáltuk és a mintát 15 000 × g-vel, 20 percig, 4 °C-on centrifugáltuk. A pelletet 5-5 µl proteáz- és foszfatázgátló koktélt tartalmazó, 20 mM Tris, pH 7,4 pufferben szuszpendáltuk és a mintát 3-szor 10 másodpercig szonikáltuk. A mintához végkoncentrációban 0,5% (wt/vol) digitonin, 0,2% (wt/vol) nátrium-kolat és 0,5% (vol/vol) NP-40 detergenset adtunk, majd 1 órán keresztül, 4 °C-on inkubáltuk azt. Ezt követően, előbb ötszörös térfogatú 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> oldatot, majd 5-5 µl proteáz- és foszfatázgátló koktélt tartalmazó, végkoncentrációban 20 mM Tris, 1% (vol/vol) Triton X-100, pH 6 puffert adtunk a mintákhoz. Újabb 30 percig, 4 °C-on történő inkubálás után, a szinaptikus mintákat 35 000 × g-vel, 20 percig, 4 °C-on ultracentrifugáltuk. Eltávolítottuk a detergens-kezelés hatására szolubilizált, pre- és posztzinaptikus citoplazmatikus komponenseket a felülúszóból, majd a pelletet 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> oldatban felfuszpendáltuk és az ez utóbbi, ún. szinaptikus junkció frakcióval dolgoztunk tovább. A mintáéval megegyező térfogatú, végkoncentrációban 20 mM Tris, 1% (vol/vol) Triton X-100, pH 8 puffer hozzáadása után a szinaptikus junkciók frakcióját 1 órán keresztül, 4 °C-on inkubáltuk. A magasabb pH-n történő detergens-kezelés hatására a pre- és

posztszinaptikus membrán elvált egymástól, amelyek elkülönítéséhez a mintát  $140\,000 \times g$ -vel, 30 percig,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on ultracentrifugáltuk. A felülúszóban kaptuk meg a preszinaptikus membránból és hozzá asszociált fehérje-komplexekből álló, preszinaptikus frakciót (PRE), míg a pelletben a posztszinaptikus membránból, és a posztszinaptikus denzitásból álló, posztszinaptikus frakciót (a frakció gyakori rövidítése szerint, a továbbiakban: PSD). A PRE frakciót fecskendővel leszívtuk, a PSD frakciót pedig  $0,1\text{ mM CaCl}_2$  oldatban felfuszpendáltuk. Az elektronmikroszkópos vizsgálatokra (lásd: 4.5. *alfejezet*) fel nem használt PRE és PSD preparátumok fehérjét a 4.1.1. *alfejezetben* leírtak szerint precipitáltuk, majd a mintákat  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

#### 4.5. Elektronmikroszkópos vizsgálat

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokat Kis Viktor (ELTE, TTK, Biológiai Intézet, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék) végezte.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokat a szubcelluláris fracionálási eljárásokkal kapott szinaptoszóma, szinaptikus junkció és PSD preparátumokon végeztük el. Frakciónként négy-négy párhuzamos minta elektronmikroszkópai vizsgálata történt. A fracionálás után, az eltérő sűrűségű szacharóz-oldatok közötti határon található szinaptoszómák frakcióját (lásd: 4.4.2. *alfejezet*), valamint a FACS-technikával gyűjtött szinaptoszómák populációját (lásd: 4.12. *alfejezet*), végkoncentrációban  $2\%$  (wt/vol) formaldehid (paraformaldehidből frissen depolimerizáltatva),  $1\%$  (vol/vol) glutáraldehid,  $0,1\text{ M Na-kakodilát}$  puffer hozzáadásával fixáltuk. Az ultracentrifugálási lépések után kapott szinaptikus junkció, illetve PSD preparátumokat (lásd: 4.4.3. *alfejezet*)  $0,1\text{ mM CaCl}_2$  oldatban szuszpendáltuk fel, majd hozzáadtuk a fenti összetételű fixáló oldatot. A mintákat minden esetben 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten a fixáló oldatban. A fixált mintákat leüleptítettük  $14\,000 \times g$ -vel, 20 percig, szobahőmérsékleten történő centrifugálással, a pelletet felfuszpendáltuk  $0,1\text{ M Na-kakodilát}$  pufferben, majd újból leüleptítettük. A pelletet  $0,5\%$  (wt/vol) ozmium-tetroxid,  $0,75\%$  (wt/vol) kálium-hexacianoferrát oldatban 45 percig utó-fixáltuk szobahőmérsékleten. A mintákat  $1\%$  (wt/vol) uranil-acetáttal *en bloc* festettük szobahőmérsékleten, 30 percig tartó inkubálással, majd dehidrált követően beágyaztuk *LR White* gyantában (Sigma-Aldrich) a gyártó utasításai szerint. A mintákból készített ultravékony metszeteket ( $70\text{ nm}$  vastag) réz mikrorostélyokra vittük fel (*300 mesh grid*; Sigma-Aldrich), majd 5 percig  $1\%$  (wt/vol) uranil-acetát, és 30 másodpercig ólom-citráttal kontrasztosítottuk azokat. A mikrorostélyokon

lévő mintákat *JEM-1011* elektronmikroszkóp (JEOL, Tokyo, Japán) segítségével vizsgáltuk. Az elektronmikroszkópban használt gyorsítófeszültség 60 kV volt.

A mintákról rögzített felvételeket 11 megapixeles *Olympus Morada* kamera (Olympus Corporation, Tokyo, Japán) és *iTEM* szoftver (Olympus Corporation) segítségével készítettük. Minden mintáról 10-10 felvételt készítettünk mikrorostélyonként, így frakciónként összesen 40 képet kaptunk.

A szinaptoszóma frakció manuális analíziséhez 40 különböző felvétel 5972 partikulumát vizsgáltuk meg, illetve klaszterezttük azokat.

#### 4.6. Western blot

Az alábbi alfejezetben bemutatjuk a jelenlegi munkában általánosan használt metodikát a kísérletekre specifikus jellemzők feltüntetésével.

Első lépésben meghatároztuk a minták fehérje koncentrációját *2-D Quant Kit* (GE Healthcare) segítségével, a gyártó utasításai szerint. Két kísérleti csoport adott fehérje mennyiségének Western blot technikával történő összehasonlításakor ugyanannyi fehérjét tartalmazó mintát vittünk fel a zsebekbe. A fehérje koncentráció meghatározása nem történt meg a FACS technikával elkülönített szinaptoszóma-populációk analízise során. Ez esetben azonos számú szinaptoszómát gyűjtöttük és használtunk fel, ugyanakkor a fehérje koncentráció megállapítására nem volt lehetőségünk az elérhető kis fehérje mennyiség miatt.

Az azonos mennyiségű fehérjét, illetve szinaptoszómát tartalmazó mintákhoz megegyező térfogatú, kétszeres töménységű mintakezelő puffert (8% (wt/vol) nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 3% (wt/vol) dithiothreitol (DTT), 24% (vol/vol) glicerin, 0,2% (wt/vol) brómfenol-kék, 100 mM Tris, pH 6,8) adtunk és 5 percig, 96 °C-on inkubáltuk azokat. A fehérjék elválasztása Tricin-SDS diszkontinuus poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) segítségével történt, Schagger, 2006 publikációja alapján. A felhasznált felső, ún. tömörítő gél akrilamid koncentrációja minden esetben 4% (wt/vol) volt, míg az alsó, ún. szeparáló gél az elválasztani kívánt fehérje méretétől függően különböző (15%, 12,5% vagy 10% (wt/vol)). Az SDS-PAGE-t követően a gélben elválasztott fehérjéket *Hybond-LFP PVDF* membránra (GE Healthcare) transzferáltuk. A membránt 5% (wt/vol) szarvasmarha szérum albumint (BSA) és 0,05% (vol/vol) Tween-20 detergenst tartalmazó, Tris-pufferelt fiziológiás sóoldatban (TBS) inkubáltuk 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten az aspecifikus fehérje-fehérje kötődés blokkolásához. A poliakrilamid gél 0,25% (wt/vol) *Coomassie*

*Brilliant Blue R-250* (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA, Amerikai Egyesült Államok), 50% (vol/vol) metanol, 10% (vol/vol) ecetsav vizes oldatával festettük. A blokkolás után a membránt elsődleges antitestet tartalmazó blokkoló oldatban inkubáltuk 4 °C-on, egy éjszakán át. A felhasznált elsődleges antitestek listája a jelen alfejezet végén található, a 2. táblázatban. A membránt másnap 0,05% (vol/vol) Tween-20 tartalmú TBS pufferben (TBS-T) mostuk, majd másodlagos antitestet tartalmazó TBS-T-ben inkubáltuk 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten. A felhasznált másodlagos antitestek listája szintén a 2. táblázatban található. Végül a membránt TBS-T-ben, majd TBS-ben mostuk. A fluoreszcens jel detektálásához *Typhoon TRIO+* szkennert (GE Healthcare) használtunk a fluorofóroknak megfelelő lézerek és szűrők alkalmazásával. A gélekpről készített felvétel rögzítését *GeneGenius Bioimaging System* (Syngene, Cambridge, Anglia) készülékkel végeztük.

A gél- és membrán-felvételek denzitometriás kiértékelését *ImageJ* szoftver (<http://imagej.nih.gov/ij/>; Abramoff és mtsai., 2004) segítségével végeztük. Kezelés hatására bekövetkező fehérjeszint változás igazolásakor használt denzitometriás kiértékelés során, a specifikus fehérjéhez tartozó fluoreszcencia intenzitás értékét minden esetben normalizáltuk a mintához tartozó teljes fehérje mennyiséghez (Coomassie Brilliant Blue R-250 festék intenzitása a gél megfelelő zsebéhez tartozó sávban). Ez a módszer lehetővé teszi az eredmények kvantifikálását az alapvető sejtes feladatokat ellátó, ugyanakkor esetlegesen változó mennyiségben jelenlévő ún. „housekeeping” fehérjék szintjére történő normalizálás nélkül (Eaton és mtsai., 2013). Szintén a teljes fehérje mennyiség kimutatásához *SYPRO Ruby Protein Blot Stain* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) reagenst is használtunk a gyártó utasításai szerint. A statisztikailag szignifikáns változások megállapításához kétmintás, kétvégű Student-féle *t*-próbát használtunk.

Antitest neve	Faj	Fajspecifitás	Hígítás	Katalógusszám és forgalmazó
Elsődleges antitestek				
anti-C1qA	nyúl	egér/patkány	1:200	sc-25856; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Amerikai Egyesült Államok
anti-C1QA	nyúl	humán	1:500	ab76425; Abcam, Cambridge, Anglia
anti-C1q	nyúl	egér	-	ab182451; Abcam
anti-Camk2a	egér	patkány	1:2 000	MA1-048; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok

anti-Clic1	nyúl	patkány/egér, stb.	1:500	PA5-41004; Thermo Fisher Scientific
anti-aktív kaszpáz 3	egér	humán/egér/patkány	-	STJ97448; St John's Laboratory, London, Anglia
anti-Mif	nyúl	egér, patkány	1:500	ab7207; Abcam
anti-Nptx1	kecske	egér/patkány/humán	1:200	sc-12122; Santa Cruz Biotechnology
anti-Nptx1	nyúl	humán/egér/patkány	1:200	20656-1-AP; Proteintech, Rosemont, IL, Amerikai Egyesült Államok
anti-Psd95	nyúl	egér/patkány/humán	1:2 000	04-1066; EMD Millipore, Billerica, MA, Amerikai Egyesült Államok
anti-Syp	egér	egér/patkány/humán	1:100	sc-55507; Santa Cruz Biotechnology
anti-Syp1	csirke	humán/patkány/egér	-	101 006; Synaptic Systems, Göttingen, Németország
anti-Vdac1	nyúl	egér/patkány/humán	1:2 500	AB10527; EMD Millipore
Másodlagos antitestek				
ECL Plex IgG-Cy5	kecske	nyúl	1:2 500	PA43009; GE Healthcare, Little Chalfont, Anglia
ECL Plex IgG-Cy3	kecske	egér	1:2 500	PA45011; GE Healthcare
IgG-CFL 488	szamár	kecske	1:1 500	sc-362255; Santa Cruz Biotechnology
IgG-Alexa Fluor 488	kecske	egér	1:1 000	A11001; Thermo Fisher Scientific
IgG-Alexa Fluor 488	szamár	nyúl	-	711-545-152; Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, Amerikai Egyesült Államok
IgY-Alexa Fluor 633	kecske	csirke	-	A-21103; Thermo Fisher Scientific

**2. táblázat.** A felhasznált antitestek listája. A feltüntetett hígítási arányok a Western blot technika során használt értékek, az antitestek más metodikáknál használt hígítási arányai az adott technika leírásánál szerepelnek.

## 4.7. Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis

A gél-alapú proteomikai vizsgálathoz 2-D DIGE technikát alkalmaztunk a GE Healthcare gyártó által kifejlesztett fluoreszcens festékek és speciális berendezések felhasználásával, a gyártó metodikai utasításait követve. A munkában izoelektromos fókuszáláson (IEF) és SDS-PAGE fehérjeszeparáláson alapuló, hagyományos kétdimenziós PAGE technikát, illetve benzildimetil-*n*-hexadecilammónium-klorid (16-BAC)- és SDS-PAGE-re épülő eljárást is alkalmaztunk. A 2-D DIGE technikához *Minimal Labeling* és *Saturation Labeling* festést használtunk. Az első festési eljárás során lehetőség van egy gélen megfuttatni és – normalizálást követően – összehasonlítani a kezelt és kontroll mintákat, a gyakorlatban ~25-50 µg fehérje felhasználásával. A második technika mindössze 5-5 µg fehérje fluoreszcens festését is lehetővé teszi, a kezelt és kontroll minták ugyanakkor külön géleken futnak, összevetésük viszont ebben az esetben is normalizálás után történik. A fluoreszcens fehérje-jelölési technikák elvi hátterei és a metodika részletei a következő, 4.7.1. alfejezetben olvashatók.

### 4.7.1. IEF/SDS-PAGE

A metodika első lépésében meghatároztuk a proteomikai analízisnek alávett 6-6 kezelt és kontroll minta fehérjekoncentrációját 2-D Quant Kit segítségével, a gyártó utasításai szerint. Ezt követően beállítottuk a minták pH-ját pH 8,5 (*Minimal Labeling*), illetve pH 8 (*Saturation Labeling*) értékekre. A *Minimal* és *Saturation Labeling* festési eljárás során a gyártó utasításait követtük. A *Minimal Labeling* metodika alkalmazásakor dimetilformamidban (DMF) oldott, különböző spektrális tulajdonságú *Cyanine* (Cy), fluoreszcens festékekkel jelöltük a lizin aminosav ε-amino csoportját. A reakciót feleslegben adott lizin hozzáadásával állítottuk le. A festési eljárás során 3-3, 50-50 µg fehérjetartalmú, kezelt és kontroll mintát jelöltünk Cy3, illetve Cy5 fluoreszcens festékekkel, a gyártó utasításai szerint. A további 3-3, szintén 50-50 µg fehérjetartalmú mintát pedig a festékeket felcserélve jelöltük. A kísérleti csoporton belüli vegyes fluorofór felhasználással kiküszöbölhetjük a Cy3 és Cy5 festékek közti különbségekből adódó, potenciális műterméket. Huszonöt-huszonöt µg fehérjetartalmú, a 6 kezelt és 6 kontroll állatból származó mintát egyesítettünk és 50-50 µg fehérjetartalmú mintákat Cy2 fluoreszcens festékekkel jelöltük. Egy-egy, véletlenszerűen, Cy5 vagy Cy3 festékekkel jelölt, kezelt valamint kontroll mintát, továbbá egy Cy2-vel jelölt, „egyesített”, „belső standard” mintát futtattunk meg egy gélen. A *Saturation Labeling* festési

eljárás során a minta fehérjéit redukáltuk, majd DMF-ben oldott Cy3, illetve Cy5 festékekkel jelöltük a fehérjék szulfhidril-csoportjait. A technika alkalmazásakor egy-egy kezelt vagy kontroll minta külön-külön gélen futott egy-egy belső standard mintával együtt. Öt-öt µg fehérjetartalmú kezelt és kontroll mintát Cy5 festékekkel, míg szintén 5 µg fehérjét tartalmazó, belső standard mintát Cy3 festékekkel jelöltük. A kezelt és kontroll mintákat külön-külön egyesítettük egységnyi belső standard mintával.

A fluoreszcensen jelölt fehérjéket tartalmazó mintákhoz, a fentiekben leírt egyesítéseket követően ún. rehidratációs puffert (8 M urea, 4% (wt/vol) CHAPS, 1,5% (vol/vol) glicerin, 130 mM DTT, 0,5% (vol/vol) IPG puffer) adtunk. Egy éjszakán át tartó inkubálással a mintát *Immobiline DryStrip* gélbe (24 cm; pH 3-10, nem-lineáris) juttattuk. A fehérjék izoelektromos fókuszálását másnap végeztük *Ettan IPGphor 3 IEF Unit* készülék segítségével, az alábbi fókuszálási beállításokkal: 1.: 30 V, 2 óra; 2.: (grádiens) 500 V, 3 óra; 3.: (grádiens) 2000 V, 4 óra; 4.: (grádiens) 8000 V, 8 óra; 5.: 8000 V, 6 óra. A fókuszálást követően a fehérjéket equilibráló pufferben (6 M urea, 30% (vol/vol) glicerin, 2% (wt/vol) SDS, 0,002% (wt/vol) brómfenol-kék, 75 mM Tris, pH 8,8) redukáltuk 0,1% (vol/vol) merkaptotetanollal, majd karbamidometiláltuk 2,5% (wt/vol) jódetamiddal. Ezt követően a DryStrip gél felhelyeztük egy 10% (wt/vol) akrilamid koncentrációjú, nagyméretű (26 x 20 cm-es) poliakrilamid gélre, majd 0,5% (wt/vol) agarózzal rögzítettük. A második dimenziós fehérje-szeparálás egy *Ettan DALTsix Electrophoresis System* használatával, ~4 órán át tartott.

Az izoelektromos fókuszálás és az azt követő SDS-PAGE révén fehérje-foltokba futott fehérjék mennyiségét, azok fluoreszcencia intenzitásán keresztül detektáltuk egy Typhoon TRIO+ szkennerek alkalmazásával. A használt lézereket és szűrőket a Cy festékeknek megfelelő konfiguráció szerint alkalmaztuk. A fotoelektron-sokszorozó cső (PMT) detektort ~600 V feszültség beállításával használtuk.

A beolvasott gélek fehérje-foltjainak szoftveres analízisét *DeCyder 2-D Differential Analysis Software* segítségével végeztük. A szoftver első, ún. DIA (*Differential In-gel Analysis*) moduljában, automatizált keresést követő manuális ellenőrzéssel megállapítottuk a valós fehérje-foltokat és kizártuk a műtermékeket minden egyes gélképen. Az ún. BVA (*Biological Variation Analysis*) modulban pedig összepárosítottuk az azonos fehérje-foltokat a különböző géleken. Az összepárosítás alapos manuális ellenőrzését követően, szintén ebben a modulban állapítottuk meg az egyes fehérje-foltok változásának mértékét a két kísérleti csoport között. A statisztikailag szignifikáns változások megállapításához kétmintás, kétvégű



Student-féle *t*-próbát használtunk az 1. és 2. kísérletben, illetve párosított, kétvégű Student-féle *t*-próbát a 3. kísérletben.

A statisztikailag szignifikáns változást mutató fehérjék azonosítása egy ún. preparatív gélből tömegspektrometriai úton történt (lásd: 4.8. *alfejezet*). Az azonosítás céljából végrehajtott kétdimenziós PAGE a fentiekben leírtak szerint történt az alábbi különbségekkel: i) mindössze egy, 800 µg fehérjét tartalmazó mintát futtattunk, amely azonos mennyiségű kezelt és kontroll minta egyesítéséből állt (illetve szortolás nélkül előállított szinaptoszóma preparátumból a 3. kísérletben), ii) nem jelöltük a fehérjéket fluoreszcens festékekkel a futtatás előtt, iii) a fehérjéket az SDS-PAGE-t követően, *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Merck Millipore, Billerica, MA, Amerikai Egyesült Államok) festékekkel tettük láthatóvá. A statisztikailag szignifikáns változást mutató és teljes biztonsággal beazonosítható fehérjefoltokat manuálisan, pipettaheggyel vágtuk ki a gélből. A géldarabokat 1% (vol/vol) jégecet vizes oldatában, 4 °C-on tároltuk a tömegspektrometriai azonosításig.

#### **4.7.2. 16-BAC/SDS-PAGE**

A módosított kétdimenziós PAGE metodika első lépésében ugyancsak meghatároztuk a proteomikai analízisnek alávetett 6-6 kezelt és kontroll minta fehérjekoncentrációját 2-D Quant Kit segítségével, a gyártó utasításai szerint. A kísérletben felhasznált, 30-30 µg fehérje fluoreszcens jelölését a 4.7.1. *alfejezetben* részletezett, Minimal Labeling technika szerint végeztük.

A használt 16-BAC/SDS-PAGE technikát elsőként MacFarlane, 1989 írta le. Munkánk során a Hartinger és mtsai., 1996 által kidolgozott protokollt alkalmaztuk, a fehérjék fluoreszcens jelölésével kiegészítve, néhány módosítással. A fluoreszcensen jelölt, és a kísérleti csoportoknak megfelelően egyesített mintákhoz kétszeres töménységű puffert (10% (wt/vol) 16-BAC, 7,5 M urea, 10% (vol/vol) glicerin, 225 mM DTT és 0,05% (wt/vol) Pyronin Y) adtunk. Az első dimenziós fehérje-szeparálás savas PAGE (pH 2,1) segítségével, 2,5 mM 16-BAC tartalmú, 7,5% (wt/vol) akrilamid gélben történt ETTAN DALTSIX Electrophoresis System használatával, ~10 órán keresztül. A futtatás után kivágtuk az elvált fehérjéket tartalmazó gélcsíkokat, majd a fehérjéket egy éjszakán át fixáltuk izopropanol:ecetsav:desztillált víz 3,5:1:5,5 térfogatarányú elegyében. A fehérjéket másnap equilibráltuk a 4.7.1. *alfejezetben* leírt körülmények között, és a gélcsíkokat 8,5% (wt/vol)

akrilamid géltre helyeztük, illetve azokat 0,5% (wt/vol) agarózzal rögzítettük. A második dimenziós fehérjeseparálást hagyományos SDS-PAGE segítségével végeztük.

A gélek szkennelése, a gélképek kiértékelése, és a fehérje-foltok manuális kivágása a 4.7.1. alfejezetben leírtakkal megegyező módon történt.

#### **4.8. Tandem tömegspektrometriai (MS/MS) fehérjeazonosítás**

A fehérjék azonosítása az 1. kísérletben részben a Dr. Drahos László vezette MTA TTK, MS Proteomikai Kutatócsoportban, részben a Bécsi Orvostudományi Egyetemen, Dr. Gert Lubec proteomikai laboratóriumában készült, a 3. kísérletben szintén az MTA TTK, MS Proteomikai Kutatócsoportjában, míg a 2. kísérletben a Szegedi Tudományegyetemen, az Orvosi Vegytani Intézetben, Dr. Janáky Tamás laboratóriumában készült. A fehérjék gélen belüli, triptikus emésztési munkájában, valamint az adatok szoftveres kiértékelésében aktívan részt vettem.

A fehérjék gélen belüli, triptikus emésztése Shevchenko és mtsai., 2006 protokollja alapján történt, kisebb módosításokkal. A kivágott géldarabokat először Milli-Q vízben, majd acetonitril:Milli-Q víz/1:1 (vol/vol) elegyében, végül acetonitrilben mostuk 15-15 percig, ezt követően pedig kiszárítottuk *miVac Duo Concentrator* (Genevac, Ipswich, Anglia) segítségével. A fehérjéket redukáltuk 10 mM DTT, 100 mM ammónium-bikarbonát oldatban 45 percig, 56 °C-on történő inkubálással, majd karbamidometiláltuk 54 mM jódiacetamid, 100 mM ammónium-bikarbonát oldatban, 30 percig, sötétben, szobahőmérsékleten való inkubálással. A géldarabokat ezután 100 mM ammónium-bikarbonátban 15 percig mostuk, majd acetonitrilben addig inkubáltuk, ameddig össze nem zsugorodtak. A géldarabok kiszárítását követően a fehérjéket tripszinnel emésztettük (Promega, Madison, WI, Amerikai Egyesült Államok), egy éjszakán át, 37 °C-on. A triptikus peptidok gélből történő kivonása 1% (vol/vol) hangyasav oldatban, majd 25% (vol/vol) acetonitril, 1% (vol/vol) hangyasav oldatban, végül acetonitrilben, 30-30 percig történő inkubálással, és adott időközönként, vortexeléssel történt. A peptidokat, kiszárításukat követően, újra feloldottuk 0,1% (vol/vol) hangyasav oldatban a hagyományos, IEF/SDS-PAGE technika esetén, illetve 5 mM ammónium-bikarbonát oldatban a 16-BAC/SDS-PAGE módszer alkalmazásakor.

Az 1. és 3. kísérletben, a hagyományos, IEF/SDS-PAGE vizsgálatok során, *Ultimate 3000 RSLC Nanosystem* folyadék kromatográfiás rendszerrel (Dionex, Sunnyvale, CA, Amerikai Egyesült Államok) kapcsolt, *amaZon*, *3D high capacity ion trap*

tömegspektrométer (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) használtunk, *CaptiveSpray* ionforrás (Bruker Daltonics) alkalmazásával, *HyStar* szoftver (Bruker Daltonics) koordinálásával. A mintákat *PepMap100 C-18* (300  $\mu\text{m}$  x 5 mm) *trap* oszlopba (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, Amerikai Egyesült Államok) injektáltuk, 30  $\mu\text{l}$ /perc áramlási sebességgel. A peptidek szeparálását *Acclaim PepMap RSLC* (75  $\mu\text{m}$  x 50 cm) szeparáló oszlop (Thermo Scientific) segítségével végeztük, 300 nl/perc áramlási sebesség mellett. Az alábbi grádiens alkalmaztuk: 4% B oldat 0.-tól 4. percig, 4-13% B oldat 4.-től 10. percig, 13-35% B oldat 10.-től 45. percig, 35%-90% B oldat 45.-től 46. percig, 90% B oldat 46.-tól 51. percig, 90-4% B oldat 51.-től 51,5. percig, amit egy egyensúlyozási lépés követett az 51,5.-től a 65. percig (A oldat: 0,1% (vol/vol) hangyasav desztillált vízben, B oldat: 0,08 % (vol/vol) hangyasav 80% (vol/vol) acetonitrilben). A tömegspektrometriai azonosítás pozitív ion-módban, 400-1400 m/z tartományban történt, és 50-3000 m/z tartományban az MS/MS azonosítás során, az információ-függő adatgyűjtés alatt.

A 2. kísérletben, a hagyományos, IEF/SDS-PAGE vizsgálatok során *Agilent 1100 Series nano-LC* folyadék kromatográfiás rendszerhez (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Amerikai Egyesült Államok) kapcsolt *Agilent LC-MSD XCT Plus ion trap* tömegspektrométer (Agilent Technologies) használtunk. A kromatográfiás rendszerben a minta-dúsító/sómentesítő módban *ZORBAX 300SB-C18* (300  $\mu\text{m}$  x 5 mm) oszlopot (Agilent Technologies), míg a peptidek kromatográfiás szeparálása során *ZORBAX 300SB-C18* (75  $\mu\text{m}$  x 150 mm) oszlopot (Agilent Technologies) alkalmaztunk. A peptidek elúciója 300 nl/perc áramlási sebességgel történt, 100% A oldatból (0,1% (vol/vol) hangyasav desztillált vízben) 40% B oldatba (0,1% (vol/vol) hangyasav acetonitrilben) 25 perc alatt átmenő grádienssel. A pozitív ion-módban történő tömegspektrometriai peptid-azonosítás, a 300-1600 m/z tartományban történt, míg az MS/MS azonosítás 100-1800 m/z tartományban, az automatizált, információ-függő adatgyűjtés alatt.

Az 1. kísérletben alkalmazott 16-BAC/SDS-PAGE eljárás után a fehérjék azonosítása *nanoAcquity UPLC* folyadék kromatográfiás rendszerhez (Waters Corporation, Milford, MA, Amerikai Egyesült Államok) kapcsolt *Q-ToF Premier* tömegspektrométer (Waters Corporation) segítségével történt. A mintákat *Symmetry C18* (180  $\mu\text{m}$  x 20 mm) *trap* oszlopba (Waters Corporation) injektáltuk, majd a kromatográfiás elválasztást *Symmetry C18* (75  $\mu\text{m}$  x 200 mm) (Waters Corporation) analitikai oszlopon végeztük. A peptidek elúciója 250 nl/perc áramlási sebességgel történt az alábbi grádiens alkalmazásával: 3%-tól 8% B oldat 4 perc alatt, 65 percig tartó grádiens 40% B oldatig, 2 percig tartó grádiens 40%-tól 75% B oldatig, 2 percig tartó átmenet 3% B oldatig, majd 18 percig tartó egyensúlyozás (A

oldat: 0,1% (vol/vol) hangyasav desztillált vízben, B oldat: 0,1% (vol/vol) hangyasav acetonitrilben). A peptid-azonosítás a 400-1800 m/z tartományban, az információ-függő MS/MS adatgyűjtés az 50-2000 m/z tartományban történt.

A fehérjék azonosítása, a tömegspektrometriai adataik alapján a *Mascot Server* (Matrix Science, London, Anglia) szoftvercsomag segítségével történt, a 2. kísérletben *X!Tandem* keresőmotor (<http://www.thegpm.org/tandem/>) használatával kiegészítve. A fehérjék azonosítása során minden esetben az elérhető legújabb *SwissProt* adatbázist használtuk, egy hiányzó hasítási hely engedélyezésének, a karbamidometilált cisztein fix módosulás és az oxidált metionin lehetséges módosulás beállításával. A legalább két, különböző peptiddel azonosított fehérjéket fogadtuk el valószínűleg azonosítottaknak. A fehérjeazonosítási adatok szoftveres kiértékeléséhez, a nagy biztonsággal kimutatott fehérjék meghatározásához *Scaffold 4* szoftvert (Proteome Software, Portland, OR, Amerikai Egyesült Államok) használtunk. A legalább 95% fölötti, a program által kalkulált, valószínűséggel azonosított peptideket, illetve fehérjéket fogadtuk el valószínűleg azonosításnak.

#### **4.9. Kétdimenziós Western blot**

Az Nptx1 fehérje poszttranszlációs módosulásainak vizsgálatához alkalmaztuk a technikát egerek nagyagykérgéből a 4.4.2. *alfejezetben* leírtak szerint preparált szinaptoszóma minták felhasználásával. Az eljárás során 1 mg fehérjét tartalmazó minta fehérjéit a 4.7.1 *alfejezetben* leírtak szerint elválasztottuk kétdimenziós gélelektroforézissel a fehérjék fluoreszcens festékkel történő jelölése nélkül. Ezt követően a gélben lévő fehérjéket membránra transzferáltuk a 4.6. *alfejezetben* foglaltaknak megfelelően, majd megfestettük előbb a foszforilált fehérjéket *Pro-Q Diamond Phosphoprotein Blot Stain Kit* (Thermo Fisher Scientific), majd a membrán teljes fehérje mennyiségét SYPRO Ruby Protein Blot Stain használatával, mindkét esetben a gyártó utasításait követve. A fluoreszcencia detektálásához Typhoon TRIO+ szkennert használtunk, majd a membránokat a 4.6. *alfejezetben* írtakat követve inkubáltuk előbb 1 órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoló pufferben, majd blokkoló pufferben hígított anti-Nptx1 (Proteintech) elsődleges antitesttel egy éjszakán át, 4 °C-on, amit másnap a megfelelő másodlagos antitesttel (ECL Plex IgG-Cy5) való inkubálás és a membrán szkennelése követett.

#### 4.10. Immunhisztokémia

Az 1. és 3. kísérletsorozatban egyaránt végeztünk immunhisztokémiai vizsgálatokat. Először az 1., a prenatális immunaktiváció hatását vizsgáló kísérletsorozathoz használt immunhisztokémiai eljárást mutatjuk be, melyben nélkülözhetetlen segítséget nyújtott Gellén Barbara munkatársam (ELTE, TTK, Biológiai Intézet, Proteomikai Laboratórium). A transzkardiálisan perfundált patkányok agyát 4% (wt/vol) formaldehid, 0,1 M PB, pH 7,4 oldatban utó-fixáltuk 24 órán keresztül, majd további két napig 20% (wt/vol) szacharóz, 0,1 M PB, pH 7,4 oldatban tartottuk azokat. Ezt követően 40 µm-es koronális metszeteket készítettünk a szárazjéggel lehűtött agyak nagyagykérgét is tartalmazó területéből *Leica SM2000R* szánkamikrotóm (Leica Biosystems, Nußloch, Németország) segítségével. Az agyszeleteket 0,1% (wt/vol) nátrium-azidot tartalmazó, 0,1 M PB, pH 7,4 oldatban tároltuk, 4 °C-on felhasználásukig.

Az immunhisztokémiai vizsgálatot az elsődleges somatosensoros, valamint a prefrontális agykérgi területeket tartalmazó metszeten végeztük el. Az immunhisztokémiai eljárás során minden esetben egy-egy kezelt és kontroll állatból származó metszetet jelöltük és inkubáltuk együtt, egy tárolóüvegben. A metszeteket először 10 mM citrát pufferben, pH 6,0 inkubáltuk, 70 °C-on, 1 órán keresztül. Ezt követően újabb 1 óra, szobahőmérsékleten történő inkubáció következett, 3% (wt/vol) BSA, 0,5% (vol/vol) Triton-X 100 és 0,05% (wt/vol) nátrium-azid tartalmú, 0,1 M PB-ben az aspecifikus fehérje-fehérje interakciók blokkolásához. A metszeteket anti-Camk2a elsődleges antitesttel inkubáltuk, 1:200 hígításban, a fenti blokkoló-pufferben oldva, két napig, szobahőmérsékleten, majd 1 órán át, szobahőmérsékleten, a szintén a blokkoló-pufferben oldott, 1:1 000 hígításban alkalmazott, biotinizált másodlagos antitesttel (katalógusszám: 715-065-151; Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, Amerikai Egyesült Államok). Az *ABC kit* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Amerikai Egyesült Államok) reagenseivel, 1 órán át történő inkubáció után a jelek előhívása 0,02% (wt/vol) 3,3'-diaminobenzidin (DAB) és 0,2% (wt/vol) nikkel(III)-szulfát tartalmú, 0,05 M Tris pufferrel (pH 8,0) történt 0,001% (vol/vol) hidrogén-peroxid hozzáadása után. A metszeteket ezt követően zselatinnal borított tárgylemezre helyeztük és egy éjszakán át száradni hagytuk, majd másnap *DPX* fedőanyaggal (Sigma-Aldrich) vontuk be.

A metszeteket egy *Eclipse Ni-U* mikroszkóppal (Nikon Instruments, Amsterdam, Hollandia) vizsgáltuk, világos-látóterű módban. A metszetekről 1600 x 1200 pixeles felbontású felvételeket készítettünk *SPOT Xplorer digital CCD* kamera (Diagnostic

Instruments, Sterling Heights, MI, Amerikai Egyesült Államok) segítségével, 10-szeres nagyítású objektívvel (numerikus apertúra = 0,30; *Plan Fluor*).

A felvételeket ImageJ szoftver segítségével értékeltük ki. A kiértékelés során a kísérleti csoportokat nem ismerve számoltuk meg a Camk2a-immunoreaktív foltok számát az azonos méretű kortikális területet tartalmazó felvételeken. A statisztikai analízis során párosított, kétvégű Student-féle *t*-próbát alkalmaztunk, ahol a párokat az eljárás során azonos tárolóüvegben tartott, kezelt és kontroll állatokból származó minták alkották, ezzel kiküszöbölve a festési eljárás esetleges különbségeiből adódó műtermékek figyelembevételét.

A 3., a KIR-i komplementrendszer szerepét vizsgáló kísérletsorozatban az alábbiakban kifejtett módon végeztük az immunhisztokémiai eljárást. Az egerek transzkardiális perfúziója után az agyakat eltávolítottuk és utó-fixáltuk azokat, 2% (wt/vol) formaldehid, 0,1 M PB, pH 7,4 oldatban 3 órán keresztül, szobahőmérsékleten. A fixáló oldatot ezt követően 0,1 M PB oldatra cseréltük és *Leica VT1000S* vibratómmal (Leica Biosystems) 60 µm-es, sagittális metszeteket készítettünk, amelyeket ugyanebben a pufferben, végkoncentrációban 0,1% (wt/vol) nátrium-azid hozzáadása után, 4 °C-on tároltuk. Az immunjelölési eljárás kezdetén a metszeteket többször TBS oldattal mostuk, majd blokkoló pufferben (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 100 mM L-lizin, 3% (wt/vol) BSA, 0,2% (vol/vol) Triton X-100, pH 7,4) inkubáltuk azokat, 45 percig, szobahőmérsékleten. A hármas immunjelöléshez a metszeteket elsődleges antitest pufferben (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 100 mM L-lizin, 1% (wt/vol) BSA, pH 7,4) inkubáltuk anti-C1q (1:1 000 hígításban), anti-aktív-kaspáz 3 (1:100 hígításban), anti-szinaptofizin 1 (anti-Syp1) (1:500 hígításban) antitestekkel 48 órán át, 4 °C-on. A metszetek TBS oldattal történő mosása után azokat TBS-ben hígított, anti-nyúl, Alexa Fluor 488-konjugált (1:400 hígításban), anti-egér, Cy3-konjugált (1:1 000 hígításban) és anti-csirke, Alexa Fluor 633-konjugált (1:400 hígításban) másodlagos antitestekkel inkubáltuk 3 órán keresztül, szobahőmérsékleten. Végül a metszeteket TBS oldattal mostuk, tárgylemezre helyeztük és *Aqua-Poly/Mount* médiummal (Polysciences, Warrington, PA, Amerikai Egyesült Államok) bevonva fedtük le. A metszetekről a felvételeket konfokális mikroszkóppal készítettük (lásd: 4.13. *alfejezet*).

#### **4.11. A szinaptoszómák immunjelölése**

A 4.4.2. *alfejezetben* olvashatóak szerint preparált szinaptoszómákat, a másnap megkezdett immunjelölésig 4 °C-on tároltuk. Az immunjelölési protokoll során, kezdetben, a

sok esetben használt PBS puffert használtuk. Ez a közeg a szinaptoszómák jelentős aggregációját okozta, így kezdeti vizsgálataink után, az ún. SET-puffert alkalmaztunk (320 mM szacharóz, 1 mM EDTA, 5 mM Tris, pH 7,4), amelynek használata lehetőséget teremtett további, áramlási citometriai munkákhoz is (lásd: 4.12. *alfejezet*). A kísérletben felhasznált elsődleges és másodlagos antitestek listája szintén a 2. táblázatban olvasható.

Első lépésben a szinaptoszómákat enyhén fixáltuk, 0,25% (wt/vol) formaldehiddel, 4 °C-on, 1 órán keresztül tartó inkubálással. A használt enyhe fixálás kellő mechanikai stabilitást biztosít az immunjelölési és további munkákhoz, ugyanakkor nem rontja a specifikus antigén-antitest kölcsönhatás kialakulásának hatékonyságát (Schmid és mtsai., 1991). Ezután a szinaptoszóma frakciót 1% (wt/vol) BSA tartalmú blokkoló pufferben inkubáltuk, 30 percig, szobahőmérsékleten. Ezt követően az elsődleges antitesttel való inkubálás következett a fenti blokkoló pufferben 30 percig, szobahőmérsékleten, a kísérlettől függően, anti-C1qA (1:30 hígítás) és/vagy anti-Nptx1 (1:30 hígítás, Santa Cruz Biotechnology) elsődleges antitestekkel. Az inkubáció végével a mintákat két, a blokkoló pufferrel történő szuszpendálási/leülepitési lépéssel mostuk. Ezek után a mintákat blokkoló pufferben hígított ECL Plex IgG-Cy5 (1:1 500 hígítás), és/vagy IgG-CFL 488 (1:200 hígítás) másodlagos antitesttel inkubáltuk 30 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. Az ún. negatív kontroll mintákhoz nem adtunk elsődleges antitestet, azonban minden eddigi és ez utáni kezelési lépés megegyezett a többi mintánál alkalmazottal. Amennyiben az intracelluláris helyzetű szinaptofizin (Syn) vagy aktív-kaspáz 3 fehérjék kimutatására is szükség volt, kétszeri TBS-es mosás után gyenge permeabilizálás következett, 0,2% (vol/vol) Tween-20 detergens tartalmú SET pufferrel, 37 °C-on, 15 percig tartó inkubálás által. A permeabilizált szinaptoszómákat ezután anti-Syn (1:50 hígítás) vagy anti-aktív-kaspáz 3 (1:100) antitesttel inkubáltuk 30 percig, szobahőmérsékleten, 1% (wt/vol) BSA tartalmú permeabilizáló oldatban, amit két mosási lépés követett. A mintákat ezt követően 1% (wt/vol) BSA tartalmú permeabilizáló oldatban hígított anti-egér Alexa Fluor 488 fluorofórral konjugált másodlagos antitesttel (1:1 000 hígítás) inkubáltuk. Újabb, kétszer elvégzett mosást követően a mintákat átszűrtük egy-egy 5 µm pórusátmérőjű *Durapore* membránszűrőn (Merck Millipore), hogy megváljunk az esetleges szinaptoszóma aggregátumoktól és nagyobb szennyeződésektől, sejttörmelékektől. *Annexin V*-jelölés esetén, a szűrést megelőzően a szinaptoszóma frakciót annexin V-kötő pufferben (eBioscience, San Diego, CA, Amerikai Egyesült Államok) felfuszpendáltuk, majd fluoreszcein izothiocianát (FITC)-konjugált annexin V fehérjét (katalógusszám: 640906; BioLegend, San Diego, CA, Amerikai Egyesült Államok) adtunk a mintához a gyártó utasításai szerint. A *calcein-AM* (katalógusszám: C3099; Thermo Fisher

Scientific) jelölés szintén a szűrés előtt történt a gyártó utasításai szerint. Végül, 0,5% (vol/vol) *Pluronic F-68* detergenst (Thermo Fisher Scientific) adtunk a mintákhoz, amely a későbbi munka során potenciálisan bekövetkező aggregációs folyamatokat meggátolta.

#### **4.12. Áramlási citometria és fluoreszcencia-aktivált sejtszortírozás (FACS)**

A szinaptoszómák áramlási citometriai analízisét és leválogatását közvetlenül az immunjelölési protokollt követően végeztük. A vizsgálatokhoz *BD FACSAria III* áramlási citométert és sejtszortert (BD Biosciences, San Jose, CA, Amerikai Egyesült Államok) használtunk. A készülék kezelését, az adatok rögzítését és feldolgozásukat *BD FACSDiva* szoftver (BD Biosciences) segítségével végeztük. A fluorofórok gerjesztéséhez 633 nm, valamint 488 nm hullámhosszú fényt kibocsátó lézereket használtunk. A szinaptoszómákat tartalmazó folyadékcseppek generálásához 70 µm-es ún. „nozzle”-t alkalmaztunk. A készülék beállítási paraméterei az alábbiak voltak: előre irányuló fényszórás (FSC) PMT detektor erősítési beállítása = 350 V; a detektor elé 1,5-ös típusú szűrőt helyeztünk; oldalirányú fényszórás (SSC) PMT detektor erősítési beállítása = 600 V; FSC küszöbérték = 5000 (AU); SSC küszöbérték = 2000 (AU); allofikocianin (APC) csatorna (633 nm-es lézerrel kompatibilis) PMT erősítési beállítása = 508 V, FITC csatorna (488 nm-es lézerrel kompatibilis) PMT erősítési beállítása = 455 V. A fényszórás és fluoreszcencia detektálása során minden esetben a detektor által generált, az idő függvényében ábrázolt elektromos jel (pulzus) intenzitásának görbe alatti területét (pl. FSC-A („FSC-area”), APC-A) vettük figyelembe. A mintainjektáló kamrában, valamint a szortolt mintákat tároló egységben 4 °C-os hőmérséklet volt.

A szinaptoszóma minták analízise és leválogatása előtt a minta hígítását és a készüléken belüli áramlási sebességet úgy állítottuk be, hogy az az egyes szinaptoszómák optikai jellemzőinek (pl. fluoreszcencia) detektálása és feldolgozása számára optimális legyen (<20 000 esemény/perc beállítására törekedtünk). Az áramlási citometriai analízis során, a partikulumok méretéről tájékoztató FSC jel, valamint azok belső granuláltságáról, komplexitásáról információt nyújtó SSC jel alapján, először kijelöltük a szinaptoszómák populációját, elkülönítve azokat az egyéb sejttermelékektől és műtermékektől. A továbbiakban, az ebben a populációban detektált fluoreszcens jeleket használtuk fel. A valódi fluoreszcens jelöléssel ellátott szinaptoszómák megbízható elkülönítéséhez megállapítottuk a negatív kontroll minta által generált „háttérfluoreszcenciát”. A valódi fluoreszcens jelöléssel



ellátott szinaptoszómák csoportjának kijelölésekor a háttérfluoreszcenciát meghaladó fluoreszcens jeleket vettük figyelembe. A fluoreszcensen jelölt és nem jelölt szinaptoszómák leválogatását, különválasztását az ún. *purity* szortolási beállítással végeztük, amely a fluoreszcensen jelölt és nem jelölt partikulumokat a legszigorúbb kritériumok alapján különíti el, így a legprecízebb szétválasztást teszi lehetővé.

A kísérletnek megfelelő darabszámú szinaptoszóma szortolását követően, az áramlási citometria során többszörösére hígult mintákat betöményítettük *100K Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit*, membránszűrővel ellátott centrifugacsövekben (Merck Millipore). A minták fehérjéit kloroform-metanolos technikával precipitáltuk (Fic és mtsai., 2010). Végül a mintákat lízis pufferben felfuszpendáltuk és a további felhasználásukig  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A szortolt szinaptoszóma frakció elektronmikroszkópos vizsgálatához szükséges lépéseket (lásd: 4.5. *alfejezet*) a szinaptoszóma preparátum betöményítése után közvetlenül elkezdtük.

A C1q fehérje szinaptikus kolokalizációjának kvantifikálásához az Nptx1, illetve az apoptotikus marker, aktív-kaspáz 3 vagy annexin V fehérjékkel, szintén áramlási citometriai technikát alkalmaztunk. Az analízishez minden esetben, állatonként 250 000 szinaptoszóma mérési adatait használtuk fel. A kolokalizáció mértékének statisztikai elemzéséhez párosított, Student-féle *t*-próbát alkalmaztunk.

A FACS technikával kapott adatok megjelenítéséhez *FCS Express 5* szoftvert (De Novo Software, Glendale, CA, Amerikai Egyesült Államok) használtunk.

### **4.13. Konfokális mikroszkópia**

A mikroszkópos technikát a szinaptoszómákról és metszetekről készített nagy felbontású felvételek előállításához használtuk. A szinaptoszómák konfokális mikroszkópos vizsgálatát közvetlenül az immunjelölési protokollt követően végeztük. A vizsgálatokhoz egy argonion lézerrel (excitációs maximum: 488 nm) és két hélium-neon lézerrel (excitációs maximumok: 543 nm és 633 nm) felszerelt *FluoView 500* konfokális lézer pásztázó mikroszkópot (Olympus Europe, Hamburg, Németország) használtunk. A műszer kezelése *FluoView 5.0* szoftverrel (Olympus Europe) történt. A minták differenciál interferencia kontraszt (DIC), illetve fluoreszcencia módban történő vizsgálatához és a felvételek (1024 x 1024 pixeles felbontás) készítéséhez 60-szoros nagyítású, olaj-immersiós objektívet (numerikus apertúra = 1,10; *Plan-Apokromatikus*) használtunk. A mikroszkóppal készített

képek beállításait és feldolgozásukat FluoView 5.0 és ImageJ szoftverek segítségével végeztük.

#### 4.14. Bioinformatikai analízis és irodalomkutatás

A proteomikai technikák segítségével azonosított, változó fehérjekészlet elemeit minden esetben alapos irodalomkutatás és adatbázisok révén is vizsgáltuk. Az adatgyűjtés során a szakirodalmi folyóiratokban publikált közleményeken túl a *UniProt* (<http://www.uniprot.org>), valamint a *GeneOntology* (<http://www.geneontology.org>) adatbázisokat használtuk. Mindezek alapján elkészítettük a fehérjék funkcionális klaszterezését a sejtés folyamatokban betöltött szerepük szerint.

A változó fehérjekészletben “feldúsuló” funkcionális kategóriák elemzéséhez *DAVID Bioinformatics Resources 6.7* adatbázist és programot (<http://www.david.abcc.ncifcrf.gov>; Huang és mtsai., 2009) használtuk. A feltöltött fehérjék mellett, ún. “háttérként” a megfelelő faj, adatbázisban szereplő teljes, ismert génkészletét használtuk. Az analízis során az összes “biológiai folyamat” (“*biological process*”) és “molekuláris funkció” (“*molecular function*”), *GeneOntology* annotációs kategóriát felhasználtuk, kizárva a “sejtés lokalizáció” (“*cellular components*”) kategóriát, valamint a keresést kibővítettük az összes “útvonal” (“*pathways*”) kategóriára. A felülreprezentált funkcionális kategóriák meghatározásakor a kritérium legalább két hozzátartozó fehérje besorolása volt. A változó fehérjekészletben statisztikailag szignifikánsan feldúsult funkcionális kategóriák megállapításához módosított Fisher-féle egzakt tesztet (Hosack és mtsai., 2003) használtunk. A teszt minden kategóriára egy módosított *p*-értéket, ún. *EASE*-értéket (*Expression Analysis Systematic Explorer* érték) számol. Vizsgálatunkban a 0,05-nél kisebb, hamis felfedezési arányra (“false discovery rate”) vonatkozó Benjamini-Hochberg korrekcióval módosított, *EASE*-értékkel rendelkező funkcionális kategóriákat tekintettük felülreprezentáltnak. A statisztikai számításokat az analízishez használt programban végeztük el. Eredményeinkben csak az első 15, legkisebb korrigált *EASE*-értékkel rendelkező kategóriát tüntettük fel, az eredmények könnyebb kezelhetősége érdekében.

A megváltozó fehérjék potenciális, közös szabályozó elemeinek kereséséhez a *Pathway Studio 11.0* szoftvert (Elsevier Life Science Solutions) használtuk. Olyan fehérjéket kerestünk, amelyek, az általunk manuálisan is validált, szakirodalmi adatok alapján részt vesznek több, megváltozott fehérje expressziójának, poszttranszlációs módosulásának, vagy

lokalizációjának szabályozásában. Egy-egy szabályozó fehérje és a szabályozott, megváltozó fehérjék egy csoportja közötti kapcsolat statisztikailag szignifikáns megjelenésének meghatározásához, az alfejezetben már említett, módosított Fisher-féle egzakt tesztet használtuk. A közös regulátorok EASE-értékének, a fenti teszttel történő kiszámolásához 2x2-es kontingencia táblázatokat hoztunk létre, amelyek az alábbi elemeket tartalmazták: i) a változó fehérjék száma, ii) a lokális kapcsolatok száma egy-egy közös regulátor és a megváltozott, szabályozott fehérjék csoportja között, iii) egy-egy közös regulátor adatbázisban ismert összes kapcsolatának száma, iv) az adatbázisban ismert összes, egyedi fehérje száma. A 0,05-nél kisebb EASE-értéket mutató közös regulátorokat tekintettük szignifikánsan jelentőseknek. Az első 5, legkisebb EASE-értékkel rendelkező közös regulátort tüntettük fel az eredményekben, a könnyebb kezelhetőség érdekében.

Ismert fehérjehálózatok, valamint a megváltozó fehérjék közötti interakciók kereséséhez és megjelenítéséhez szintén a Pathway Studio szoftvert használtuk. A fehérje-fehérje interakciók között a fizikai kölcsönhatásokat, expressziós-, és poszttranszlációs módosítás-szintű – akár kölcsönös – kapcsolatokat vettük figyelembe. Az interakciók automatizált megállapítása után minden kapcsolatot ellenőriztünk a kölcsönhatást bizonyító hivatkozásaikon keresztül.

Egy adott fehérjekészlet által szabályozott vagy az azt szabályozó sejtes folyamatok, fehérjék és egyéb elemek meghatározásához a Pathway Studio feldúsulási analízisét használtuk, mely lehetővé tette adott szignifikancia szint mellett ( $p < 0,05$ , Fisher-féle egzakt teszt) a potenciálisan regulált vagy reguláló szerepű entitások megállapítását.

#### **4.15. Statisztikai analízis**

Az adataink statisztikai analíziséhez és az eredmények megjelenítéséhez *Origin* (OriginPro 2016, OriginLab) szoftvert használtunk, amennyiben a kísérlethez használt specifikus szoftverekben (pl. DeCyder 2-D Differential Analysis Software) nem volt rá lehetőség. A használt statisztikai módszert az adott metodikai leírásnál minden esetben feltüntettük.

## **5. Eredmények**

### **5.1. A prenatális immunaktiváció rövid és hosszú távú proteomikai hatásának vizsgálata**

Az elsőként prezentálandó vizsgálsorozatban bemutatjuk a prenatális immunaktiváció által indukált fejlődési zavar mögött rejlő rövid és hosszú távú molekuláris, fehérje-szintű eltéréseket. A beavatkozás közvetlen hatásának vizsgálata elősegítheti a fejlődési zavar megértését a molekuláris módosulások alapján feltételezhető sejtbiológiai változások felismerésével. A kezelés után hosszú távon, az érett nagyagykéregben, a szinaptikus proteom szintjén megjelenő eltérésekből pedig következtethetünk a funkciózavarok szinaptikus átvitelben gyökerező okaira.

#### **5.1.1. A prenatális immunaktiváció rövid távú hatásai – az embrionális nagyagykéreg proteomjának áthangolása**

Az alábbiakban bemutatásra kerülő vizsgálatok célja annak feltárása, hogy a proteom szintjén milyen változások kísérik az anyai immunaktivációt 13-14. gesztációs napon lévő patkány embriók fejlődő telencephalonjában. Az így kapott eredmények információt nyújthatnak arról, hogy miként módosul a fejlődő nagyagykéreg felépítő sejtek intracelluláris működése és extracelluláris környezete, mely végül a nagyagykéreg patológiás kialakulását eredményezi.

##### **5.1.1.1. Az anyai testhőmérséklet változása a kezelést követően**

Az LPS-beadást követő immunaktiváció az anyaállatok fokozatosan emelkedő testhőmérsékletét okozta az alábbiak szerint:  $-0,16 \pm 0,22$  °C (átlag  $\pm$  középérték standard hibája) a beadást követően 1 órával,  $+0,38 \pm 0,12$  °C a 2. órában (statisztikailag szignifikáns változás a kontrollokhoz hasonlítva,  $p = 0,035$ ), illetve  $+0,54 \pm 0,12$  °C a 3. órában (statisztikailag szignifikáns változás a kontrollokhoz hasonlítva,  $p = 0,019$ ).

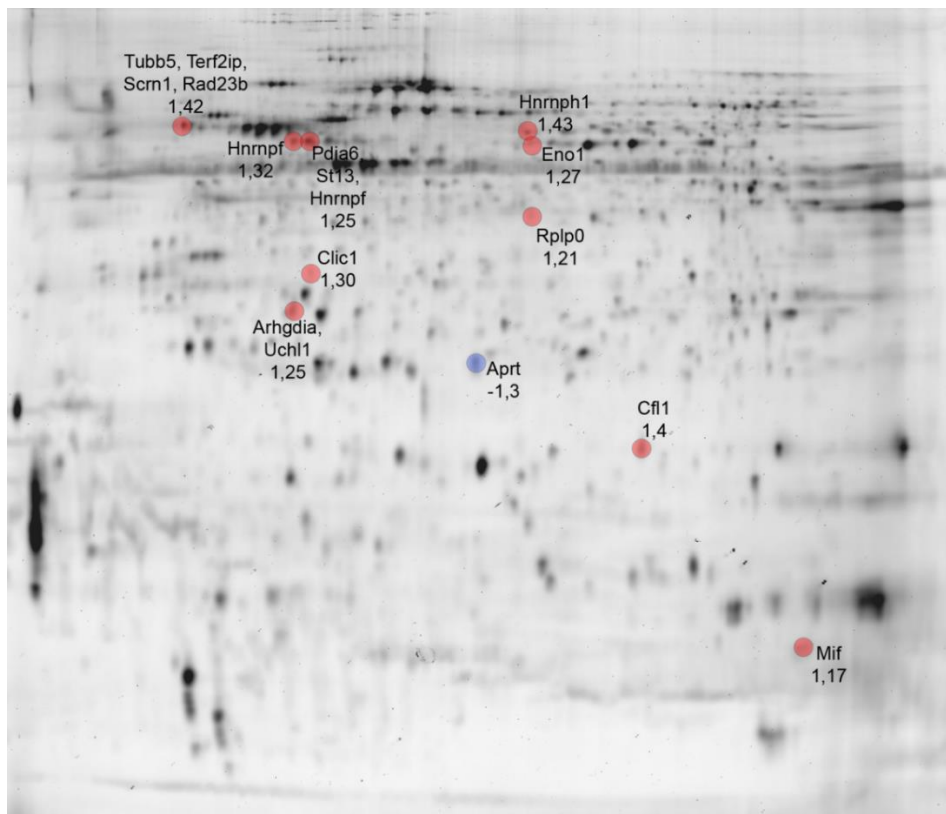
##### **5.1.1.2. Az embrionális telencephalonban kimutatható proteomikai változások 24 órával a kezelés után**

Az akut, anyai gyulladási reakció következtében, a folyamat elindítása után 24 órával, a 14,5 napos patkány embriók telencephalonjában (12. ábra) 16 fehérje spot fluoreszcencia

intenzitásának statisztikailag szignifikáns változását mutattuk ki vizsgálati technikáinkkal. A fehérje spotok közül 11 darab tömegspektrometriai azonosítására volt lehetőségünk, melyekben összesen 16 különböző fehérjét mutattunk ki (13. ábra). Érdekes módon, a 16 fehérje közül 15-öt találtunk megnövekedett mennyiségben (a növekedés mértéke a 1,17–1,43-szoros tartományba esett), míg mindössze egy fehérje szintje csökkent (-1,3-szoros csökkenés) a kezelés hatására (3. táblázat).



**12. ábra.** Felvétel a kísérlet során felhasznált egyik, gesztációs 14,5 napos korú patkány embrióról, illetve a kipreparált telencephalonról.



**13. ábra.** A prenatális LPS kezelést 24 órával követően az embrionális telencephalonban megváltozó mennyiségű fehérjék a gélen.

	UniProt fehérje név	UniProt gén név	Változás mértéke (kezelt/kontroll)	Sejtes funkció
1	60S acidic ribosomal protein P0	Rplp0	1,21	Fehérjeszintézis
2	Adenine phosphoribosyltransferase	Aprt	-1,30	Purin metabolizmus
3	Alpha-enolase	Eno1	1,27	Glikolízis
4	Chloride intracellular channel protein 1	Clic1	1,30	Iontranszport
5	Cofilin-1	Cfl1	1,40	Mikrofilamentum organizáció
6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	Hnrnpf	1,32	mRNS processzálas
			1,25	
7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	Hnrnp1	1,43	mRNS processzálas
8	Hsc70-interacting protein	St13	1,25	Chaperone
9	Macrophage migration inhibitory factor	Mif	1,17	Pro-inflammatorikus citokin
10	Protein disulfide-isomerase A6	Pdia6	1,25	Chaperone
11	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Arhgdia	1,25	Sejtmotilitás szabályozása
12	Secernin-1	Scrn1	1,42	Exocitózis szabályozása
13	Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1	Terf2ip	1,42	Transzkripció szabályozása
14	Tubulin beta-5 chain	Tubb5	1,42	Citoszkeletális
15	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	Uchl1	1,25	Fehérje lebontás
16	UV excision repair protein RAD23 homolog B	Rad23b	1,42	Fehérje lebontás és DNS hibajavítás szabályozása

**3. táblázat.** A prenatális immunaktiváció után 24 órával az embrionális telencephalonban detektálható proteomikai különbségek.

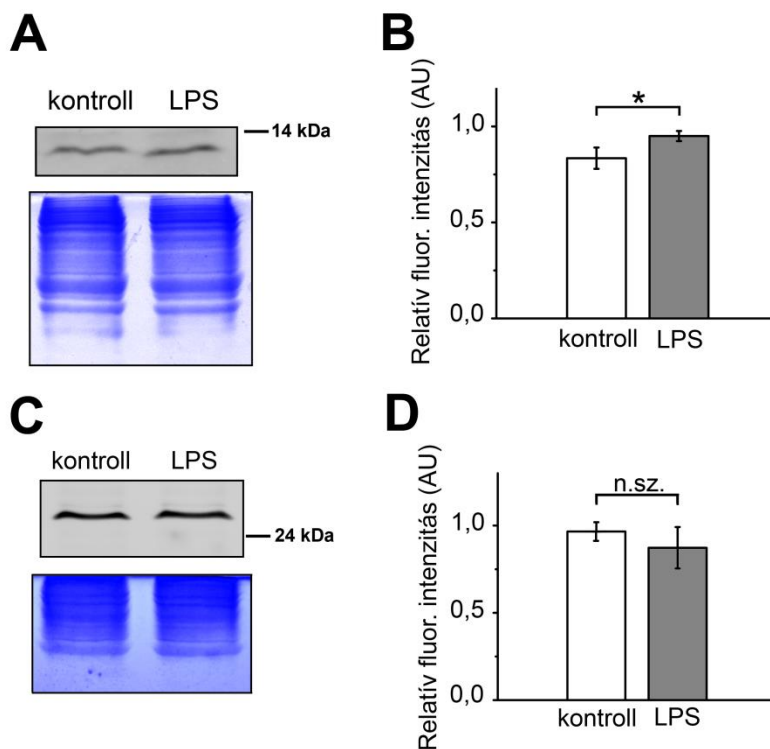
### 5.1.1.3. A telencephalon proteomikai elemzésével kapott eredmények értékelése

A vizsgált teljes szöveti minta potenciálisan tartalmazta a telencephalont az adott embrionális periódusban felépítő valamennyi sejttípus sejtben belüli organelleimainak és a citoplazmának, továbbá az extracelluláris környezet, szekretált fehérjéinek összességét. A kísérleti körülmények folytán, az eredményeink tehát a telencephalon legjelentősebb, eredő proteomikai különbségeit tárták fel a kezelésen átesett és kontroll csoportok között. A fehérjék funkcionális klaszterezése alapján leginkább kiemelendő, hogy a megváltozott mennyiségű fehérjék között felülreprezentáltak a fehérje szintézisben, feltekeredésben és lebontásban érintett proteinek (a 16-ból összesen 8 fehérje játszik szerepet az említett folyamatokban; 3. táblázat). Az eredmény a proteom alapvető áthangolására utal, melyben a génexpressziós szabályozó elemektől (Hnrnpf, Hnrnp1 és Terf2ip) a transzláción (Rplp0) és fehérje feltekeredésen (Pdia6 és St13) át, az ubikvitin-mediált katabolizmusban érintett

(Rad23b és Uchl1) fehérjék egyaránt szerepelnek. Megjegyzendő, hogy közülük a telomer ismétlődés-kötő faktor 2-interakciós fehérje 1 (Terf2ip) fehérje egyben az NFκB, gyulladási útvonal által regulált génexpresszió pozitív szabályozó faktora (Teo és mtsai., 2010). A kialakuló/fejlődő nagyagykéregben az általunk vizsgált, 13-14 napos korban intenzív neurogenesis és sejt vándorlás zajlik (Clancy és mtsai., 2007; és <http://www.translatingtime.net>). Az intenzív motilitással jellemezhető periódus LPS-indukált zavarára utal, hogy a citoskeleton dinamikus módosulását alapvetően befolyásoló fehérjéket (Arhgdia és Cfl1) továbbá a sejt váz egyik fontos építőelemét (Tubb5) egyaránt szignifikánsan megváltozott mennyiségben detektáltuk. Az anyai gyulladási reakció közvetlen pro-inflammatorikus hatására utal a magzat fejlődő KIR-ében, hogy az embrionális nagyagykérgi mintában kimutattuk a pro-inflammatorikus citokin, makrofág migrációt gátló fehérje (Mif) megnövekedett mennyiségét, mely eredményt Western blot technikával validáltunk is (14. ábra, A, B). Érdekes módon, a Mif fehérje a teoretikus, kalkulált izoelektromos pontjánál (teoretikus pI = 6,8) jelentősen lúgosabb tartományban helyezkedett el a kétdimenziós gélelektroforézis után (13. ábra; összehasonlításként: Rplp0 teoretikus pI = 5,90, Eno1 teoretikus pI = 6,16, Cfl1 teoretikus pI = 8,22). Ebből kifolyólag elmondható, hogy a megnövekedett mennyiségű Mif fehérje feltételezhetően egyben a protein egy poszttranszlációs módosult formája. A szakirodalomból ismert, hogy a Mif fehérje számos poszttranszlációs eltérő formában lehet jelen a szervezetben (Magi és mtsai., 1998), továbbá kiemelő, hogy a fehérje mennyisége oxidált állapotban, a redukált formától eltérően, elsősorban patológias állapotban emelkedik meg (Schinagl és mtsai., 2016). A Mif fehérje pontos poszttranszlációs módosulása kísérletünkben ugyanakkor egyelőre nem tisztázott. Érdekes továbbá megemlíteni, hogy proteomikai vizsgálatunk rámutatott a klorid intracelluláris csatorna fehérje 1 (Clic1) megnövekedett szintjére a kezelés hatására. Ez utóbbi fehérje jelen lehet a citoplazmában, illetve beágyazódhat a plazmamembránba, amelynek során dimer struktúrában, Cl<sup>-</sup> áteresztésére képes ioncsatornaként funkcionál (Littler és mtsai., 2004). A Clic1 plazmamembránba irányító szignálszekvencia nélkül, szokatlan módon és topológiával épül a plazmamembránba, mely folyamat a sejt redox állapotától függ, amit a fehérje közvetlenül érzékeltetni képes (Singh és Ashley, 2006). Western blot technikával nem találtunk mennyiségi különbséget a Clic1 fehérje expressziójában (14. ábra, C, D), mely azt jelzi, hogy a fehérje valamely poszttranszlációs módosult formájában kaptunk szignifikáns növekedést a proteomikai vizsgálatban. Mint említettük, a Clic1 redox-érzékelőként poszttranszlációs módosuláson megy át (oxidálódik), amely egyben a strukturális változások és a membránba

való beépülésének kiváltója, így feltételezhető, hogy az oxidált forma növekedését detektáltuk proteomikai vizsgálatunkban.

Összegezve, elmondható, hogy az anyai gyulladásos reakció proteomikai szinten is megnyilvánuló hatással bír, még a frakcionálási eljárásnak alá nem vetett, teljes telencephalikus embrionális szövetmintában is, 24 órával az akut gyulladásos reakció után. A megváltozott fehérjekészlet szintjén tetten érhető a pro-inflammatorikus hatás az embrionális KIR-ben is, továbbá kiemelkedik a fehérjeexpressziós és citoskeletális rendszer érintettsége. A Clic1 fehérje nettó mennyiségi változást ugyan nem mutatott, de az egyik detektált, poszttranszlációs módosult formájának fokozott megjelenése feltételezhetően a telencephalonban fellépő oxidatív stressz következménye.



**14. ábra.** A makrofág migrációt gátló fehérje (*Mif*) és klorid intracelluláris csatorna fehérje 1 (*Clic1*) expresszió-változásának vizsgálata Western blot technikával. (A) Reprerentatív Western blot felvétel a *Mif* fehérje mennyiségéről a kontroll és LPS-kezelésen átesett anyák magzatainak ( $n = 6-6$ ) telencephalonjában a kezelés után 24 órával, a

megfelelő géلزsebekbe felvitt teljes fehérje mennyiség bemutatásával. (B) A denzitometriás kvantifikálás eredményeként látható a *Mif* expressziójának fokozódása az LPS-kezelés után. (C) Reprerentatív Western blot felvétel a *Clic1* fehérje mennyiségéről az (A) pontban leírtaknak megfelelően. (D) A denzitometriás kvantifikálás eredménye alapján a *Clic1* fehérje expressziója a kontroll és LPS-kezelt csoport közt statisztikailag szignifikáns változást nem mutat (nem szignifikáns, n.sz.). Az átlag  $\pm$  középérték standard hibája felhasználva; \*  $p < 0,05$ .



### **5.1.2. A prenatális immunaktiváció által indukált hosszú távú változások – az adolescens utódok nagyagykérgi fejlődési zavara a proteom változásainak tükrében**

A következő vizsgálatsorozatban a kifejlődött, érett nagyagykéregben megjelenő proteomikai eltérések kimutatását végeztük el. Az adolescens korú patkányokban már detektálhatóak a viselkedési és egyéb funkciózavarok (Meyer és mtsai., 2009a), melyek mechanizmusának megértéséhez célzottan, külön-külön vizsgáltuk a pre- és posztszinaptikus régió fehérjekészletét.

#### **5.1.2.1. Az alomméret és az utódok ivari eloszlásának változása az immunaktiváció hatására**

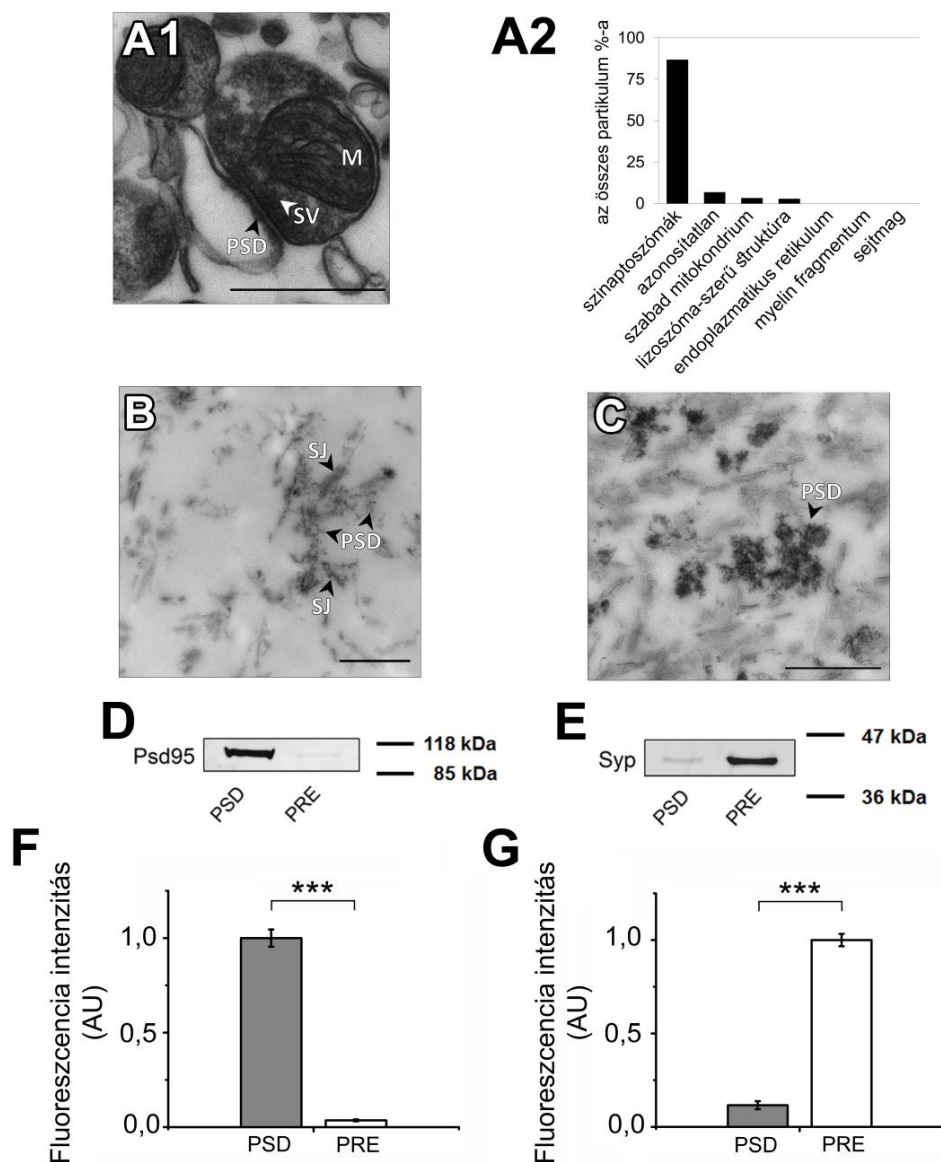
A gesztációs immunaktiváció hatékony befolyásoló szerepét mutatja az *5.1.1.1. alfejezetben* bemutatott, anyai testhőmérséklet-változáson túl, hogy hatást fejtett ki a világra jött és életben maradt utódok számára is. Míg a kontroll anyaállatok utódszáma  $13,3 \pm 1,05$  (az átlag és a középérték standard hibája felhasználásával), addig az LPS-kezelt anyáké  $9,5 \pm 1,21$  volt, amely marginálisan statisztikailag szignifikáns csökkenést jelent ( $p = 0,048$ ) a kezelés hatására. Az utódok ivari eloszlása ugyanakkor nem mutatott jelentős eltéréseket, amennyiben a hím:nőstény utódok aránya  $1,3 \pm 0,40$  volt (nem szignifikáns eltérés a két ivar összehasonlításakor,  $p = 0,63$ ).

#### **5.1.2.2. A nagyagykérgi mintákon végzett szubszinaptikus frakcionálás validálása**

A prenatális immunaktiváción átesett és kontroll utódok molekuláris neurobiológiai vizsgálatát szubszinaptikus preparátumokon végeztük. A preparátumok validálása a munka kulcsfontosságú része, amely eredményeinek bemutatása így e helyen történik. A validálás magában foglalta a neuronális preparátumok morfológiai analízisét elektronmikroszkópos technika segítségével, illetve specifikus molekuláris markerek kimutatását Western blot használatával. Egy szubcelluláris frakció ultrastrukturális, morfológiai vizsgálata elektronmikroszkópia segítségével abban az esetben lehetséges, amennyiben az egy bizonyos felületre leülepszíthető, majd beágyazható. A jelen kísérletben lehetőségünk volt így az állatok nagyagykérgéből preparált szinaptoszóma, szinaptikus junkció, illetve posztszinaptikus denzitás analízisére. A proteomikai vizsgálatra felhasznált preszinaptikus membrán frakció

viszont nem felelt meg e kritériumnak. Összességében ugyanakkor elmondható, hogy a szinaptoszóma, illetve szinaptikus junkció frakciók megbízható becslést nyújtanak a frakcionálási lépés előrehaladásáról, míg végül megkapjuk az elektronmikroszkópiával szintén vizsgálható posztszinaptikus denzitás preparátumot és annak, ekkor már egyedüli, komplementer párját, a preszinaptikus membrán frakciót. Az első lépésben megkapott szinaptoszóma preparátum a legrégebb óta használt és legjobban ismert szubcelluláris frakciók közé tartozik. A szinaptoszómák frakciója az elektronmikroszkópos felvételen jól láthatóan szinaptikus vezikulumokkal-teli, mitokondriumot tartalmazó preszinaptikus axonterminálisokból (esetenként önálló varikozitásokból), és a hozzájuk kapcsolódó posztszinaptikus kompartmentekből áll (Whittaker, 1993) (15. ábra, A1). A szinaptoszóma preparátum manuális analízisével kapott eredmények alapján elmondható, hogy a frakció ~85%-ban szinaptoszómákból áll, és az egyéb szennyeződések száma elhanyagolható (15. ábra, A2). A szinaptikus junkciók frakciója már mindössze a preszinaptikus aktív zónát tartalmazó preszinaptikus membránokból, illetve a hozzájuk kapcsolódó, esetenként jól látható posztszinaptikus denzitással is asszociált, posztszinaptikus membránból áll (Hahn és mtsai., 2009) (15. ábra, B). Végül, a posztszinaptikus denzitás frakciója a többnyire levált és aggregált, gömb-szerű posztszinaptikus denzitásból, illetve a pálcika-szerű posztszinaptikus membránból áll (Cohen és mtsai., 1977; Carlin és mtsai., 1980) (15. ábra, C).

További validálást végeztünk a frakciók molekuláris összetételének vizsgálatával. Tekintve, hogy a pre- és posztszinaptikus régiók molekuláris összetétele jelentős eltéréseket mutat (összefoglalás: <http://www.synprot.de/>, szinaptikus fehérje adatbázis), így a megfelelő molekuláris markerek detektálásával következtethetünk a preparátum tisztaságára. Jelen kísérletben vizsgáltuk a preszinaptikus Syt (Wiedenmann és Franke, 1985), illetve a posztszinaptikus Pcd95 (Cho és mtsai., 1992) fehérjék mennyiségét a PRE és PSD frakciókban egyaránt. Habár a Syt fehérje elsősorban a szinaptikus vezikulumok membránjában elhelyezkedő, integráns membránfehérje, ugyanakkor jelen van a preszinaptikus membránban is a szinaptikus vezikulumok reciklizációja következtében (Wilhelm és mtsai., 2014), tehát használható kísérletünkben preszinaptikus markerként. A pre- és posztszinaptikus oldal hatékony elválasztását igazolta, hogy a posztszinaptikus Pcd95 fehérje mennyiségének szintje mindössze  $3,6 \pm 0,5\%$  volt a PRE frakcióban a PSD preparátumban mérthez képest, míg a preszinaptikus Syt fehérje értéke csupán  $11,6\% \pm 2,2\%$  volt a PSD frakcióban a preszinaptikus mennyiséggel összehasonlítva (15. ábra, D-G).



**15. ábra.** A szinaptoszóma, pre- és posztzinaptikus frakciók vizsgálata. A szinaptoszóma frakció (A1) a preszinaptikus, mitokondriumot (*M*) és szinaptikus vezikulumokat (*SV*) tartalmazó axonterminálisból és a hozzá kapcsolódó posztzinaptikus kompartmentből áll, melyben posztzinaptikus denzitás (*PSD*) is felismerhető. A szinaptoszóma frakció tisztaságának manuális ellenőrzésével kapott eredmények (A2). A szinaptikus junkciók frakciójában (B) a pre- és posztzinaptikus membrán-kapcsolatok (*SJ*), illetve helyenként posztzinaptikus denzitás (*PSD*) ismerhető fel. A posztzinaptikus membrán/posztzinaptikus denzitás frakció (C) lefűződött és aggregálódott PSD-ből, illetve posztzinaptikus membrán fragmentumokból áll. Reprezentatív Western blot felvételen látható a posztzinaptikus Psd95 (D) és a preszinaptikus Syp (E) fehérje mennyisége a posztzinaptikus (PSD), illetve preszinaptikus (PRE) frakciókban ( $n = 6-6$ ). A denzitometriás kiértékelés eredményei alapján

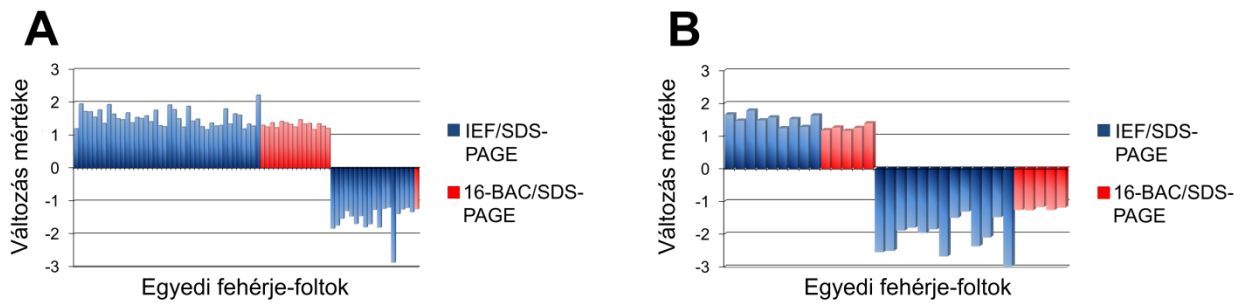
látható a Psd95 szignifikáns feldúsulása a PSD (F), míg a Syp proteiné a PRE (G) preparátumban. Mércse = 0,5  $\mu\text{m}$ ; az átlag  $\pm$  középérték standard hibája felhasználva; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### **5.1.2.3. A nagyagykérgi szinaptikus proteom változása adolescens korban, a prenatális immunaktiváció következtében**

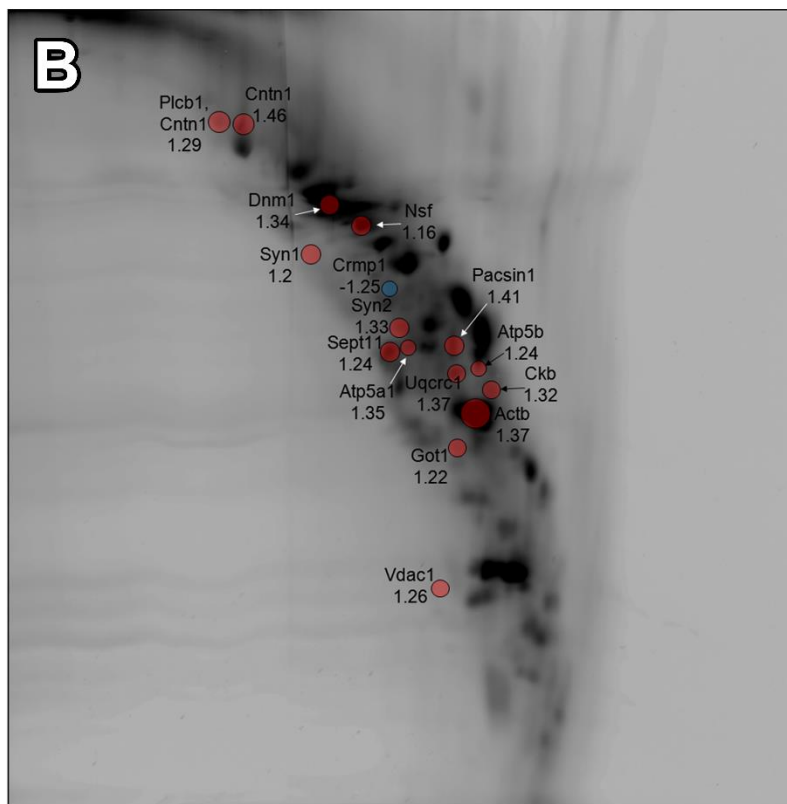
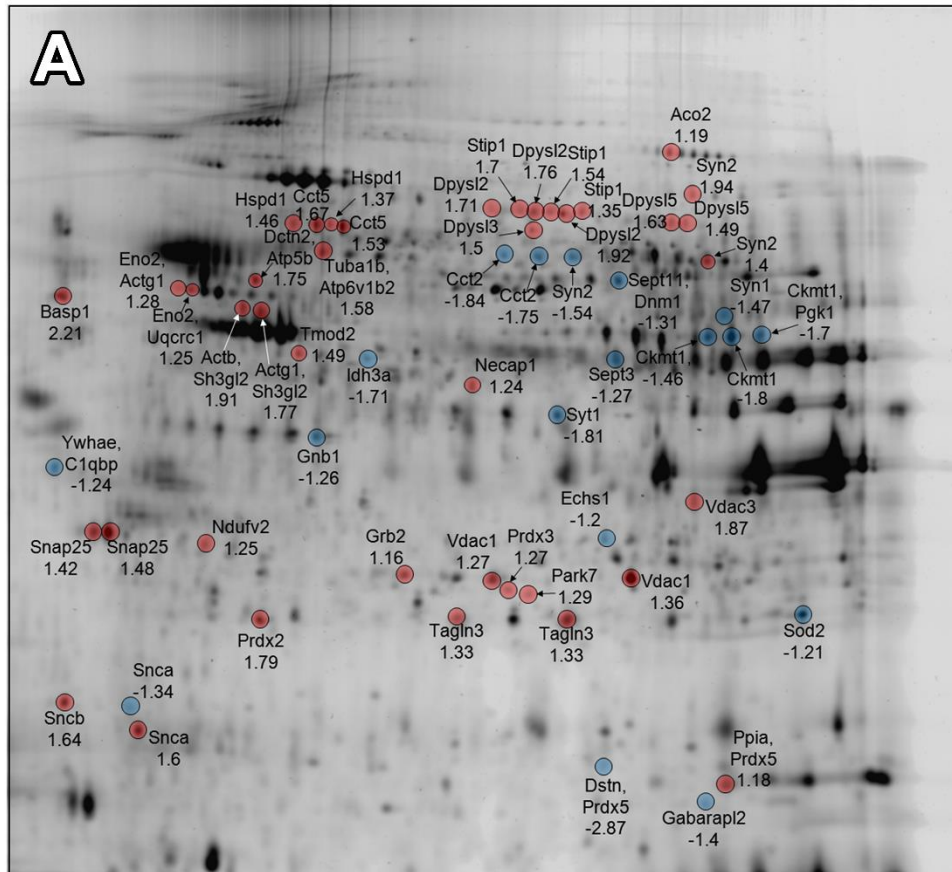
A nagy-áteresztőképességű neuroproteomikai vizsgálathoz a kontroll és kezelt állatok PRE, illetve PSD frakcióit két különböző gél-alapú proteomikai technikával hasonlítottuk össze. Mindkét technika használata során kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézissel végeztük el a fehérjék elválasztását, azonban a két metodika, egymást kiegészítve lehetővé tette, hogy a proteom rendkívül széles spektrumban vizsgálhatóvá váljon. Az első, konvencionális, izoelektromos fókuszálásból, illetve az azt követő SDS-PAGE elválasztásból álló metodika (IEF/SDS-PAGE) által lehetőség van a kb. 10-100 kDa molekulatömegű, kb. 4-9 izoelektromos pont (pI) tartományba eső, elsősorban szolubilis, vagy kis mértékben hidrofób fehérjék elválasztására, így további analízisükre (Chevalier, 2010). Habár az élő szervezetben megtalálható fehérjék többsége a fenti kritériumoknak megfelel, a vizsgált szinaptikus membrán preparátumok esetében fontos volt kibővítenünk a detektálható fehérjék listáját a 16-BAC/SDS-PAGE technika alkalmazásával, amelynek során a minta fehérjei két, molekulatömeg alapján történő szeparáláson mennek keresztül. A fehérjék gélben történő elkülönülését az egymást követő, de azonos elvű elválasztás ellenére a gélelektroforézis alapvető különbözősége biztosítja: míg az első dimenziós szeparáció savas pH-n, a kationos detergens 16-BAC jelenlétében történik, addig a másik dimenzióban végezzük a hagyományos SDS-PAGE-t (MacFarlane, 1989). Ez a metodika megkerüli az izoelektromos fókuszálásból adódó fehérje-szolubilitási problémákat, így lehetőség van a rendkívül hidrofób integráns membránfehérjék vizsgálatára is, illetve detektálhatóak az extrém izoelektromos pontú proteinek is. A 16-BAC/SDS-PAGE elválasztást, a poliakrilamid gél akrilamid koncentrációjának beállításával a közepes és nagy molekulatömegű fehérjék elválasztására optimalizáltuk. Mindezek által, a kis és közepes méretű, elsősorban szolubilis fehérjék elválasztása és analízise az IEF/SDS-PAGE, míg a közepes és nagy méretű, szolubilis és hidrofób fehérjéké pedig a 16-BAC/SDS-PAGE technikával történt. A mindkét technika esetén alkalmazott 2-D DIGE fluoreszcens fehérje-jelölési és kvantifikálási technika lehetővé teszi a rendkívül megbízható proteomikai analízist, potenciálisan akár több ezer különböző

fehérje esetén, ugyanakkor, természetesen a mintában rendkívül kis kópiaszámban jelenlévő fehérjék detekciója jelenleg is limitációt jelent.

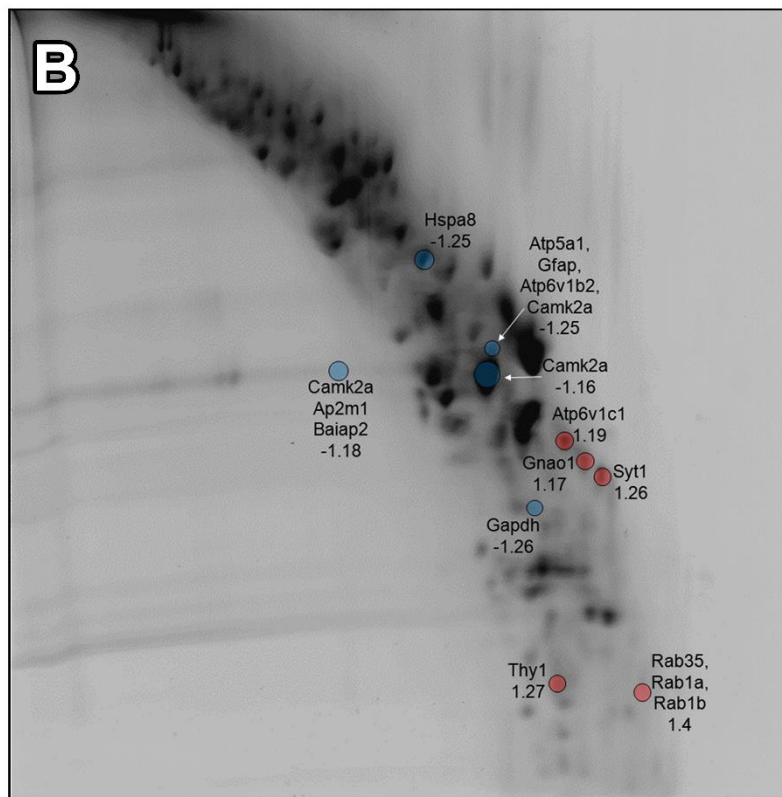
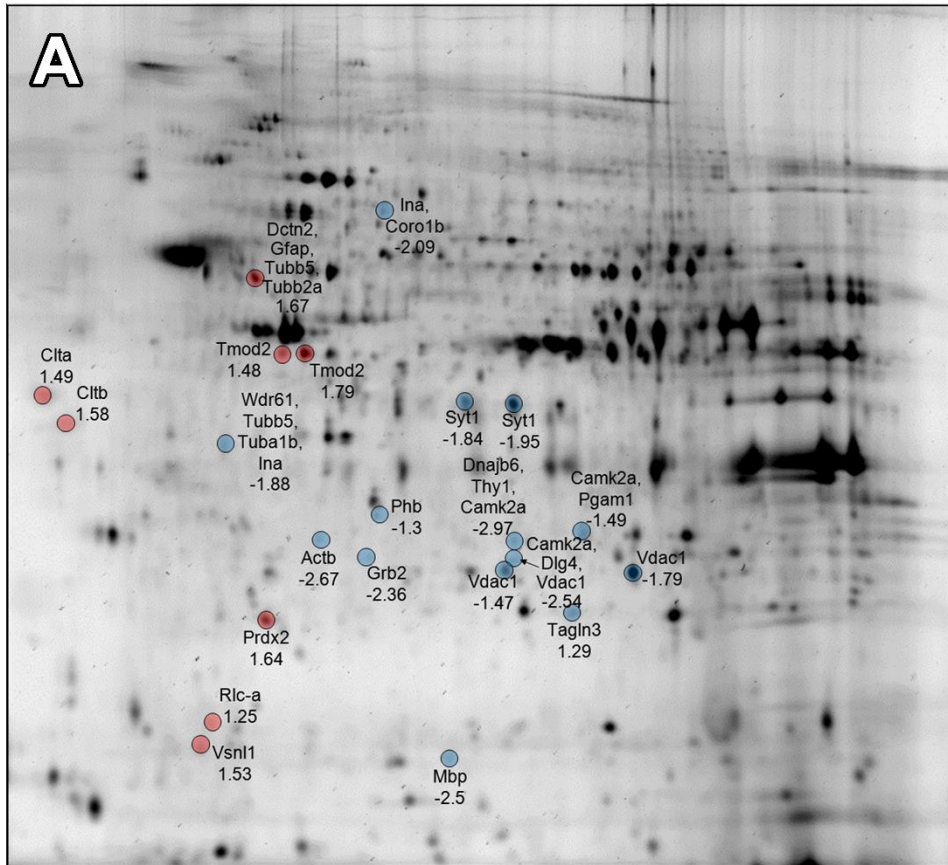
Az IEF/SDS-PAGE vizsgálat során a hatból legalább öt gélen megbízhatóan azonosítottunk 872 fehérje-foltot a PRE preparátum, míg 602 darabot a PSD frakció analízise végén. A 16-BAC/SDS-PAGE technikával 140 PRE és 185 PSD fehérje-folt összepárosítására és elemzésére volt lehetőség. E fehérje-foltok közül 62 (PRE) és 23 (PSD) fluoreszcens intenzitásában mutattunk ki statisztikailag szignifikáns változást az IEF/SDS-PAGE kísérletekben, míg ugyanez a szám 16 (PRE) és 10 (PSD) volt a 16-BAC/SDS-PAGE vizsgálatban. Mindez, az összes detektálható fehérje-folt számát is figyelembe véve, kiterjedt, rendkívül sok fehérjét érintő eltérésre utal az utódok nagyagykérgi szinaptikus fehérjekészletében. Fontos felhívni rá a figyelmet, hogy az összes kísérlet kombinálásával jól látható a preszinaptikus oldal nagyobb érintettsége a posztszinaptikussal összehasonlítva. Az IEF/SDS-PAGE és 16-BAC/SDS-PAGE kísérletek összesítésekor a szignifikánsan megváltozott és összes elemezhető fehérje-folt aránya  $78/1012 = 0,077$  volt a PRE preparátum, míg  $33/787 = 0,042$  a PSD frakció esetében. Érdekes továbbá a fehérjék mennyiségi változásait is megvizsgálni, tekintve, hogy a szubcelluláris fracionálással kapott minták sok esetben „felszínre hoznak” olyan jelentős molekula mennyiségi különbségeket, amelyeket egyébként „elmaszkolnának” az egyéb sejtkompartimentumokból és irreleváns szöveti elemekből származó, abundáns fehérjék. A csökkenő és növekvő fehérje mennyiségi változások az alábbi tartományokba estek: 1) 1,16–2,21 (átlag: 1,52) és -1,17–(-2,87) (átlag: -1,54) az IEF/SDS-PAGE kísérletben a PRE frakciót vizsgálva, míg 1,2–51,79 (átlag: 1,52) és -1,3–(-2,97) (átlag: -2,11) a PSD preparátumban; 2) 1,16–1,46 (átlag: 1,3) és -1,25 a 16-BAC/SDS-PAGE kísérletben a preszinaptikus, míg 1,17–1,4 (átlag: 1,26) és -1,16–(-1,26) (átlag: -1,22) a posztszinaptikus preparátumban (16. ábra). A nagymértékű, több esetben kétszeres értéket is meghaladó változások szintén arra utalnak, hogy a kísérleti modellben jelentős egyedfejlődési eltérés következett be, amely a szinaptikus preparátumok szintjén tetten érhető. A tömegspektrometriai úton azonosított, statisztikailag szignifikánsan eltérő mennyiségi különbségeket mutató fehérjék listája a 4. és 5. táblázatban látható. A változó fehérje-foltok elhelyezkedése az azonosított fehérjékkel, illetve azok változásainak mértéke a 17. és 18. ábrán láthatók.



**16. ábra.** A preszinaptikus (A) és posztzinaptikus (B) fehérjéket tartalmazó fehérje-foltok fluoreszcencia intenzitás-változásainak mértéke az IEF/SDS-PAGE és 16-BAC/SDS-PAGE kísérletekben.



17. ábra. A változó preszinaptikus fehérjék elhelyezkedése a gélen, illetve változásaik mértéke az IEF/SDS-PAGE (A) és 16-BAC/SDS-PAGE (B) kísérletekben.



**18. ábra.** A változó posztzinaptikus fehérjék elhelyezkedése a gélen, illetve változásaik mértéke az IEF/SDS-PAGE (A) és 16-BAC/SDS-PAGE (B) kísérletekben.



	UniProt fehérje név	UniProt gén név	Változás mértéke (kezelt/kontroll), IEF/SDS-PAGE			Változás mértéke (kezelt/kontroll), 16-BAC/SDS-PAGE	Sejtes funkció	Kapcsolat az ASD (A) és skizofrénia (S) betegségekkel
1	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1	Plcb1				1,29	Jelátvitel	A, S
2	14-3-3 protein epsilon	Ywhae	-1,24				Jelátvitel	A, S
3	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Hspd1	1,37	1,46			Fehérje feltekeredés	S
4	Aconitate hydratase, mitochondrial	Aco2	1,19				Citromsav-ciklus	S
5	Actin, cytoplasmic 1	Actb	1,91			1,37	Citoszkeletális	S
6	Actin, cytoplasmic 2	Actg1	1,28	1,77			Citoszkeletális	
7	Adaptin ear-binding coat-associated protein 1	Necap1	1,24				Klatrin-mediált endocitózis	
8	Alpha-synuclein	Snca	-1,34	1,60			Vezikulum exocitózis szabályozása	S
9	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	Got1				1,22	Aminosav anyagcsere	S
10	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Atp5a1				1,35	Energia háztartás	A
11	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Atp5b	1,75			1,24	Energia háztartás	
12	Beta-synuclein	Snca	1,64				Vezikulum exocitózis szabályozása	
13	Brain acid soluble protein 1	Basp1	2,21				Neurit növekedés	S
14	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	C1qbp	-1,24				Apoptózis szabályozása	
15	Contactin-1	Cntn1				1,29 1,46	Neurit növekedés	A, S
16	Creatine kinase B-type	Ckb				1,32	Energia háztartás	A, S
17	Creatine kinase U-type, mitochondrial	Ckmt1	-1,46	-1,70	-1,80		Energia háztartás	
18	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Uqcrc1	1,25			1,37	Energia háztartás	
19	Destrin	Dstn	-2,87				Mikrofilament organizáció	S
20	Dihydropyrimidinase-related protein 1	Crmp1				-1,25	Neurit növekedés	S
21	Dihydropyrimidinase-related protein 2	Dpysl2	1,71	1,76	1,92		Neurit növekedés	A, S
22	Dihydropyrimidinase-related protein 3	Dpysl3	1,50				Neurit növekedés	S
23	Dihydropyrimidinase-related protein 5	Dpysl5	1,49	1,63			Neurit növekedés	
24	Dynactin subunit 2	Dctn2	1,75				Intracelluláris vezikulum/organelum transzport	S
25	Dynamamin-1	Dnm1	-1,31			1,34	Endocitózis	S
26	Endophilin-A1	Sh3gl2	1,77	1,91			Endocitózis	
27	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	Echs1	-1,20				Lipid metabolizmus	
28	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	Gabarapl2	-1,40				Vezikulum transzport szabályozása	
29	Gamma-enolase	Eno2	1,25	1,28			Glikolízis	A, S
30	Growth factor receptor-bound protein 2	Grb2	1,16				Jelátvitel	S

31	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	Gnb1	-1,26						Jelátvitel	
32	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	Idh3a	-1,71						Citromsav-ciklus	
33	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	Ndufv2	1,25						Energia háztartás	S
34	Neuronal-specific septin-3	Sept3	-1,27						Sejtváz szabályozás	
35	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Ppia	1,18						Fehérje feltekeredés	
36	Peroxiredoxin-2	Prdx2	1,79						Oxidatív stressz reakció	S
37	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	Prdx5	1,18	-2,87					Oxidatív stressz reakció	
38	Phosphoglycerate kinase 1	Pgk1	-1,70						Glikolízis	
39	Protein DJ-1	Park7	1,29						Oxidatív stressz reakció	
40	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1	Pacsin1						1,41	Sejtváz szabályozás	S
41	Septin-11	Sept11	-1,31					1,24	Sejtváz szabályozás	
42	Stress-induced-phosphoprotein 1	Stip1	1,35	1,54	1,70				Fehérje feltekeredés	
43	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	Sod2	-1,21						Oxidatív stressz reakció	A, S
44	Synapsin-1	Syn1	-1,47					1,20	Szinaptikus vezikulum exocitózis	A, S
45	Synapsin-2	Syn2	-1,54	1,40	1,94	1,33			Szinaptikus vezikulum exocitózis	A, S
46	Synaptosomal-associated protein 25	Snap25	1,42	1,48					Vezikulum dokkolás szabályozása	A, S
47	Synaptotagmin-1	Syt1	-1,81						Szinaptikus vezikulum exocitózis	
48	T-complex protein 1 subunit beta	Cct2	-1,75	-1,84					Fehérje feltekeredés	
49	T-complex protein 1 subunit epsilon	Cct5	1,53	1,67					Fehérje feltekeredés	S
50	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	Prdx3	1,27						Oxidatív stressz reakció	
51	Transgelin-3	Tagln3	1,33	1,33					Sejtváz szabályozás	S
52	Tropomodulin-2	Tmod2	1,49						Mikrofilamentum organizáció	
53	Tubulin alpha-1B chain	Tuba1b	1,58						Citoskeletális	
54	Vesicle-fusing ATPase	Nsf						1,16	Vezikulum reciklizáció	A
55	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Vdac1	1,27	1,36				1,26	Iontranszport szabályozás	A, S
56	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	Vdac3	1,87						Iontranszport szabályozás	
57	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	Atp6v1b2	1,58						Iontranszport szabályozás	

**4. táblázat.** A prenatális immunaktiváció által befolyásolt preszinaptikus fehérjék 35 napos korban. A fehérje azonosítására szolgáló adatokon (UniProt fehérje, illetve gén neve) túl, a táblázatban feltüntettük az egyes fehérjékhez tartozó mennyiségi változások mértékét, illetve a sejtes funkcióikat és az autizmus spektrum zavarral (ASD), valamint skizofréniával való

kapcsolatukat (az ez utóbbihoz tartozó hivatkozások a Györfly és mtsai., 2016 közleményben érhetők el).

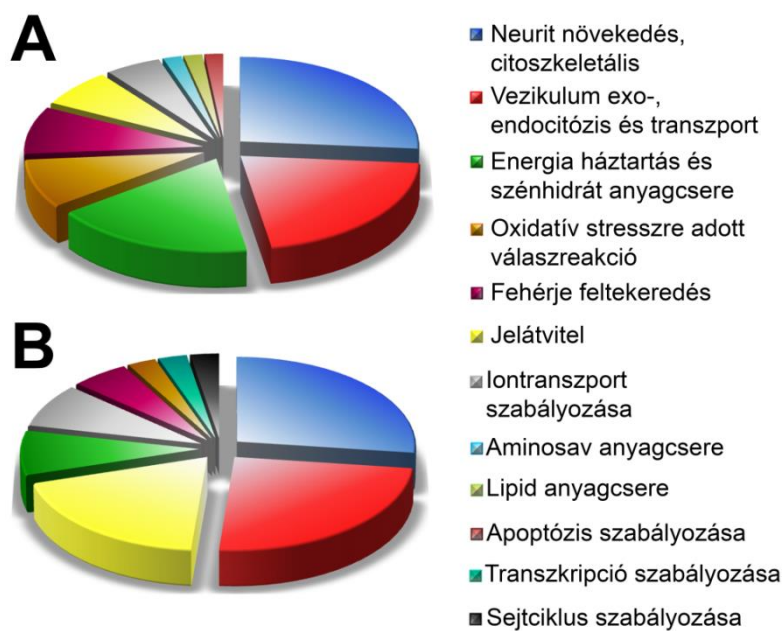
	UniProt fehérje név	UniProt gén név	Változás mértéke (kezelt/kontroll), IEF/SDS-PAGE			Változás mértéke (kezelt/kontroll), 16-BAC/SDS-PAGE			Sejtes funkció	Kapcsolat az ASD (A) és skizofrénia (S) betegségekkel
1	Actin, cytoplasmic 1	Actb	-2,67					Citoszkeletális	S	
2	Alpha-internexin	Ina	-1,88	-2,09				Citoszkeletális	S	
3	AP-2 complex subunit mu	Ap2m1				-1,18		Klatrin-mediált endocitózis	S	
4	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Atp5a1				-1,25		Energia háztartás	A	
5	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	Baiap2				-1,18		Jelátvitel	A, S	
6	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha	Camk2a	-1,49	-2,54	-2,97	-1,18	-1,16	-1,25	Jelátvitel	A, S
7	Clathrin light chain A	Clta	1,49					Klatrin-mediált endocitózis		
8	Clathrin light chain B	Cltb	1,58					Klatrin-mediált endocitózis	S	
9	Coronin-1B	Coro1b	-2,09					Jelátvitel		
10	Disks large homolog 4	Dlg4	-2,54					Jelátvitel	A, S	
11	DnaJ homolog subfamily B member 6	Dnajb6	-2,97					Fehérje feltekeredés		
12	Dynactin subunit 2	Dctn2	1,67					Intracelluláris vezikulum/organellum transzport	S	
13	Glial fibrillary acidic protein	Gfap	1,67			-1,25		Citoszkeletális	A, S	
14	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh				-1,26		Glikolízis		
15	Growth factor receptor-bound protein 2	Grb2	-2,36					Jelátvitel	S	
16	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	Gnao1				1,17		Jelátvitel	A	
17	Heat shock cognate 71 kDa protein	Hspa8				-1,25		Fehérje feltekeredés	S	
18	Myelin basic protein	Mbp	-2,50					Citoszkeletális	A, S	
19	Myosin regulatory light chain RLC-A	Rlc-a	1,25					Vezikulum transzport		
20	Peroxiredoxin-2	Prdx2	1,64					Oxidatív stressz reakció	S	
21	Phosphoglycerate mutase 1	Pgam1	-1,49					Glikolízis		
22	Prohibitin	Phb	-1,30					Sejtciklus szabályozás	S	
23	Ras-related protein Rab-1A	Rab1A				1,40		Vezikulum transzport		

24	Ras-related protein Rab-1B	Rab1b				1,40	Vezikulum transzport	
25	Ras-related protein Rab-35	Rab35				1,40	Vezikulum transzport	
26	Synaptotagmin-1	Syt1	-1,84	-1,95		1,26	Szinaptikus vezikulum exocitózis	
27	Thy-1 membrane glycoprotein	Thy1	-2,97			1,27	Sejt-sejt interakció, szinaptogenezis	
28	Transgelin-3	Tagln3	1,29				Sejtváz szabályozás	S
29	Tropomodulin-2	Tmod2	1,48	1,79			Mikrofilamentum organizáció	
30	Tubulin alpha-1B chain	Tuba1b	-1,88				Citoszkeletális	
31	Tubulin beta-2A chain	Tubb2a	1,67				Citoszkeletális	
32	Tubulin beta-5 chain	Tubb5	-1,88	1,67			Citoszkeletális	
33	Visinin-like protein 1	Vsn11	1,53				Jelátvitel	S
34	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Vdac1	-1,47	-1,79	-2,54		Iontranszport szabályozás	A, S
35	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	Atp6v1b2				-1,25	Iontranszport szabályozás	
36	V-type proton ATPase subunit C 1	Atp6v1c1				1,19	Iontranszport szabályozás	
37	WD repeat-containing protein 61	Wdr61	-1,88				Transzkripció szabályozás	

**5. táblázat.** A prenatális immunaktiváció által befolyásolt posztzinaptikus fehérjék 35 napos korban. A fehérje azonosítására szolgáló adatokon (UniProt fehérje, illetve gén neve) túl, a táblázatban feltüntettük az egyes fehérjékhez tartozó mennyiségi változások mértékét, illetve a sejtes funkcióikat és az autizmus spektrum zavarral (ASD), valamint skizofréniával való kapcsolatukat (az ez utóbbihoz tartozó hivatkozások a Györfly és mtsai., 2016 közleményben érhetők el).

A kapott fehérjék által nyújtott, biológiai eltérésekre és sejtes mechanizmusokban megnyilvánuló különbségekre vonatkozó információk kinyerésére bioinformatikai analízist végeztünk. A fehérje adatbázisok és szakirodalmi publikációk alapján a fehérjéket először sejtes funkcióik szerinti csoportokba soroltuk (19. ábra). Ezek alapján a változó preszinaptikus fehérjék elsősorban a következő klaszterekbe sorolhatók (feltüntetve a besorolt fehérjék darabszámát): sejtváz/neurit növekedés ( $n = 15$ ), szinaptikus vezikulum exo- és endocitózis ( $n = 12$ ) és energia háztartás/szénhidrát anyagcsere ( $n = 10$ ). A további kategóriák közé tartozik az oxidatív stresszre adott válaszreakcióban ( $n = 5$ ), fehérje

feltekeredésben ( $n = 5$ ), jelátvitelben ( $n = 4$ ), iontranszportban ( $n = 3$ ), aminosav anyagcserében ( $n = 1$ ), lipid anyagcserében ( $n = 1$ ) és apoptózisban ( $n = 1$ ) szereplő fehérjék csoportja. A posztzinaptikus kompartmentben a sejtvázt/neurit növekedés ( $n = 10$ ), vezikulum exo-, endocitózis és transzport ( $n = 9$ ) és jelátviteli folyamatok ( $n = 7$ ) kategóriája dominált. Az egyéb, érintett klasztereket az energia háztartás/szénhidrát anyagcsere ( $n = 3$ ), iontranszport-szabályozás ( $n = 3$ ), fehérje feltekeredés ( $n = 2$ ), oxidatív stressz ( $n = 1$ ), transzkripció reguláció ( $n = 1$ ) és sejtciklus szabályozás ( $n = 1$ ) képezi.



**19. ábra.** A pre- (A) és posztzinaptikus (B) fehérjék funkcionális klaszterezésének eredménye.

Az érintett funkcionális kategóriák jobb megismeréséhez további, ún. „feldúsulási” bioinformatikai vizsgálatot végeztünk, amellyel megállapítottuk a változó fehérjekészletben statisztikailag szignifikánsan feldúsult funkcionális kategóriákat – a fehérjék fenti klaszterezésének kiegészítése gyanánt, melyet az eltérő mennyiségben kimutatott fehérjék nagy száma indokolt. Az analízis eredménye megerősítette a leginkább érintett sejtes folyamatok, klaszterezéssel is kimutatott potenciális jelentőségét (6. táblázat), valamint hangsúlyozta az oxidatív stressz-reakció szerepét a preszinaptikus, és sejtvázt érintő módosulások jelentőségét a posztzinaptikus oldalon.

<b>Preszinaptikus fehérjék</b>					
<b>Kategória</b>	<b>Kifejezés</b>	<b>Darabszám</b>	<b>Százalék (%)</b>	<b>p-érték</b>	<b>Benjamini-Hochberg korrekció</b>
GOTERM_BP_FAT	prekurzor metabolitok képzése és energia háztartás	12	21,4	4,00E-09	3,30E-06
GOTERM_BP_FAT	szinaptikus transzmisszió	10	17,9	3,30E-07	1,40E-04
GOTERM_MF_FAT	peroxiredoxin aktivitás	4	7,1	1,80E-06	3,90E-04
GOTERM_BP_FAT	idegi impulzus továbbítása	10	17,9	2,80E-06	7,80E-04
GOTERM_BP_FAT	sejtes légzés	6	10,7	7,60E-06	1,30E-03
GOTERM_BP_FAT	energia előállítása szerves komponensek oxidációjával	7	12,5	6,10E-06	1,30E-03
PANTHER_MF_ALL	sejtváz fehérje	13	23,2	1,90E-05	1,30E-03
GOTERM_MF_FAT	nukleotid kötés	21	37,5	1,30E-05	1,30E-03
PANTHER_BP_ALL	exocitózis	7	12,5	2,00E-05	1,40E-03
GOTERM_BP_FAT	sejt-sejt jelátvitel	10	17,9	9,80E-06	1,40E-03
PANTHER_BP_ALL	intracelluláris fehérje szállítás	14	25	4,10E-05	1,40E-03
GOTERM_BP_FAT	sejtes válasz az oxidatív stresszre	5	8,9	1,40E-05	1,50E-03
GOTERM_BP_FAT	oxidatív foszforiláció	6	10,7	1,30E-05	1,50E-03
GOTERM_BP_FAT	ideg-ideg szinaptikus transzmisszió	5	8,9	1,80E-05	1,70E-03
GOTERM_BP_FAT	neurotranszmitter-szintek szabályozása	6	10,7	2,90E-05	2,40E-03
<b>Posztzinaptikus fehérjék</b>					
<b>Kategória</b>	<b>Kifejezés</b>	<b>Darabszám</b>	<b>Százalék (%)</b>	<b>p-érték</b>	<b>Benjamini-Hochberg korrekció</b>
PANTHER_BP_ALL	intracelluláris fehérje szállítás	12	32,4	2,70E-06	1,40E-04
PANTHER_BP_ALL	sejt struktúra	10	27	7,70E-06	2,00E-04
PANTHER_MF_ALL	citoszkeletális fehérje	10	27	2,20E-05	1,10E-03
PANTHER_BP_ALL	sejt struktúra és motilitás	10	27	3,50E-04	6,20E-03
PANTHER_BP_ALL	mitózis	6	16,2	7,00E-04	9,30E-03
PANTHER_BP_ALL	kromoszóma szegregáció	4	10,8	1,40E-03	1,50E-02
PANTHER_MF_ALL	tubulin	3	8,1	6,20E-04	1,50E-02
GOTERM_MF_FAT	guanil nukleotid kötés	7	18,9	2,80E-04	1,80E-02
GOTERM_MF_FAT	guanil ribonukleotid kötés	7	18,9	2,80E-04	1,80E-02
GOTERM_MF_FAT	GTP kötés	7	18,9	2,20E-04	2,80E-02

GOTERM_MF_FAT	strukturális molekula aktivitás	8	21,6	1,00E-03	4,40E-02
---------------	---------------------------------	---	------	----------	----------

**6. táblázat.** A fehérjekészlet feldúsulási analízisének eredményei. A megfelelő annotációs kategóriába („Kategória”) molekuláris/sejtes funkcionális fogalmakat („Kifejezés”) a *p*-érték Benjamini-Hochberg korrekcióval történő módosítása alapján kapott számértékek szerint rangsoroltuk. A táblázatban feltüntettük a megváltozó fehérjekészletünkben az adott kifejezéshez tartozó fehérjék számát („Darabszám”), illetve e fehérjék százalékos arányát („Százalék (%)”) az összes változó fehérje közül.

Megvizsgáltuk azt is, hogy mely fehérjék lehetnek a kísérletünkben kapott molekulák potenciális közös regulátorai (7. táblázat). A kapott szabályozó fehérjék közül kiemelendő az amiloid béta 4 A4 fehérje (App) és az inzulin-1 (Ins), amelyek mind a PRE, mint a PSD frakcióban a leginkább valószínű regulátorok között szerepelnek. Az oxidatív stressz jelentőségét a preszinaptikus kompartmentben tovább erősíti, hogy a legmagasabb pozícióban található a PRE csoport közös szabályozó fehérjéi közt, az oxidatív stresszre adott válaszreakcióban kulcsszereplő szuperoxid diszmutáz (Sod1) fehérje.

<b>Preszinaptikus fehérjék</b>			
<b>A közös regulátor fehérje neve (a gén neve)</b>	<b>Lokális konnektivitás</b>	<b>Teljes konnektivitás</b>	<b>EASE-érték</b>
Superoxide dismutase [Cu-Zn] (Sod1)	14	655	2,493E-08
Brain-derived neurotrophic factor (Bdnf)	14	1240	2,841E-05
Amyloid beta A4 protein (App)	15	1528	5,745E-05
Insulin-1 (Ins1)	15	1607	9,861E-05
Cellular tumor antigen p53 (Tp53)	13	1636	1,556E-03
<b>Posztzinaptikus fehérjék</b>			
<b>A közös regulátor fehérje neve (a gén neve)</b>	<b>Lokális konnektivitás</b>	<b>Teljes konnektivitás</b>	<b>EASE-érték</b>
Amyloid beta A4 protein (App)	14	1528	1,209E-06
Angiotensinogen (Agt)	12	1261	8,093E-06
Insulin-1 (Ins1)	12	1607	7,618E-05
Pro-epidermal growth factor (Egf)	11	1428	1,466E-04
Transforming growth factor beta-1 (Tgfb1)	11	1564	3,069E-04

**7. táblázat.** A közös regulátor-analízis eredményei. Az EASE-érték alapján rangsorolt, potenciális közös regulátor fehérjék felsorolása mellett feltüntettük az adott regulátor, változó

fehérjékkel képzett kapcsolatainak („Lokális konnektivitás”) és az adatbázisból ismert összes kapcsolatának („Teljes konnektivitás”) számát.

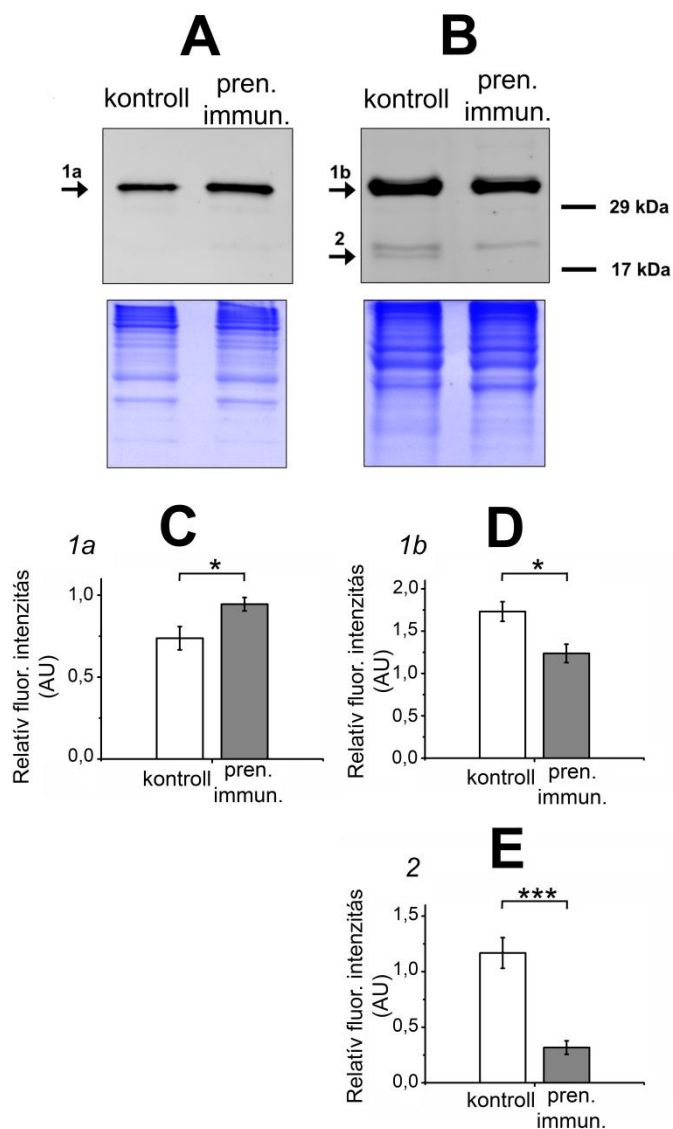
Végül, összehasonlítottuk az általunk a korai immunaktiváció rágcsáló állatmodelljén végzett vizsgálattal kapott változó fehérjéket a skizofréniában és ASD-ben szenvedő betegekből származó mintákon végzett kutatásokból kapott molekulákkal. Annak megválaszolására, hogy van-e, és ha igen, milyen mértékű az átfedés a korábbi molekuláris eredményekkel, figyelembe vettük a skizofréniában és ASD agyi, proteomikai vizsgálataiból kapott eddigi eredményeket, valamint az általunk kapott fehérjék kódoló génjeiben, betegeken leírt variabilitásokat, mutációkat. A jelenlegi munkában a PRE frakcióban leírt változó fehérjék 49%-a ismertén fehérje-szintű/genetikai eltéréseket mutat skizofréniában, míg 23%-uk ASD-ben szenvedő páciensekben (4. táblázat). A PSD frakcióban az átfedés 46%-os skizofréniában, és 22%-os ASD-ben szenvedő betegeken (5. táblázat).

#### **5.1.2.4. A proteomikai eredmények validálása a Vdac1 fehérje mennyiségének kvantifikálásával**

A kapott proteomikai eredmények validálásához elvégeztük a feszültségfüggő anion-szelektív csatorna 1 (Vdac1) fehérje mennyiségének analízisét, melynek kiválasztását az indokolta, hogy a Vdac1 fehérje mind a PRE, mind a PSD frakcióban, több fehérje-foltban is változást mutatott, ugyanakkor, érdekes módon, ellenkező előjellel. A Western blot technikával látható ~33 kDa-os molekulatömegű fehérje, amely megfelel a Vdac1 intakt formájának, a PRE preparátumban  $1,28 \pm 0,14$ -szer nagyobb mennyiségben volt jelen, amely megerősítette a proteomikai eredményt (20. ábra, A, C). A PSD mintából származó, teljes fehérje a gélen, szintén a megfelelő pozícióban  $-1,4 \pm 0,16$ -szoros csökkenést mutatott, ami ugyancsak összhangban áll az ugyanebből a preparátumból, a proteomikai vizsgálatban kapott változással (20. ábra, B, D). A PSD frakcióban továbbá kimutattuk egy ~20 kDa Vdac1 izoforma meglepően nagy, bár jelentős állatok közti varianciát mutató,  $-3,69 \pm 0,83$ -szoros csökkenését is (20. ábra, B, E), amely mérete alapján megfeleltethető a Vdac1, fiziológiai körülmények közt *m*-kalpain által hasított formájának (Ozaki és mtsai., 2009). Összességében elmondható, hogy a proteomikai eredményeinket megerősítették a független technikaként alkalmazott, Western blot technikával kapott adatok. A Vdac1 egyéb, poszttranszlációsán módosított (hasított) formája szintén egyező irányú változást mutatott,



ami összhangban áll azzal, a proteomikai munkánkból kapott megfigyeléssel, hogy a fehérje számos fehérje-foltban mutatható ki statisztikailag szignifikáns változással. A Vdac1 fehérjéről pedig ismert, hogy rendkívül heterogén és kiterjedt poszttranszlációs módosításokon mehet keresztül (Kerner és mtsai., 2012) – amely a számos fehérje-foltban való jelenlétéért felelős.



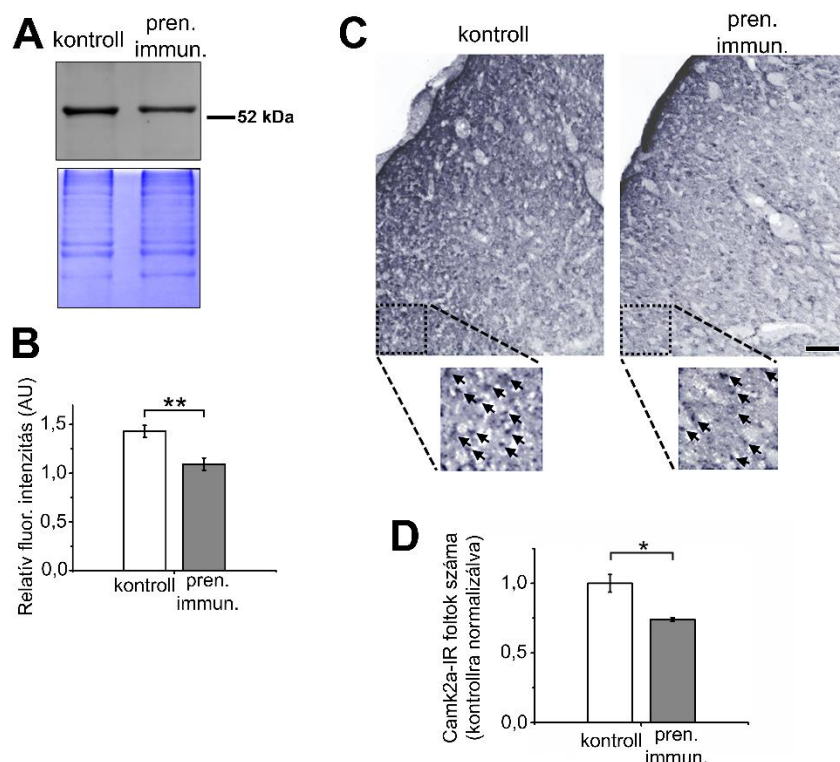
**20. ábra.** A *Vdac1* fehérje proteomikai eredményeinek validálása. Reprezentatív Western blot felvétel a *Vdac1* fehérje mennyiségéről a pre- (A) és poszt-szinaptikus (B) preparátumban a kontroll és prenatális immunaktiváción átesett (pren. immun.) utódokban ( $n = 6-6$ ), a megfelelő gélzsekbe felvitt teljes fehérje mennyiség bemutatásával. A preszinaptikus *Vdac1* intakt formájának (1a) (C), valamint a poszt-szinaptikus *Vdac1* intakt (1b) (D) és hasított (2) (E) formájának denzitometriás kvantifikálásával kapott eredmények. Az átlag  $\pm$  középérték standard hibája felhasználva; \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 5.1.2.5. A Camk2a fehérje változása a poszt-szinaptikus kompartmentben – a prefrontalis agykérgi régió érintettsége

A további vizsgálataink során a kalcium/kalmodulin-függő kináz 2-es típus, alfa (Camk2a) fehérjére fókuszáltunk. A választást az indokolta, hogy a szinaptikus működésben kulcsfontosságú fehérje (Hell, 2014) mennyisége jelentős csökkenést mutatott

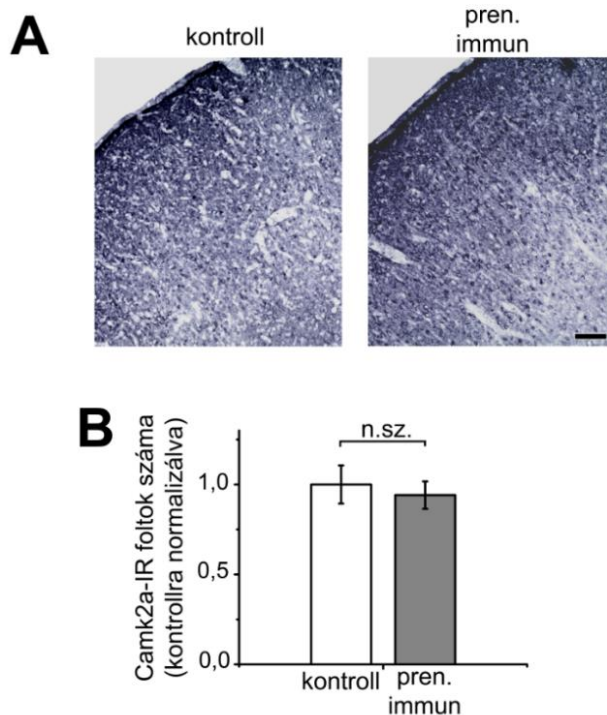
kísérleteinkben: 3-3 fehérje-foltban detektáltuk csökkenését az IEF/SDS-PAGE és 16-BAC/SDS-PAGE vizsgálatokban. Az eredmények validálására végzett Western blot kísérletekben a fehérje  $-1,31 \pm 0,09$ -szoros csökkenését detektáltuk a PSD frakcióban, ezzel igazoltuk a fehérje csökkent mennyiségét a posztszinaptikus kompartmentben (21. ábra, A, B).

A továbbiakban immunhisztokémiai technikával vizsgáltuk a Camk2a fehérje mennyiségét nagyagykérgi struktúrákban. Az immunhisztokémiai kísérleteinkben, a pszichiátriai betegségekben kiemelkedő módon érintett dorsolateralis prefrontalis nagyagykéreg (dlPFC) régiójára (Callicott és mtsai., 2000; Koenigs és Grafman, 2009), illetve az e betegségekben jóval kevesebb szerepet játszó, elsődleges somatosensoros agykéregre koncentráltunk. Ez utóbbi agyterület, bár csak kevésbé érintett a skizofréniában (Edgar és mtsai., 2005; Thoma és mtsai., 2007), ugyanakkor leírták szerepét autizmusban szenvedő betegek szenzoros deficitjeiben (Marco és mtsai., 2012). A pszichiátriai betegségekben játszott szerepével összhangban, immunhisztokémiai vizsgálataink kimutatták a Camk2a mennyiségének  $-1,35 \pm 0,09$ -szoros csökkenését a dlPFC-ben (21. ábra, C, D), míg az elsődleges somatosensoros agykéregben statisztikailag szignifikáns különbséget nem mutattunk ki (22. ábra).



**21. ábra.** A Camk2a mennyiségi különbségének validálása és a fehérje kvantifikálása a dorsolateralis prefrontalis agykéregben. Reprezentatív Western blot felvétel a Camk2a

mennyiségéről kontroll és prenatális immunaktiváción átesett (pren. immun.) utódok ( $n = 6-6$ ) posztszinaptikus frakcióiban, a megfelelő gélzsebekbe felvitt teljes fehérje mennyiség bemutatásával (A) és a denzitometriás kiértékelés eredménye (B). Reprezentatív felvétel a kontroll és kezelt (pren. immun) utódok ( $n = 4-4$ ) dorsolateralis prefrontalis (dlPFC) agykérgéről, Camk2a-immunoreaktív (Camk2a-IR) foltokkal (*nyilak*) (C), és a Camk2a-IR foltok számának meghatározásával kapott eredmények (D). Mércse = 100  $\mu\text{m}$ ; az átlag  $\pm$  középérték standard hibája felhasználva; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .



**22. ábra.** A *Camk2a* fehérje kvantifikálása a primer somatosensoros agykéregben. Reprezentatív felvétel a kontroll és kezelt (pren. immun) utódok ( $n = 4-4$ ) somatosensoros agykérgéről, Camk2a-immunoreaktív (Camk2a-IR) foltokkal (A), és a Camk2a-IR foltok számának meghatározásával kapott eredmények (B). A kontroll és kezelt utódok somatosensoros agykéregében a Camk2a-immunoreaktív foltok száma nem mutat statisztikailag szignifikáns eltérést (nem szignifikáns, n.sz.). Mércse = 100  $\mu\text{m}$ ; az átlag  $\pm$  középérték standard hibája felhasználva.

## 5.2. A perifériás gyulladás agyi proteomra kifejtett hatásának vizsgálata

A következőkben bemutatott vizsgálatunkban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy molekulárisan, a proteom szintjén milyen változások követik a perifériásan indukált gyulladást a KIR-ben, abszensz epilepsziás rohamok generálására genetikailag hajlamos, felnőtt, WAG/Rij patkányokban (Coenen és van Luijtelaaar, 2003). A kísérletek központi eleme a korábban leírt élettani jelenségek és a kapott proteomikai változások közti kapcsolat felderítése, mely segítheti a perifériás immunaktiváció, KIR-i funkciózavarban megnyilvánuló hatásának megértését.

### 5.2.1. A fronto-parietalis agykéreg és thalamus proteomjának megváltozása 12 órával az LPS-kezelést követően

A laboratóriumunkban korábban végzett kutatások kimutatták, hogy a felnőtt WAG/Rij patkányoknak perifériásan (intraperitoneális úton) beadott bakteriális endotoxin, az immunogén LPS képes az abszensz epilepsziás rohamokra jellemző, ún. tüske-hullám kisülések (SWD-k) számának növelésére, dózis-függő módon (Kovács és mtsai., 2006). A perifériásan bejuttatott LPS, a vártnak megfelelően, pro-inflammatorikus citokin-szint emelkedést eredményezett, míg egy anti-inflammatorikus ágens (a prosztaglandin szintézist gátló, indometacin) beadása képes volt az LPS epileptogenezist fokozó hatásának meggátlására (Kovács és mtsai., 2006). A következőkben bemutatott proteomikai vizsgálatot megelőzően laboratóriumunk, kísérletei során reprodukálta az LPS SWD-genezist elősegítő hatását WAG/Rij patkányokban (Györffy és mtsai., 2014). Az 1 mg/testtömeg kg dózisban, intraperitoneálisan beadott LPS megnövelte az SWD-k számát és teljes időtartamát, ugyanakkor fragmentálta a korábbi, hosszú SWD-dominálta periódusokat (Györffy és mtsai., 2014). A kezelés továbbá akut testhőmérséklet csökkenést idézett elő (Györffy és mtsai., 2014), amely összhangban áll az LPS akut hipothermiát előidéző, kutatócsoportunk (Kovács és mtsai., 2006) és mások (Dogan és mtsai., 2000) által korábban is leírt hatásával.

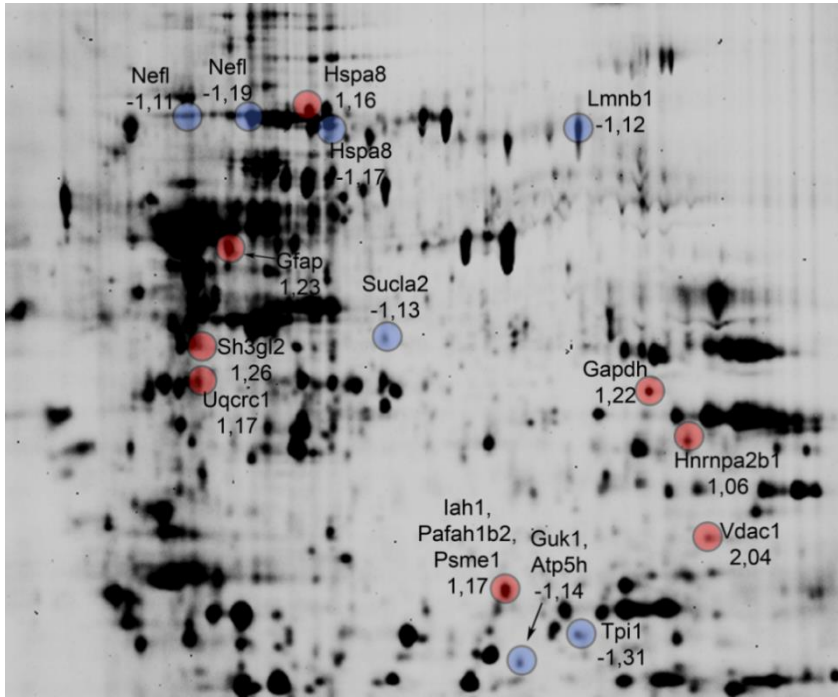
Tekintve, hogy az abszensz epilepsziás rohamok háttérében, anatómiai vonatkozásban a patológiás hiperszinkron aktivitást mutató fronto-parietalis és thalamikus területek állnak (lásd: 8. ábra), e két agyi struktúra proteomikai analízisét végeztük el. A mintagyűjtés az LPS-kezelést követően 12 órával történt, mely időpontban, hipotézisünk szerint már, a fokozott SWD-tevékenységgel összefüggő, kiterjedt változások mentek végbe az érintett területek fehérjekészletében. Vizsgálatunkban szélesebb spektrumú fehérje-szintű változást detektáltunk a thalamusban, mint a fronto-parietalis agykéregben: míg a nagyagykérgi mintában 15, szignifikáns változást mutató fehérje spot-ot, addig a thalamusban 28 darabot azonosítottunk. A csökkent fehérje abundanciát mutató fehérje-foltok a fronto-parietalis agykéregben  $-1,11$ – $(-1,31)$ -szoros, míg a thalamusban  $-1,12$ – $(-1,38)$ -szoros redukciót mutattak. A növekedés mértéke a fronto-parietalis agykéregben az  $1,06$ – $2,04$ -szoros, míg a thalamusban az  $1,11$ – $1,69$ -szoros tartományba esett. A fehérje spot-okban összesen 16 fehérjét azonosítottunk tömegspektrometriai úton a fronto-parietalis agykéregben (23. ábra), míg 35-öt a thalamusban (24. ábra) (8. táblázat). Közülük mindössze négy fehérje, az ATP-szintáz, d alegysége (Atp5h), a gliális fibrilláris savas fehérje (Gfap), a gliceraldehid-3-

foszfát dehidrogenáz (Gapdh) és a neurofilamentum könnyű lánc (Nefl) fehérje szintje mutatott mennyiségi különbséget mindkét agyterületen egyaránt.

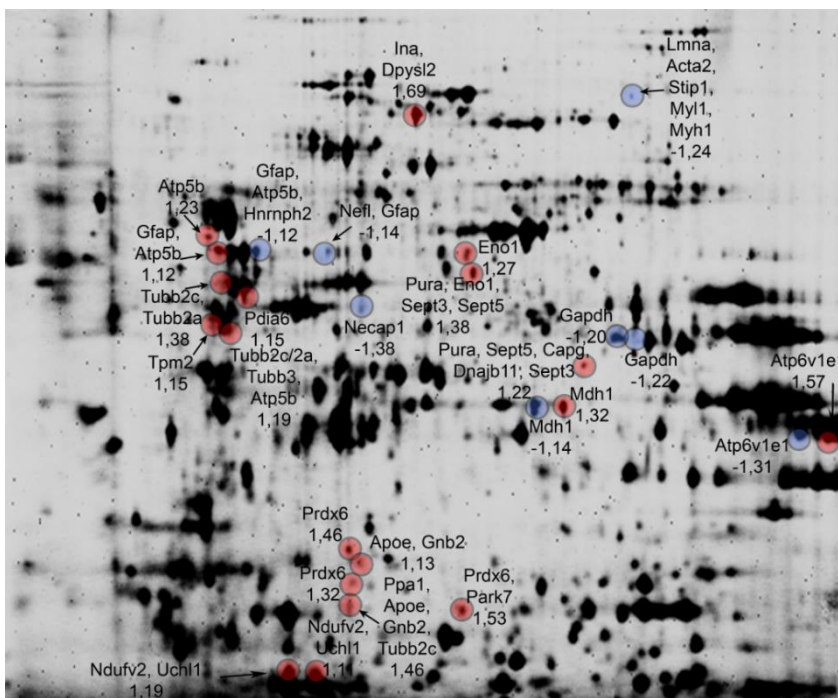
	UniProt fehérje név	UniProt gén név	Változás mértéke (kezelt/kontroll) – thalamus				Változás mértéke (kezelt/kontroll) – agykéreg	Sejtes funkció	
1	Adaptin ear-binding coat-associated protein 1	Necap1	-1,38					Endocitózis szabályozás	
2	Alpha-enolase	Eno1	1,27	1,38				Glikolízis	
3	Alpha-internexin	Ina	1,69					Citoszkeletális	
4	Apolipoprotein E	ApoE	1,13	1,46				Lipoprotein transzport	
5	ATP synthase subunit d, mitochondrial	Atp5h	-1,17				-1,14	Energia háztartás	
6	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	Atp5b	1,12	1,19	1,23	-1,12		Energia háztartás	
7	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Uqcrc1					1,17	Energia háztartás	
8	Dihydropyrimidinase-related protein 2	Dpysl2	1,69					Neurit növekedés	
9	DnaJ homolog subfamily B member 11	Dnajb11	1,22					Fehérje feltekeredés	
10	Endophilin-A1	Sh3gl2					1,26	Endocitózis	
11	Glial fibrillary acidic protein	Gfap	1,12	-1,12	-1,14		1,23	Citoszkeletális	
12	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	-1,2	-1,22			1,22	Glikolízis	
13	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	Gnb2	1,13	1,46				Jelátvitel	
14	Guanylate kinase 1	Guk1					-1,14	Nukleotid metabolizmus	
15	Heat shock cognate 71 kDa protein	Hspa8					1,16	-1,17	Fehérje feltekeredés
16	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	Hnrnpa2b1					1,06		mRNS processzálas
17	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	Hnrnp2	-1,12						mRNS processzálas
18	Inorganic pyrophosphatase	Ppa1	1,46						Foszfát metabolizmus
19	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	Iah1					1,17		Lipid metabolizmus
20	Lamin-A	Lmna	-1,24						Sejtmag organizáció
21	Lamin-B1	Lmnb1					-1,12		Sejtmag organizáció
22	Macrophage-capping protein	Capg	1,22						Mikrofilamentum organizáció
23	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	Mdh1	1,32	-1,14					Szénhidrát anyagcsere
24	Myosin, heavy chain 1; skeletal muscle	Myh1	-1,24						Motor-protein funkció, intracelluláris transzport
25	Myosin, light chain 1	Myl1	-1,24						Motor-protein funkció, intracelluláris transzport
26	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	Ndufv2	1,11	1,19					Energia háztartás
27	Neurofilament light polypeptide	Nefl	-1,14				-1,11	-1,19	Citoszkeletális

28	Neuronal-specific septin-3	Sept3	1,22	1,38		Sejtváz szabályozás	
29	Peroxiredoxin 6	Prdx6	1,32	1,46	1,53	Oxidatív stressz reakció	
30	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	Pafah1b2				1,17	Lipid metabolizmus
31	Proteasome activator complex subunit 1	Psme1				1,17	Fehérje lebontás, immunproteaszóma alkotóelem
32	Protein disulfide-isomerase 6	Pdia6	1,15				Chaperone
33	Protein DJ-1	Park7	1,53				Oxidatív stressz reakció
34	Septin-5	Sept5	1,22	1,38			Sejtváz szabályozás
35	Smooth muscle alpha-actin	Acta2	-1,24				Citoszkeletális
36	Stress-induced-phosphoprotein 1	Stip1	-1,24				Fehérje feltekeredés
37	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	Sucla2				-1,13	Szénhidrát anyagcsere
38	Transcriptional activator protein Pur-alpha	Pura	1,22	1,38			Transzkripció szabályozás
39	Transgelin 2	Tagln2	-1,17				Sejtváz szabályozás
40	Triosephosphate isomerase	Tpi1				-1,31	Glikolízis
41	Tropomyosin 2 (beta chain)	Tpm2	1,15				Mikrofilamentum organizáció
42	Tubulin beta-2A chain	Tubb2a	1,19	1,38			Citoszkeletális
43	Tubulin beta-2C chain, Neuron-specific	Tubb2c	1,19	1,38	1,46		Citoszkeletális
44	Tubulin beta-3 chain	Tubb3	1,19				Citoszkeletális
45	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	Uchl1	1,11	1,19			Fehérje lebontás
46	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Vdac1				2,04	Iontranszport szabályozás
47	V-type proton ATPase subunit E 1	Atp6v1e1	1,57	-1,31			Iontranszport szabályozás

**8. táblázat.** A perifériásan indukált gyulladási reakció hatására a thalamusban, illetve a fronto-parietalis agykéregben megváltozó mennyiségű fehérjék listája.



**23. ábra.** A *frontoparietalis* agykéregben megváltozó mennyiségű fehérjék eloszlása a gélen.



**24. ábra.** A *thalamusban* megváltozó mennyiségű fehérjék eloszlása a gélen.

A fehérjék funkcionális klaszterezése alapján az alábbi sejtes folyamatok/funkciók érintettek a kezelés által (az adott kategóriában érintett fehérjék számának feltüntetésével). Elsőként említendő a citoskeletális változások kiterjedtsége (thalamus (Th): 14; frontoparietalis cortex (Ctx): 3), elsősorban a thalamusban. Emellett jelentős mértékben kimutatható az energia háztartásban és szénhidrát anyagcserében szerepet játszó fehérjék (Th: 6; Ctx: 5), illetve a fehérje szintézisben és feltekeredésben érintett proteinek (Th: 5; Ctx: 2)

megváltozott mennyisége – elsősorban szintén a thalamusban. A további klasztereket a vezikulum reciklizációban (Th: 3; Ctx: 1); lipid metabolizmusban (Th: 1; Ctx: 2); oxidatív stressz reakcióban (Th: 2; Ctx: 0); fehérje lebontásban (Th: 1; Ctx: 1); iontranszport szabályozásban (Th: 1 Ctx: 1); nukleotid anyagcserében (Th: 0; Ctx: 1); foszfát metabolizmusban (Th: 1; Ctx: 0) és jelátvitelben (Th: 1; Ctx: 0) szereplő fehérjék alkotják (8. táblázat).

Összességében kiterjedt fehérje-szintű változásokat detektáltunk a perifériásan indukált, akut gyulladási reakciót követően. Érdekes módon, a thalamus fehérjekészletének áthangolása jóval jelentősebbnek mutatkozott, mint a fronto-parietalis agykéregben megmutakozó proteomikai módosulás. A kiterjedt fehérje mennyiségi változásokat tekintve erősen feltételezhető a thalamus sejtváz struktúrájában megnyilvánuló módosulás, melyre a citoskeleton számos elemének eltérő abundanciája utal az LPS-kezelést követően.

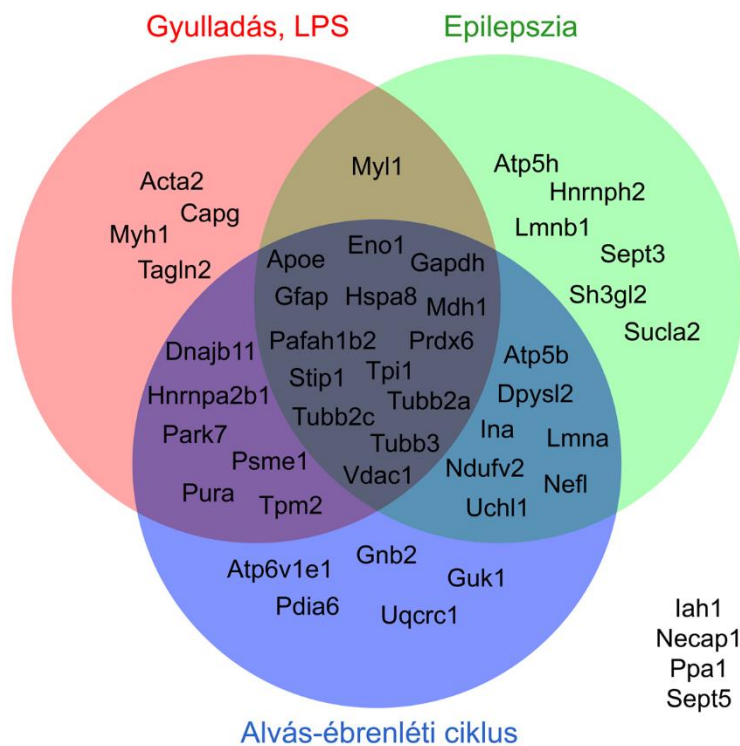
### **5.2.2. A gyulladás, epilepszia és az alvás-ébrenléti ciklus kapcsolata – a proteomikai adatok összhangja az élettani változásokkal**

Ismert, hogy a szervezetben megemelkedett citokin-szint, az általa indukált egyéb pro-inflammatorikus molekulákkal képes az alvás-ébrenléti ciklus alapvető módosítására (Krueger, 2008). A citokin-szint változásának alvásra gyakorolt hatása egyaránt lehet fiziológiás szerepű, illetve adaptív, pathológiás körülmények között, gyulladási reakciók esetén (Opp, 2005). Ezzel összhangban, a patkányoknak perifériásan beadott LPS megnöveli a lassú-hullámú alvás mennyiségét, míg csökkenti az ébrenléti és paradox alvási periódusokat (Krueger és Toth 1994; Schiffelholz és Lancel, 2001). A pro-inflammatorikus túlsúly epileptogenezis-fokozó és egyben szomnogén hatásán túl, pedig ismert, hogy a WAG/Rij patkányokban a fokozott SWD-genezis éppen az alvási periódus kezdetére, az ún. könnyű lassú-hullámú alvási periódusra, illetve passzív ébrenlétre jellemző (Drinkenburg és mtsai., 1991). Laboratóriumunkban végzett kutatások szintén megerősítették ezt az összefüggést, mivel az LPS perifériás beadása, a fokozott SWD-aktivitás mellett, megnövelte a könnyű lassú-hullámú aktivitást, míg csökkentette az ébrenléti állapotot az elektrofiziológiai mérések ideje alatt, az abszensz epilepszia WAG/Rij állatmodelljében (Györffy és mtsai., 2014).

Az élettani jellemzők ismeretében tehát kíváncsiak voltunk arra, hogy a jelenlegi vizsgálatban megváltozott mennyiségben kimutatott fehérjék milyen, szakirodalomban ismert kapcsolatban állnak a gyulladással, epilepsiával és alvás-ébrenléti ciklussal. A kapott 47



fehérje közül 25 összefüggésben áll a gyulladási reakcióval, 28 az epilepsziával, míg 32 az alvás-ébrenléti ciklussal. Összesen 14 fehérje pedig mindhárom kategóriával kapcsolatban van, korábbi tanulmányok alapján (25. ábra). Az irodalmi adatok szisztematikus elemzésével kapott adatok összhangban állnak a három látszólag különálló biológiai, élettani jelenség kapcsolatáról szóló korábbi eredményekkel, és molekuláris szinten is kapcsolatot mutattak ki közöttük. Proteomikai eredményeink támogatják a mechanisztikus elméletet, amelynek értelmében a pro-inflammatorikus reakció továbbterjed a perifériáról a központi idegrendszerbe (a folyamat lehetséges útvonalainak egy összefoglalását lásd: 3. ábra), mely folyamat hiperszinkronitást eredményez a thalamo-kortikális aktivitásban, ami egyrészt növeli az alvás kezdeti periódusára jellemző, könnyű lassú-hullámú kortikális aktivitást, és emellett megemeli az SWD-képződést.



**25. ábra.** A megváltozott mennyiségű fehérjék kapcsolata a gyulladással (illetve az LPS-kezeléssel), epilepsziával és alvás-ébrenléti ciklussal. Az egyes fehérjékhez tartozó hivatkozások a Györfly és mtsai., 2014 közleményben találhatóak.

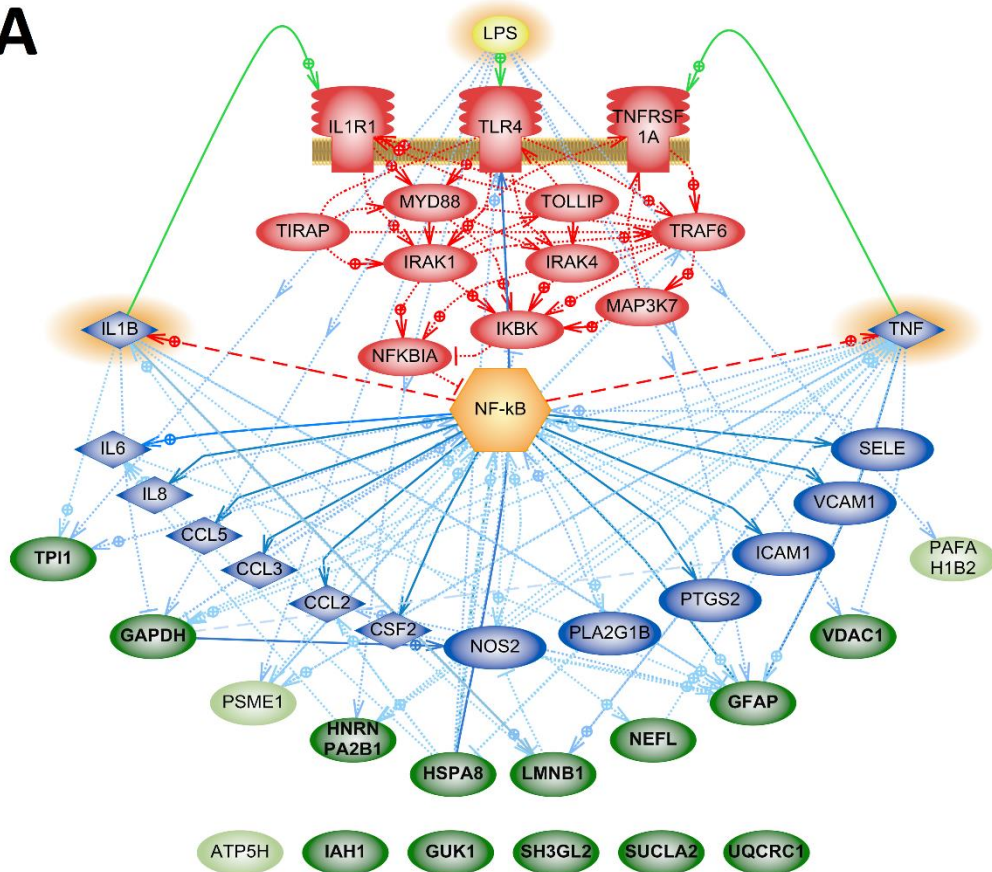
### 5.2.3. Az LPS-indukált NFκB-út vonal jelentősége a KIR-i fehérjekészlet módosulásában

Mint korábban utaltunk rá, a perifériás LPS KIR-i hatását közvetett úton fejt ki, tekintve, hogy nem képes átjutni a vér-agy gáton (3. ábra). A közvetett hatás pedig elsősorban a KIR-i kapillárisok endotheliális sejtjeinek felszínén található, LPS-kötő toll-

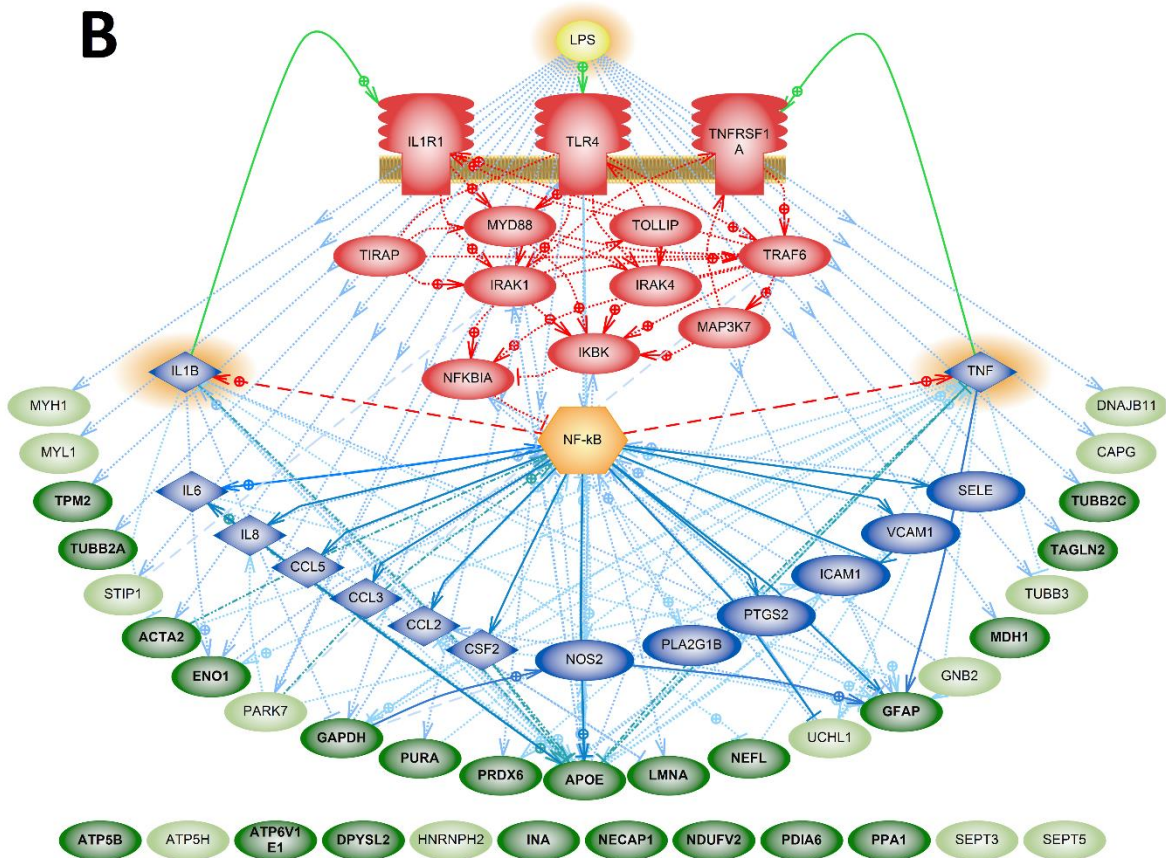
szerű receptor 4 (TLR4) fehérjén keresztül valósul meg (Singh és Jiang, 2004). Az LPS-TLR4 interakció pedig indukálja az NFκB jelátviteli útvonal aktiválódását (Kawai és Akira, 2007). E fontos gyulladási útvonal iniciációja, többek közt számos citokin szintézisét és szekrécióját idézi elő, melyek önmagukban is képesek az NFκB jelátviteli útvonal aktiválására (Bonizzi és Karin, 2004), ezzel öngerjesztő folyamatot indítva el. Mindez KIR-i citokin-szintézist és szekréciót vált ki (lásd: 2.1.2. *alfejezet*), mely kiterjedten képes befolyásolni a KIR-i működést. Látható, hogy a mechanizmusban kulcsfontosságú a TLR4-aktiváció által indukált NFκB jelátviteli útvonal. Hipotézisünk szerint ez a molekuláris kaszkád központi jelentőségű lehet a thalamo-kortikális hiperszinkronitás kialakulásáért is. Feltevésünket bioinformatikai úton, a jelátviteli útvonalak és a proteomikai eredményünk összevetésével teszteltük. Az analízis során a Pathway Studio program segítségével létrehoztuk az NFκB jelátviteli útvonal modelljét. A fehérje-hálózati modellben szerepelt az útvonalat aktiváló LPS, az NFκB útvonal, és az ez utóbbi által szabályozott faktorok mellett külön a fronto-parietalis agykéreg és thalamus proteomikai analízisével kapott, változó fehérjék listája is. A bioinformatikai vizsgálat értelmében jelentős mértékű konnektivitás áll fenn az LPS–NFκB útvonal, illetve az általunk jelenleg kimutatott fehérjék között: a 16-ből 10 fehérje mutat kapcsolatot a hálózattal a fronto-parietalis agykéregből, illetve a 35-ből 23 fehérje a thalamusból (26. *ábra*).

A sejtes jelátviteli útvonalak komplexitása miatt természetesen nem állíthatjuk, hogy a fentiekben bemutatott mechanizmus felelős kizárólag a gyulladási reakció által okozott KIR-i funkciózavarért, ugyanakkor hálózati modellezéssel kapott eredményeink erősen feltételezik, hogy a thalamus és fronto-parietalis agykéreg proteomjának áthangolása az NFκB jelátviteli útvonal által befolyásolt.

**A**



**B**



**26. ábra.** A fronto-parietalis agykéregben és a thalamusban azonosított, változó mennyiségű fehérjék kapcsolata az NF $\kappa$ B, gyulladási jelátviteli útvonallal. Az ábrán látható, hogy az LPS által indukált jelátviteli folyamatok pro-inflammatorikus gyulladási reakciót váltanak ki, amely citokinek szekréciójához és a gyulladási kaszkád felerősödéséhez vezet, és amelynek egyik központi szereplője az NF $\kappa$ B transzkripciós faktor. A perifériás gyulladást követően indukált, NF $\kappa$ B-mediált jelátviteli folyamatok központi idegrendszeri funkciókra gyakorolt jelentőségére utal, hogy az LPS-en túl az NF $\kappa$ B, illetve az azt szabályozó (*piros elemek*), és az általa szabályozott (*kék elemek*) fehérjék is számos kapcsolatot létesítenek az általunk azonosított fehérjékkel a fronto-parietalis agykéregben (A) és a thalamusban (B) (*zöld elemek*; *sötétzöld*: a mennyiségi változásért biztosan felelős fehérje; *világoszöld*: a mennyiségi változáshoz hozzájárult fehérje).

Rövidítések, melyek nem szerepeltek a 8. táblázatban: CCL2: C–C motif chemokine 2; CCL3: C–C motif chemokine 3; CCL5: C–C motif chemokine 5; CSF2: granulocyte–macrophage colony-stimulating factor; ICAM1: intercellular adhesion molecule 1; I $\kappa$ BK: inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase; IL1B: interleukin-1 beta; IL1R1: interleukin-1 receptor type 1; IL6: interleukin-6; IL8: interleukin-8; IRAK1: interleukin-1 receptor-associated kinase 1; IRAK4: interleukin-1 receptor-associated kinase 4; LPS: lipopolysaccharide; MAP3K7: mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7; MYD88: myeloid differentiation primary response protein MyD88; NF- $\kappa$ B: nuclear factor NF-kappa-B; NFKBIA: NF-kappa-B inhibitor alpha; NOS2: nitric oxide synthase, inducible; PLA2G1B: phospholipase A2; PTGS2: prostaglandin G/H synthase 2; SELE: E-selectin; TIRAP: toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein; TLR4: Toll-like receptor 4; TNF: tumor necrosis factor; TOLLIP: toll-interacting protein; TRAF6: TNF receptor-associated factor 6; VCAM1: vascular cell adhesion protein 1.

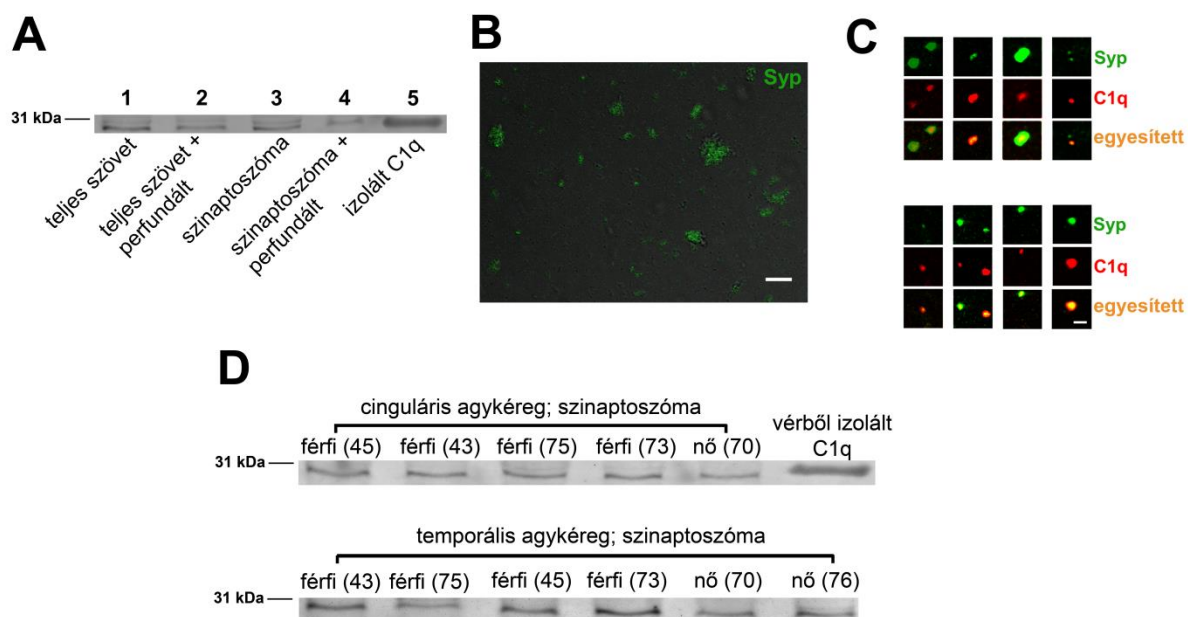
### **5.3. A központi idegrendszeri komplementrendszer szerepe a szinaptikus működésben – a C1q-jelölt szinapszisok jellemzése**

Ismert, hogy a komplement-mediált szinapszis-eltávolításban a C1q fehérje kitüntetett szerepű, hiszen, akár csak a periférián, ez a komplementrendszer klasszikus útvonalának az a komponense, mely hozzáköt az eltávolítandó elemekhez, ezzel kijelölve azokat az elimináció végző sejteknek (Perry és O’Connor, 2008). Ebben a folyamatban tehát dominánsan a KIR-i immunsejtek, a mikroglia sejtpopuláció által szintetizált és szekretált C1q fehérje (Fonseca és

mtsai., 2017) szelektíven megjelöl bizonyos szinaptikus kapcsolatokat szintén a mikroglia sejtek általi fagocitózissal. A továbbiakban bemutatandó vizsgálatok célja első lépésben a szinaptikus C1q fehérje lokalizációjának jellemzése, ezt követően pedig a C1q-jelölt szinapszisok molekuláris karakterizálása. Az elsősorban a proteomikai analízisre épülő további kutatások célja annak feltárása, hogy milyen folyamatok játszhatnak szerepet a szinapszisok C1q-jelölésében.

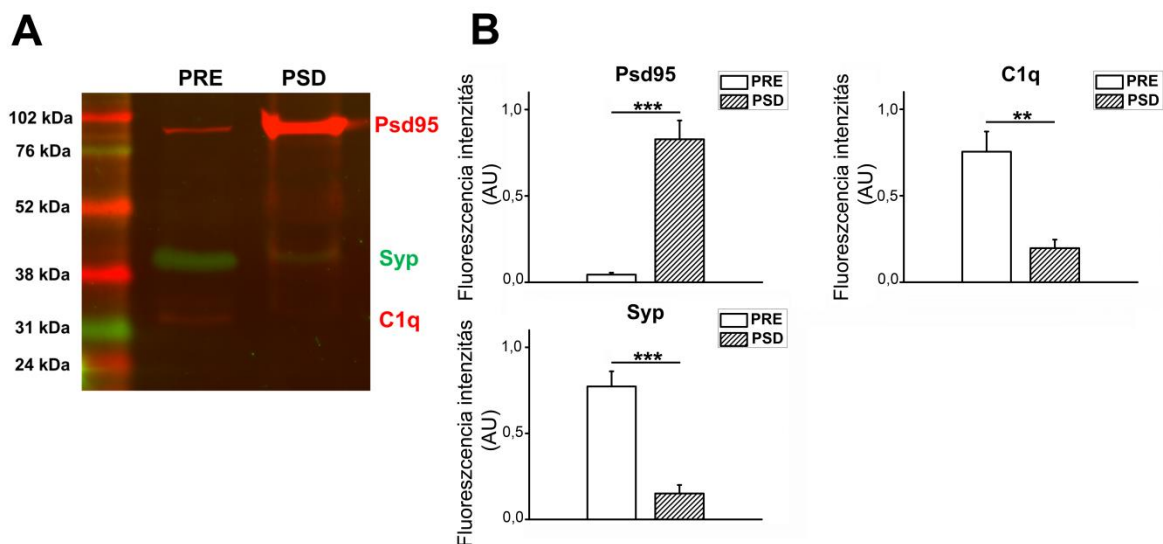
### **5.3.1. A C1q fehérje kimutatása a szinaptikus régióban – elsősorban preszinaptikus lokalizáció**

Vizsgálatainkban először a C1q fehérje szinaptikus jelenlétének igazolását és szinapszison belüli lokalizációjának kimutatását végeztük el. A fehérje szinaptikus jelenlétét szinaptoszóma preparátumokon vizsgáltuk, mely szubcelluláris frakció tisztaságát korábban validáltuk (15. ábra). A teljes nagyagykérgi szövethomogenizátumon túl, kimutattuk a C1q fehérjét szinaptoszóma preparátum homogenizátumában is (27. ábra, A). Kizárható, hogy pusztán az agyszövet érhálózatában található, perifériás eredetű C1q fehérjét detektáltuk, mivel a fehérje jelenlétét demonstráltuk transzkardiális perfúzió átesett egerek nagyagykérgi és szinaptoszóma preparátumában is (27. ábra, A). A szinapszisok felszínén található C1q detektálásához elvégeztük az intakt szinaptoszómákat tartalmazó preparátum immunjelölését. A szinaptikus marker, Syp-tartalmú szinaptoszómák csoportja jól látható volt fénymikroszkópos technikákkal is, amennyiben azokat a nagy ionerejű, de hasonló vizsgálatokban gyakran alkalmazott PBS oldatban kezeltük (27. ábra, B). A további, áramlási citometriai vizsgálataink során alapvető fontosságú volt a szinaptoszómák aggregációjának meggátlása (lásd: 5.3.2. *alfejezet*), ezért a PBS-közeg helyett szacharóz-alapú, kis ionerejű oldatot (SET-puffert) alkalmaztunk. Ebben a közegben nem következik be a szinaptoszómák aggregációja, ahogyan azt korábban Choi és munkatársai bemutatták (Choi és mtsai., 2009b). Konfokális mikroszkópos vizsgálatainkban kimutattuk a C1q fehérje jelenlétét az egyedi szinaptoszómák felszínén (27. ábra, C). Végül, prezentáltuk, hogy a C1q fehérje jelen van különböző korú és nemű humán alanyok, két különböző nagyagykérgi területéből preparált, *post mortem* szinaptoszóma preparátumainak homogenizátumában (27. ábra, D).



**27. ábra.** A C1q fehérje kimutatása a szinaptikus frakcióban. (A) A C1q fehérje kimutatása az egér nagyagykérgében Western blot technikával. A C1q fehérje detektálható a teljes agyszöveti homogenizátumban és a szinaptoszóma frakcióban is. A fehérje kimutatható perfundált egérből származó, így vérszennyeződést nem tartalmazó mintákban is. (B) Szinaptofizin (Syp)-pozitív szinaptoszómák fénymikroszkópos felvétele. A szinaptoszómák aggregálódtak a PBS-közegben (a szinaptoszóma-frakciót nem szűrtük át szűrőmembránon a felvétel készítése előtt). (C) Diszpergálódott szinaptoszómák a SET-pufferben. A C1q-pozitív szinaptoszómák kolokalizációt mutatnak a szinaptikus marker, Syp fehérjével. (D) A C1q fehérje kimutatható humán alanyok különböző nagyagykérgi régióiból preparált szinaptikus frakcióiban Western blot technikával. A humán C1q fehérje izolálását Kun Judit (MTA-ELTE NAP B Neuroimmunológiai Kutatócsoport) végezte. Mércse = 20  $\mu$ m (B), 5  $\mu$ m (C).

Annak megállapítására, hogy dominánsan mely szinaptikus oldalon található a C1q fehérje, a 15. ábrán prezentált pre- és posztzinaptikus membrán frakciókat preparáltunk, melyek homogenizátumában vizsgáltuk a fehérje mennyiségét. A Western blot technikával végzett analízis során a jelen mintákban is igazoltuk a preszinaptikus Syp fehérje feldúsulását a preszinaptikus frakcióban, míg a posztzinaptikus marker, Psd95 fehérje szinte kizárólagos jelenlétét a posztzinaptikus oldalon (28. ábra). Eredményeink alapján elmondható, hogy a C1q fehérje dominánsan a preszinaptikus oldalhoz asszociált (PSD/PRE C1q-szint =  $0,26 \pm 0,03$  (átlag  $\pm$  középérték standard hibája),  $p = 0,0013$ ) (28. ábra). Mindez azt feltételezi, hogy a szinapszisok C1q-általi, szelektív kijelölése elsősorban a preszinapszishoz kötött.



**28. ábra.** A C1q fehérje eloszlása a pre- és posztzinaptikus membránban. (A) Reprezentatív Western blot felvétel a preszinaptikus marker, Syp, a posztzinaptikus Psd95, valamint a C1q fehérje mennyiségéről a pre- (PRE) és posztzinaptikus (PSD) membránfrakciókban ( $n = 6$ ). (B) A Syp, Psd95 és C1q fehérjék denzitometriás kvantifikálással kapott mennyiségi eloszlása a PRE és PSD frakciókban. Az átlag  $\pm$  középérték standard hibája felhasználva; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

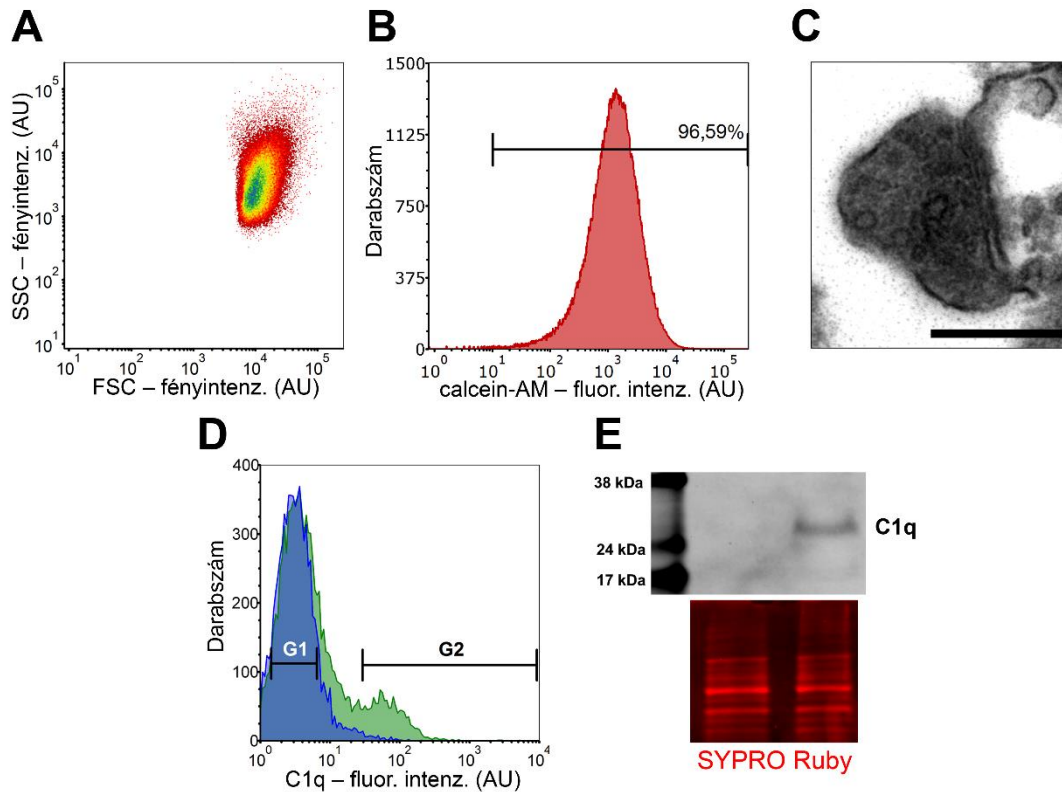
### 5.3.2. A C1q-jelölt szinaptoszómák szortolásának bemutatása

A C1q-jelölt szinapszisok molekuláris karakterizálásához, immunjelölésüket követően fluoreszcencia-aktivált áramlási citometriai és sejtszortírozási technika segítségével különítettük el a felszínükön C1q-jelet tartalmazó szinaptoszómákat a nem jelöltektől. A szinaptoszómák áramlási citometriai vizsgálatának (Wolf és Kapatos, 1989; Gylys és mtsai., 2000; D'Amelio és mtsai., 2011; Postupna és mtsai., 2014; Caesar és mtsai., 2015), továbbá szortolásának (Biesemann és mtsai., 2014) megvalósíthatóságát napjainkig mindössze néhány kutatócsoport írta le. Fontos továbbá megjegyezni, hogy a korábban közölt munkák metodikailag jelentős eltéréseket mutattak (pl. fluoreszcencia detektálása antitest-alapú technikával vagy transzgenikusan előállított konstrukció segítségével). A C1q-jelölt szinaptoszómák áramlási citometriai vizsgálata így a technika előzetes optimalizálását igényelte. Legfontosabb különbségként említhető, hogy a már említett módon, metodikai eljárásunkban a korábbi munkánkban alkalmazott PBS helyett SET-puffer közeget használtunk a szinaptoszómák immunjelölése során, kiegészítve 0,5% (vol/vol) Pluronic F-68

detergens hozzáadásával. Ebben a médiumban a szinaptoszómák nem mutattak a PBS közegben tapasztalható hasonló aggregációt (27. *ábra, B, C*). Mindezt kiegészítettük a szinaptoszóma-szuszpenzió átszűrésével egy 5  $\mu\text{m}$  pórusátmérőjű membránon, mely procedúrát korábban sikeresen alkalmazták szinaptoszóma preparátum előállítására a szinaptoszómák méretének figyelembevételével (Johnson és mtsai., 1997; Bajor és mtsai., 2012). Így eltávolítottuk a mégis aggregálódott szinaptoszómákat, illetve a nagyméretű szennyezéseket. Az áramlási citometriai vizsgálat során, az így előállított szinaptoszóma-frakció homogén populációt alkotott, méretüket és belső granuláltságukat tekintve (29. *ábra, A*), illetve az egyedi szinaptoszómák mérete a 0,5-1  $\mu\text{m}$ -es tartományba esett, kalibrációs gyöngyökkel való összevetésük alapján. Ez a mérettartomány megegyezik a korábban is leírt eredményekkel (Biesemann és mtsai., 2014). A szinaptoszómák granuláltságáról információt nyújtó fényszóródási paraméterek nem változtak a szortolás ideje alatt, mely arra utal, hogy integritásukat a procedura alatt megőrizték. A frakció sejtes törmeléktől mentesnek bizonyult, tekintve, hogy a szinaptikus frakció szinte teljesen jelölhető volt a sejtes életképességi vizsgálatokban gyakran alkalmazott calcein-AM fluoreszcens festékkel (29. *ábra, B*). Továbbá, a szortolt szinaptoszómák frakciójában intakt szinaptoszómákat mutattunk ki elektronmikroszkópos technikával is (29. *ábra, C*).

A C1q-jelölt és nem jelölt szinaptoszómák proteomikai összehasonlításához összesen 6 állat nagyagykérgéből izolált szinaptoszóma frakciót vizsgáltunk. A C1q-jelölt és nem jelölt szinaptoszómák különválasztása során, minden esetben szigorúan elkülönítettük a valódi C1q-pozitív szinaptoszómákat a nem jelölt populációtól, melyhez a negatív kontroll (csak másodlagos antitesttel jelölt) minta szolgált alapul (29. *ábra, D*). Szortolt szinaptoszómák homogenizátumának Western blot technikával történő vizsgálatával igazoltuk a szortolás nagyfokú tisztaságát (29. *ábra, E*). A szinaptoszómák  $15,60 \pm 1,24\%$ -a (átlag  $\pm$  középérték standard hibája felhasználva, 6 független vizsgálat) bizonyult C1q-pozitívnak. Összességében elmondható, hogy munkánk során sikerült megvalósítani a C1q-jelölt szinaptoszómák elkülönítését a nem jelölt populációtól, ami lehetővé tette a további, proteomikai vizsgálatot.





**29. ábra.** Szinaptoszómák áramlási citometriai analízise és szortolásuk a C1q-jel alapján. (A) A szinaptoszómák homogén populációja méretük (FSC) és belső granuláltságuk (SSC) alapján. (B) Reprezentatív áramlási citometriai felvétel, mely demonstrálja, hogy a szinaptoszóma frakció csaknem teljesen jelölhető az életképességet jelző calcein-AM fluoreszcens festéssel ( $n = 4$  független kísérlet). (C) Elektronmikroszkópos felvétel egy szortolt, intakt szinaptoszómáról. (D) A szinaptoszómák fluoreszcenciáját bemutató reprezentatív hisztogram ( $n > 6$  független kísérlet). A kék hisztogram a csak másodlagos antitesttel jelölt, negatív kontroll minta, míg a zöld hisztogram az anti-C1qA elsődleges antitesttel is jelölt szinaptoszómák fluoreszcenciáját demonstrálja. A G1 kapu a C1q-val nem jelölt, míg a G2 a C1q-jelölt szinaptoszómákat jelöli. (E) Reprezentatív Western blot felvétel a C1q fehérje mennyiségéről a C1q-val jelölt és nem jelölt 6-6 millió, leválogatott szinaptoszóma homogenizátumában, kiegészítve a teljes fehérje mennyiséget kimutató, SYPRO Ruby festéssel kapott felvétellel ( $n = 4$  független kísérlet). Mércse = 0,25  $\mu\text{m}$ .

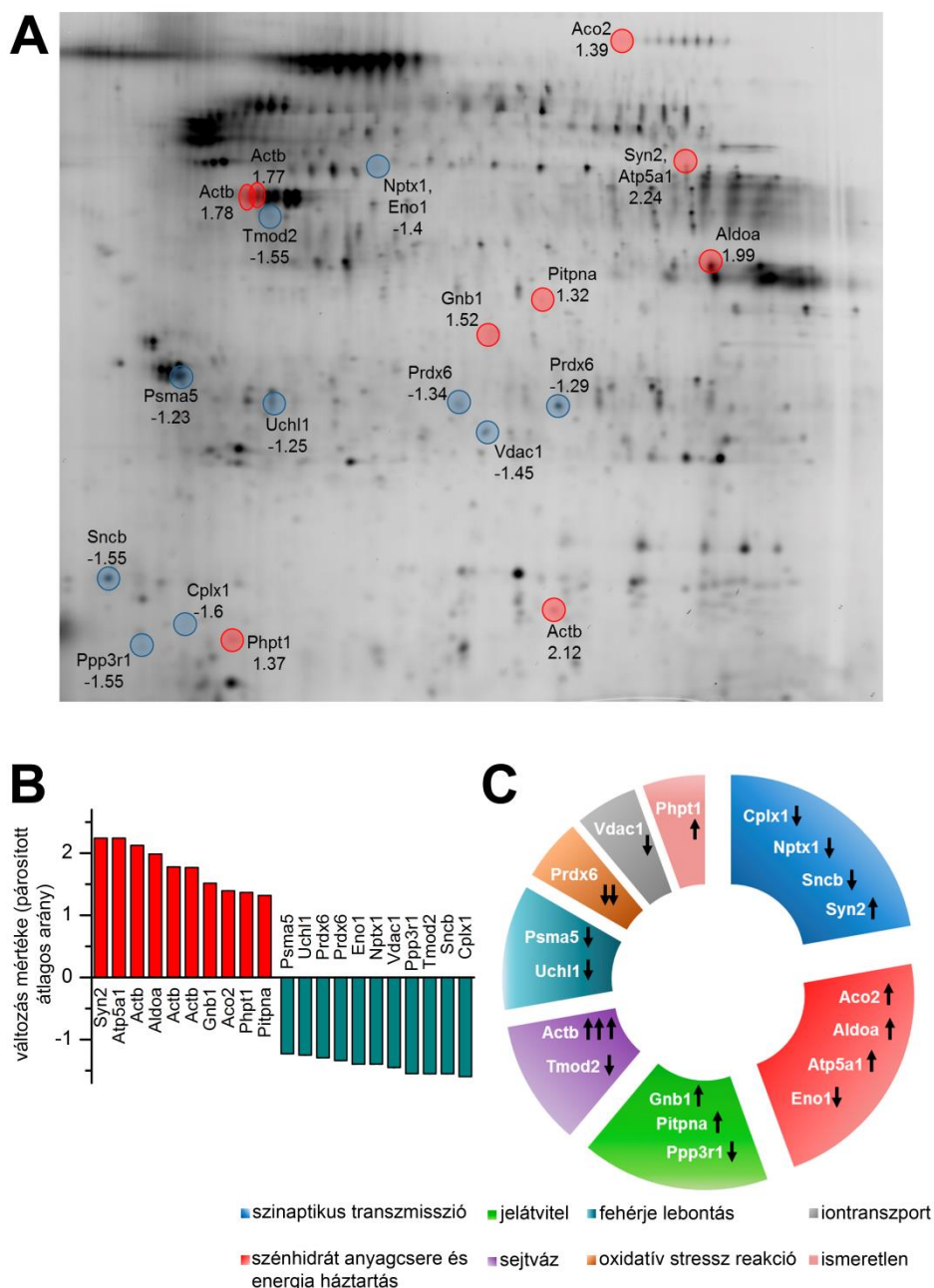
### 5.3.3. A C1q-jelölt szinaptoszómák proteomjának karakterizálása

A két szinaptoszóma populáció fehérjekészletének összehasonlításához 6 állat 2-2 millió, szortolt C1q-jelölt és nem jelölt szinaptoszóma homogenizátumát használtuk fel. A

gél-alapú proteomikai vizsgálathoz az ún. Saturation Labeling 2-D DIGE technikát alkalmaztuk, mely lehetővé teszi mindössze néhány mikrogram fehérje fluoreszcens festékkel történő jelölését és kvantifikálását (Arnold és Fröhlich, 2012). A proteomikai munka végére 19 olyan, szignifikáns változást mutató fehérje spot-ot kaptunk, melyek fehérjetartalmának meghatározását elvégezhetjük (9. táblázat). Közülük 10 fehérje spot fluoreszcens intenzitása szignifikáns csökkenést, míg 9 növekedést mutatott. A változások mértékét tekintve a csökkenés a -1,23–(-1,60)-szoros, míg a növekedés a 1,32–2,24-szoros tartományba esett (30. ábra, A, B). Összességében 18, szignifikáns változást mutató fehérjét azonosítottunk (30. ábra, A, B).

	UniProt fehérje név	UniProt gén név	Változás mértéke (C1q-jelölt/nem jelölt)			Sejtes funkció
1	14 kDa phosphohistidine phosphatase	Phpt1	1,37			Ismeretlen
2	Aconitate hydratase, mitochondrial	Aco2	1,39			Szénhidrát anyagcsere
3	Actin, cytoplasmic 1	Actb	1,78	1,77	2,12	Citoszkeletális
4	Alpha-enolase	Eno1	-1,40			Glikolízis
5	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Atp5a1	2,24			Energia háztartás
6	Beta-synuclein	Sncb	-1,55			Szinaptikus transzmisszió
7	Calcineurin subunit B type 1	Ppp3r1	-1,55			Jelátvitel
8	Complexin-1	Cplx1	-1,60			Szinaptikus vezikulum exocitózis
9	Fructose-bisphosphate aldolase A	Aldoa	1,99			Glikolízis
10	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	Gnb1	1,52			Jelátvitel
11	Neuronal pentraxin-1	Nptx1	-1,40			Szinaptikus transzmisszió
12	Peroxiredoxin-6	Prdx6	-1,29	-1,34		Oxidatív stressz reakció
13	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	Pitpna	1,32			Jelátvitel
14	Proteasome subunit alpha type-5	Psm5	-1,23			Fehérje lebontás
15	Synapsin-2	Syn2	2,24			Szinaptikus vezikulum exocitózis
16	Tropomodulin-2	Tmod2	-1,55			Mikrofilamentum organizáció
17	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	Uchl1	-1,25			Fehérje lebontás
18	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Vdac1	-1,45			Iontranszport szabályozás

9. táblázat. Fehérje mennyiségi különbségek a C1q-jelölt és nem jelölt szinapszisokban.



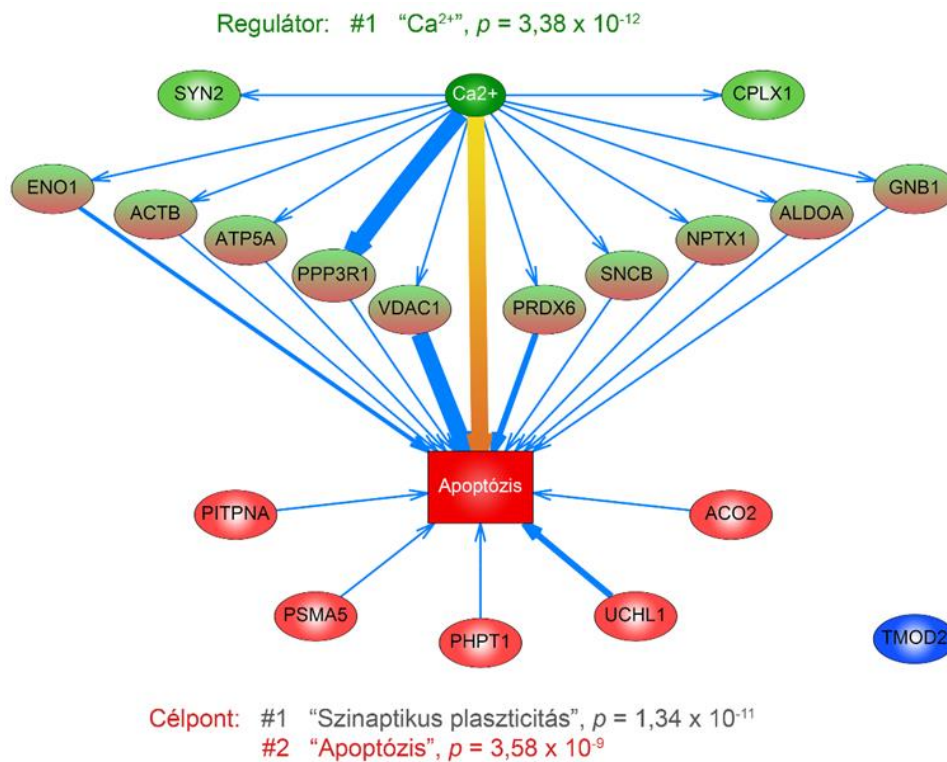
**30. ábra.** A Clq-jelölt és nem jelölt szinaptoszómák proteomikai összehasonlításának eredménye. (A) Reprezentatív felvétel az eltérő mennyiségű fehérjék elhelyezkedéséről a gélen, a változások mértékének feltüntetésével. (B) A vizsgálatban kimutatott fehérje mennyiségi különbségek mértékének összefoglalása. A változás mértékét, a kiértékeléshez használt DeCyder 2-D Differential Analysis Software által, párosított mintáknál prezentált, ún. párosított átlagos arányként tüntettük fel. (C) Az eltérő mennyiségben kimutatott fehérjék funkcionális klaszterezése sejtes szerepük alapján.

Az eltérő mennyiségben azonosított fehérjéket funkcionálisan klasztereztük sejtszerepük alapján. Eredményeink alapján megállapítható számos általános

sejtszintű folyamat (szénhidrát anyagcsere és energia háztartás, sejtvíz átalakulás, fehérje lebontás, oxidatív stressz reakció, iontranszport), valamint a specifikus, szinaptikus mechanizmus, a szinaptikus transzmisszió érintettsége is (30. ábra, C). Érdekes módon, míg a szinaptikus transzmisszióban érintett négy fehérje közül három is csökkenést mutatott, addig ezzel ellentétben, a szénhidrát anyagcserében szereplő négy fehérjéből három szintjének emelkedését írtuk le. A proteomikai eredmények alapján a szinaptikus régió eltérő funkcionális állapota feltételezhető, mely a C1q-jelölés alapját képezheti.

#### **5.3.4. A lokális, szinaptikus apoptotikus mechanizmus szerepet játszik a szinapszisok C1q-jelölésében**

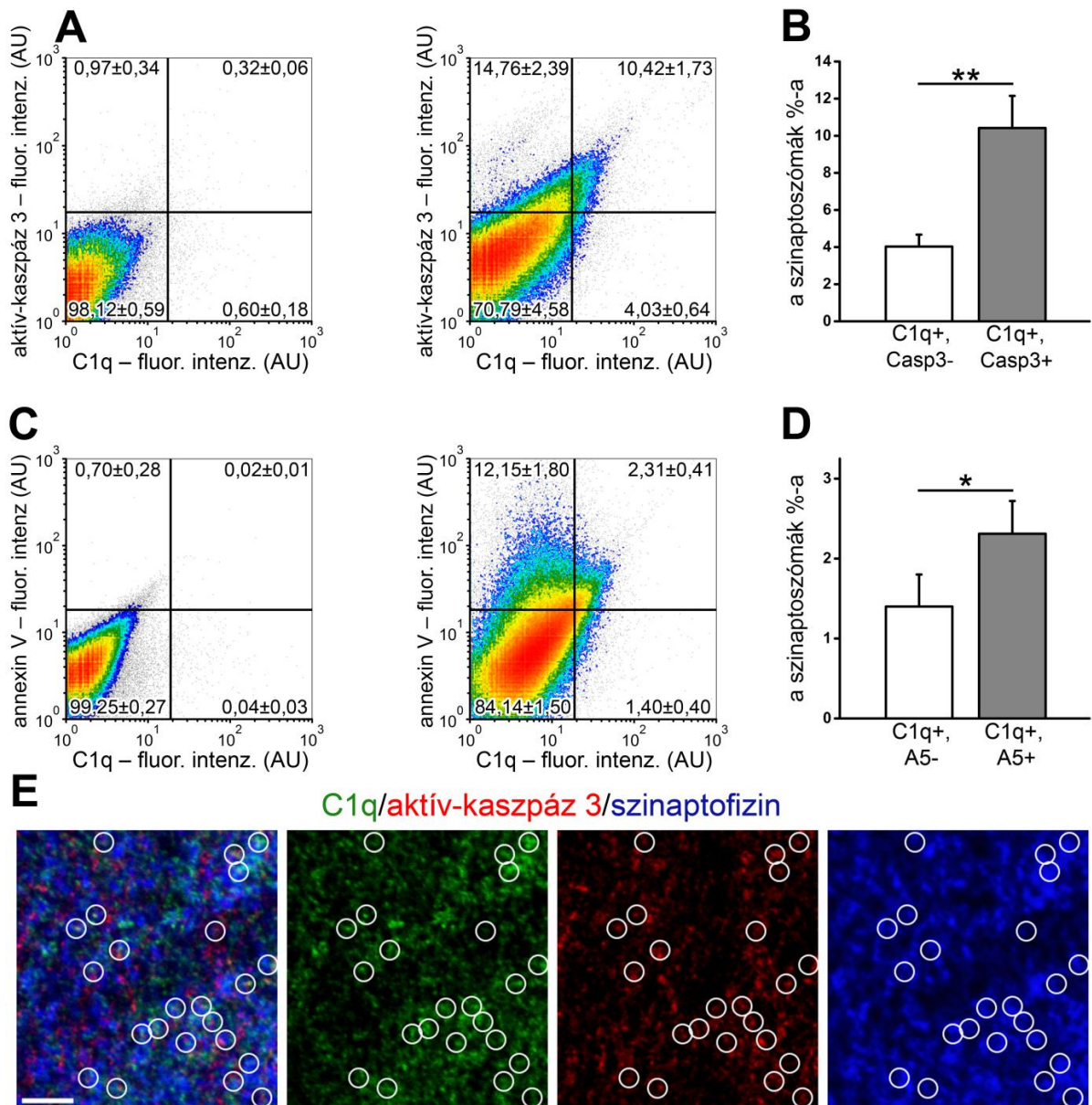
A KIR-ben eltávolítandó szinapszisok C1q-jellel való ellátása mögött álló mechanizmusok jobb megértése céljából elvégeztük a megváltozott mennyiségben kimutatott fehérjék további bioinformatikai analízisét a Pathway Studio szoftver segítségével. Az analízis magában foglalta a jelen proteomikai munkában leírt fehérjék közös célpontjainak és szabályozó elemeinek keresését is. A potenciális célpontok és szabályozó elemek között figyelembe vettük az adatbázisban szereplő összes kis molekulát, fehérjét, molekuláris komplexet és sejtes folyamatot. A potenciális közös célpontok között az első helyen kapott „szinaptikus plaszticitás” ( $p = 1,34 \times 10^{-11}$ ) után, másodikként az „apoptózis” folyamatát ( $p = 3,58 \times 10^{-9}$ ) találtuk (31. ábra). Ez alapján feltételezhető, hogy a C1q-jelölés azon szinapszisokat érinti, melyekben apoptotikus mechanizmusok indultak el. Ezt a feltételezést tovább erősítette, hogy a proteomikai vizsgálatban kapott fehérjék legvalószínűbb közös szabályozó faktorának a „Ca<sup>2+</sup>” adódott ( $p = 3,38 \times 10^{-12}$ ) (31. ábra), és ismert, hogy a lokális, dendritikus kalciumion-szint megemelkedése apoptotikus folyamatokat aktivál, és végsősoron a dendritek eltávolítását eredményezi (Kanamori és mtsai., 2013).



**31. ábra.** Az apoptotikus folyamatok szerepe a szinaptikus C1q-jelölésben. A bioinformatikai analízis eredményei alapján a „Ca<sup>2+</sup>” tekinthető a megváltozott fehérjék legvalószínűbb közös regulátorának, míg az „Apoptózis” a fehérjék második legvalószínűbb közös célpontjának a „Szinaptikus plaszticitás” után. A hálózatban az élek vastagsága arányos a vonatkozó hivatkozások számával.

A lokális apoptotikus mechanizmus szerepének kísérletes igazolásához áramlási citometriai és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. Áramlási citometriai kísérleteinkben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy vajon kimutatható-e a C1q-jelölt szinaptoszómákban apoptotikus markerek, így az aktivált-kaspáz 3 megjelenése, illetve az annexin V szinaptikus felszínhez kötése. A kaspáz 3, hasítódása és így aktiválódása után kulcsszerepet játszik az apoptózis végrehajtásában (Earnshaw és mtsai., 1999), míg az annexin V specifikusan hozzáköt a plazmamembrán extracelluláris oldalára transzlokálódott foszfatidilszerinhez, melynek kihelyeződése az apoptózis során megy végbe – így alkalmazása az apoptózis detekciójának egyik leggyakoribb metodikájának tekinthető (van Engeland és mtsai., 1998). Eredményeink alapján elmondható, hogy a C1q-jelölt szinaptoszómák statisztikailag szignifikánsan nagyobb mennyiségben tekinthetőek apoptotikusnak a nem jelöltekhez képest: a C1q- és aktív-kaspáz 3-dupla pozitív ( $p = 0,0054$ ) (32. ábra, A, B), valamint a C1q- és annexin V-dupla pozitív ( $p = 0,014$ ) (32. ábra,

C, D) szinaptoszómák száma egyaránt jelentős. Meg kell jegyeznünk továbbá, hogy a C1q- és annexin V-dupla pozitív szinaptoszómák száma, minden bizonnyal, alulbecsült. A feltételezés alapját az a már leírt kutatási eredmény képezi, mely szerint az annexin V fehérjén kívül, a C1q fehérje is képes az externalizálódott foszfatidilszerin kötésére, ugyanakkor az annexin V-nél kisebb affinitással (Païdassi és mtsai., 2008). Az immunjelölési procedúra során a szinaptoszóma preparátumhoz feleslegben hozzáadott annexin V így leszoríthatta a C1q fehérjét közös kötőpartnerükről, így lecsökkentve a C1q- és annexin V-dupla pozitív szinaptoszómák számát. Mindezzel összhangban áll, hogy amíg a csak C1q-jelölt szinaptoszómák  $15,60 \pm 1,24\%$ -át képezték a teljes szinaptoszóma populációnak, addig annexin V-hozzáadást követően ez az érték mindössze  $3,71 \pm 0,36\%$ -ra csökkent. Végül, tovább erősíti ezt az elképzelést, hogy a hozzáadott annexin V mennyiségének növekedése arányosan csökkentette a C1q-jelölt szinaptoszómák mennyiségét előkísérleteink során. Eredményeink tehát erősen feltételezik, hogy a C1q (egyik) kötőpartnere a szinapszisok felszínén az apoptotikus marker, foszfatidilszerin lehet. Az áramlási citometriai vizsgálati eredményeket megerősítettük egy alternatív metodikával is: immunhisztokémiai technikával kimutattuk, hogy a C1q-jelölt szinapszisok jelentős hányada kolokalizációt mutat egyben az aktív-kaspáz 3 fehérjével is (32. ábra, E). Összességében, bioinformatikai és kísérletes eredményeink egyaránt arra utalnak, hogy az eltávolítandó szinapszisok C1q-jelölése szoros összefüggésben áll a bennük inicializálódott apoptotikus folyamatokkal.



**32. ábra.** Az apoptotikus folyamatok és a szinaptikus C1q-jelölés kapcsolatának kísérletes vizsgálata. (A-D) Áramlási citometriai vizsgálataink alapján, a kapuzási kritériumok figyelembevételével (negatív kontroll minták: bal panel az A és C ábrán), a C1q-jelölt szinaptoszómák jelentős hányada pozitív az aktív-kaspáz 3 (*Casp3*) (jobb panel az A ábrán és B ábra), valamint az annexin V fehérjére (A5) is (jobb panel a C ábrán és D ábra), tehát apoptotikusnak tekinthető ( $n = 4-4$  független kísérlet). (E) C1q, aktív-kaspáz 3, szinaptofizin hármas immunjelöléssel kimutattuk a szinaptikus C1q fehérje kolokalizációját az aktív-kaspáz 3-mal (fehér körrel jelölve) a hippocampalis gyrus dentatus molekuláris rétegében. Mércse = 5  $\mu$ m. Átlag  $\pm$  középérték standard hibája felhasználva; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

### 5.3.5. A potenciális C1q-kötőpartner, neuronális pentraxin 1 vizsgálata

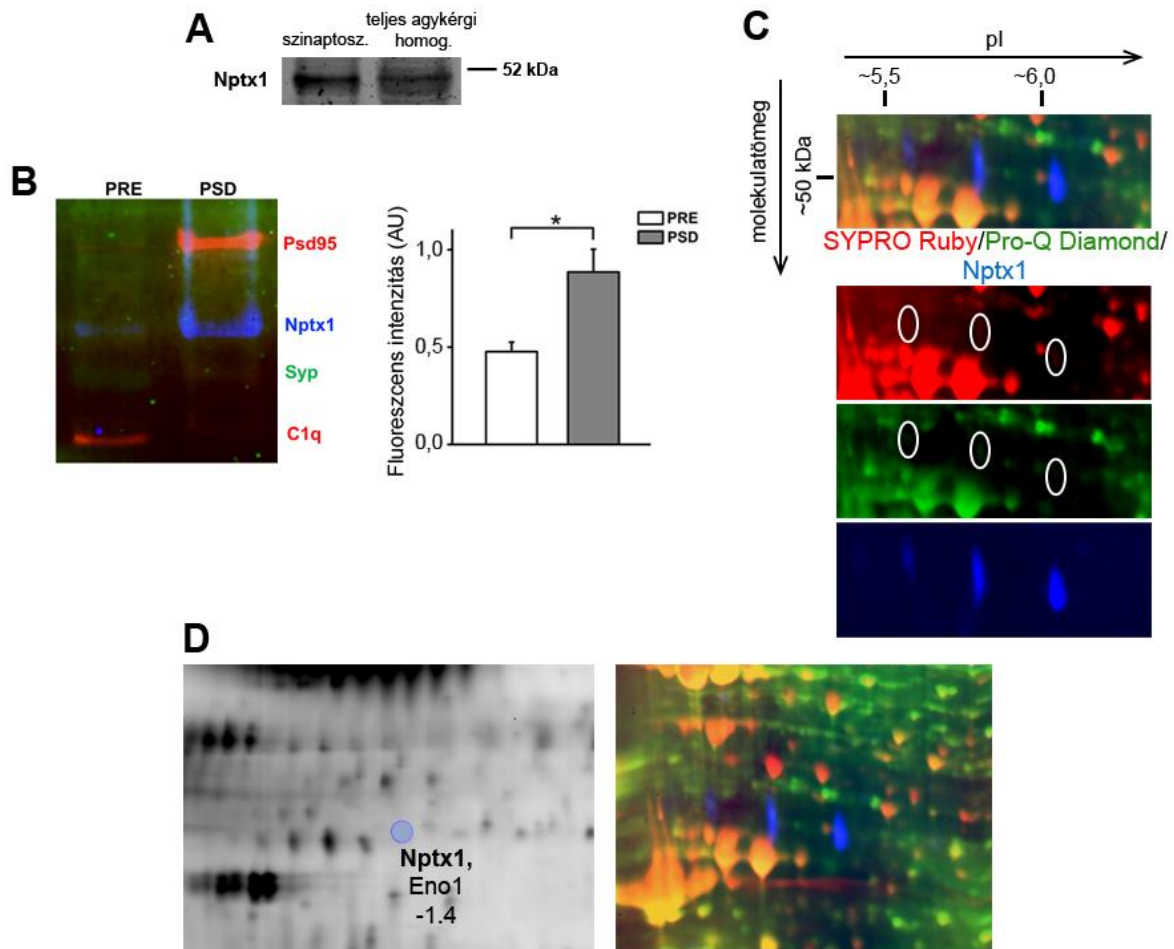
Proteomikai vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a C1q-jelölt szinaptoszómákban a nem jelöltektől eltérő mennyiségben van jelen a neuronális pentraxin 1 (Nptx1) fehérje (9. táblázat). Ez az eredmény külön kiemelendő, tekintve a szakirodalmi adatokat a komplementrendszer, és elsősorban a C1q fehérje, valamint a pentraxin fehérjecsalád kapcsolatának vonatkozásában. A periférián nagy mennyiségben termelődő, evolúciósan ősinek tekinthető pentraxin családba tartozó ún. „rövid” pentraxinok, a C-reaktív fehérje, és szérum amiloid-P komponens (Du Clos és Mold, 2011), valamint a „hosszú” pentraxin, pentraxin-3 (Baruah és mtsai., 2006) egyaránt képes a komplementrendszer, valamint a C1q fehérje szabályozására. A hosszú pentraxinok csoportjának tagjai a neuronális pentraxinok, melyek közé a neuronális pentraxin 1, 2 és a neuronális pentraxin receptor tartozik. A neuronális pentraxinok a KIR-ben jelenlévő, extracelluláris és bizonyos esetben intracelluláris lokalizációt is mutató fehérjék, melyek jelentősen befolyásolják a szinapszisok keletkezését/eltávolítását és a szinaptikus működést (O'Brien és mtsai., 2002; Xu és mtsai., 2003; Sia és mtsai., 2007; Figueiro-Silva és mtsai., 2015; Pelkey és mtsai., 2015). A neuronális pentraxinok feltételezhetően képesek a lokális, KIR-i komplementrendszer szabályozására, nem pusztán a pentraxinok családjának más tagjaival való rokonságukat figyelembevéve, hanem mert egyik tagjuk, az általunk a jelen munkában is kimutatott Nptx1, minden bizonnyal kölcsönható partnere a C1q fehérjének (Stevens és mtsai., 2007) – habár ez, a hivatkozott közleményben felvetett állítás, ez idáig nem került publikálásra.

Az Nptx1 fehérje jelenlétét először igazoltuk egér teljes nagyagykérgi szövethomogenizátumában, illetve specifikusan, a szinaptoszóma frakcióban is (33. ábra, A). Kimutattuk továbbá, hogy a C1q fehérjével ellentétben, az Nptx1 fehérje dominánsan a posztzinaptikus membránhoz kötött (33. ábra, B). Ez az eredmény összhangban áll azzal az ismert ténnyel, hogy az Nptx1 képes a serkentő szinapszisokban posztzinaptikus helyzetben lokalizált AMPA receptorokhoz kötni, ezzel stabilizálva azok helyzetét (Sia és mtsai., 2007).

Vizsgálatunkban az Nptx1 fehérje csökkenését mutattuk ki a C1q-jelölt szinaptoszómákban. Ez az eredmény látszólag ellentmondhat a komplementrendszer szabályozásában játszott feltételezett szerepének, illetve a C1q fehérjével való kölcsönhatásának. Meg kell ugyanakkor említeni, hogy az általunk is alkalmazott, gél-alapú proteomikai metodika által demonstrált fehérje mennyiségi különbség nem nyújt feltétlenül egyértelmű információt arról, hogy a fehérje expressziójában bekövetkezett-e változás. Egy fehérje spot-ban detektált fehérje változását ugyanis eredményezheti annak valamely



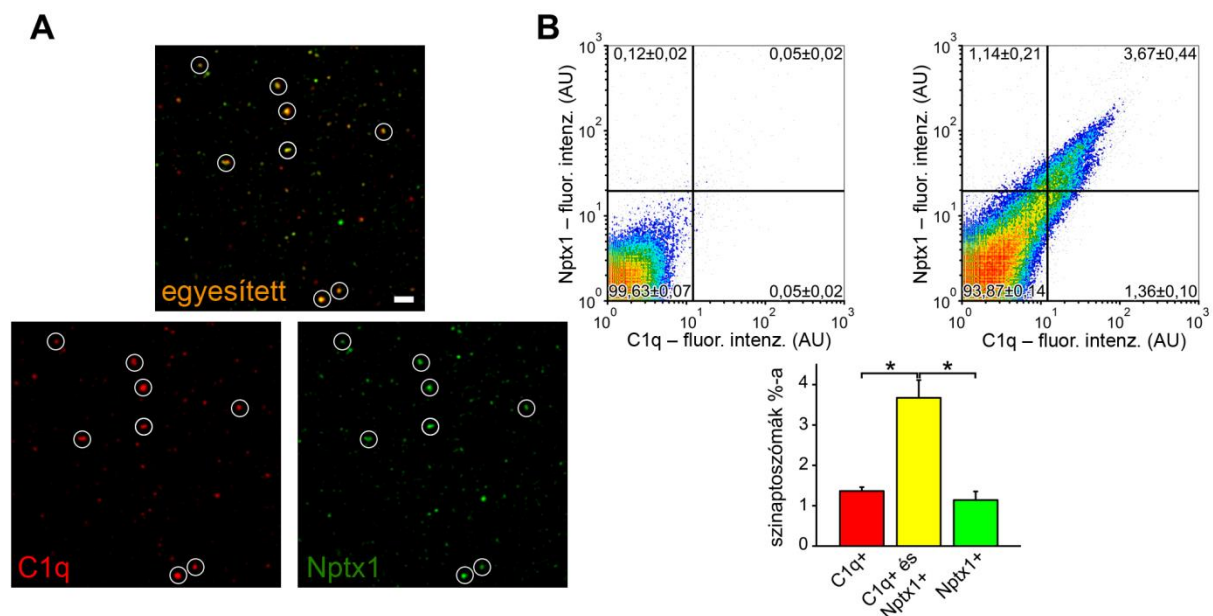
poszttranszlációsán módosult formájának abundanciájában megnyilvánuló eltérés is (Chevalier, 2010). Így, hipotézisünk szerint, az Nptx1 fehérje alacsonyabb szintje a C1q-jelölt szinaptoszómákban valószínűsíthetően annak egyik poszttranszlációsán módosult formájának csökkenésének következménye. Ezt a feltevést támogatja, hogy 2-D Western blot technikával sikerült kimutatnunk a szinaptoszóma preparátumban az Nptx1 több, poszttranszlációsán módosult formáját, melyek eredményeink alapján bizonyítottan különböző mértékben foszforilált állapotot jelentenek (33. ábra, C). Mindemelett erősen feltételezhető, hogy a foszforilált formák továbbá glikoziláción is átestek, tekintve, hogy nagyobb molekulatömegűek, mint a nem módosult Nptx1, és a fehérje glikozilációja már ismert (Hooper és mtsai., 2016). A proteomikai (30. ábra, A) és 2-D Western blot technikával kapott (33. ábra, C) eredmények összevetésével látható, hogy a C1q-jelölt szinaptoszómákban a nem foszforilált (és minden bizonnyal nem glikozilált) fehérje csökkenését mutattuk ki (33. ábra, D). A C1q-jelölt szinaptoszómákból kinyerhető alacsony fehérje mennyiség és az Nptx1 poszttranszlációsán módosult formáinak kis abundanciája miatt, ugyanakkor a poszttranszlációs változáson átesett Nptx1 nem volt a kellő számú (legalább 5 állathoz tartozó) gélen detektálható, így kvantifikálható a proteomikai vizsgálat során.



**33. ábra.** A neuronális pentraxin 1 (*Nptx1*) fehérje szinaptikus lokalizációja és poszttranszlációs formáinak kimutatása a szinaptikus preparátumban. (A) Az *Nptx1* fehérje kimutatása egér teljes nagyagykérgi és szinaptoszóma homogenizátumában. (B) A reprezentatív Western blot felvételen (lásd: 28. ábra) és az oszlopdigramon látható az *Nptx1* feldúsulása a PSD frakcióban, szemben a PRE preparátummal ( $n = 6-6$ ). (C) Az *Nptx1* foszforilált állapotának kimutatása a szinaptoszóma preparátum homogenizátumából készített 2-D Western blot segítségével. A poszttranszlációs módosult *Nptx1* fehérjék elsősorban izoelektromos pontjukban (pI), és kis mértékben molekulatömegük alapján térnek el egymástól. A SYPRO Ruby, teljes, és Pro-Q Diamond, foszforiláció-specifikus fehérje festékek, továbbá az *Nptx1* elleni antitest együttes használata kimutatta, hogy a *Nptx1*-spotok közül detektálható két, a savasabb pH-tartományba eső, foszforilált, és a nem foszforilált forma is. (D) Megállapítható, hogy a proteomikai vizsgálat során detektált *Nptx1* (bal oldali ábra), a 2-D Western blot felvétel alapján (jobb oldali ábra), a poszttranszlációs nem módosult fehérje. Az átlag  $\pm$  középérték standard hibája felhasználva; \*  $p < 0,05$ .

Annak további vizsgálatára, hogy a C1q és Nptx1 fehérjék egymás szabályozó, kölcsönható partnerei lehetnek, meghatároztuk szinaptikus kolokalizációjuk mértékét. Konfokális mikroszkópiával kapott eredményeink kimutatták a két fehérje együttes jelenlétét számos egyedi szinaptoszóma felszínén (34. ábra, A). Áramlási citometriai vizsgálataink alapján pedig megállapítható volt, hogy a két fehérje kolokalizációja statisztikailag szignifikánsan nagyobb mértékben jellemző az egyes szinaptoszómákon, mint a két fehérje egyedi jelenléte (34. ábra, B). A C1q és Nptx1 fehérjék, 28., illetve 33., B ábrán bemutatott, leginkább ellentétes oldali szinaptikus elhelyezkedése pedig, kolokalizációs vizsgálatainkkal együtt, arra utal, hogy a két fehérje feltételezhetően egy a szinapszis két oldalát áthidaló, ún. „transz-szinaptikus” kapcsolatot létesít egymással az eltávolítandó szinapszisokon.

Összegezve, feltételezhető, hogy a C1q és Nptx1 fehérjék egymás valós interakciós partnerei a szinaptikus felszínen, mely kapcsolat befolyásolhatja az eltávolítandó szinapszisok kijelölését. A proteomikai és 2-D Western blot vizsgálatok eredményeinek figyelembevételével együtt pedig megállapítható, hogy a foszforilált (és minden bizonnyal glikozilált) Nptx1 található a szinapszisok felszínén, tekintve, hogy a posztranszlációsan nem módosult, és valószínűsíthetően intracelluláris Nptx1 csökkent mennyiségben detektálható a C1q-jelölt szinaptoszómákban (30. ábra, A), míg a szinaptikus felszínen található Nptx1 jelentős kolokalizációt mutat a C1q fehérjével.



**34. ábra.** A C1q és Nptx1 fehérjék kolokalizációjának vizsgálata. (A) Konfokális mikroszkópos vizsgálat alapján a C1q és Nptx1 jelentős mértékű kolokalizációt mutat a szinaptoszómák felszínén (fehér körrel jelölve). (B) A kolokalizáció áramlási citometriai

technikával történő kvantifikálása. Szinaptoszómák áramlási citometriai felvétele a C1q- és Nptx1-immunjelölés mértékének ábrázolásával (*jobb felső ábra*), a negatív kontroll, csak másodlagos antitestekkel jelölt szinaptoszómák áramlási citometriai felvétele alapján (*bal felső ábra*) megállapított kapuzási kritérium figyelembevételével. A C1q- és Nptx1-dupla pozitív szinaptoszómák száma a csak az egyik vagy másik fehérjét tartalmazóknál szignifikánsan nagyobb (oszlopdiaagram, *alsó ábra*) ( $n = 4$  független kísérlet). Mércse = 10  $\mu\text{m}$ . Az átlag  $\pm$  középérték standard hibája felhasználva; \*  $p < 0,05$ .

## 6. Megbeszélés

### 6.1. A patológiás agyfejlődésért felelőssé tehető prenatális gyulladási reakció rövid és hosszú távú neuroproteomikai hatásainak értelmezése

A neuroimmunológiai folyamatok kölcsönhatásának kiemelkedően nagy jelentősége van a korai egyedfejlődés idején, melyet az is bizonyít, hogy számos KIR-t érintő megbetegedés kialakulásában ismert az immunrendszer aktivációjának jelentősége a korai ontogenezis során (Knuesel és mtsai., 2014). A fentiekben bemutatott kísérletsorozatunkban az elsősorban skizofrénia-, illetve ASD-szerű tüneteket széles spektrumban mutató, ún. anyai immunaktiváció rágeszélómodellt használtuk. A kísérletek elsődleges célkitűzése az LPS-indukált korai, magzati korban megmutatkozó és késői, adolescens kori KIR-i molekuláris változások feltérképezése volt nagy-áteresztőképességű, proteomikai technikák alkalmazásával.

Az akut LPS-kezelés a humán ontogenezis második trimeszterének megfelelő magzati fejlődés idejére esett, amely periódusban ismertén jelentős az anyai gyulladási reakció, mint rizikófaktor szerepe az utódban később megjelenő pszichiátriai kórképek kialakulásában (Mednick és mtsai., 1988; Wright és mtsai., 1995; Atladóttir és mtsai., 2010). A 13,5 napos gesztációs korban elvégzett LPS-kezelés időpontja egyben a patkány telencephalonját képező idegsejtek keletkezésének kezdetével mutat jelentős átfedést (ez igaz bizonyos neokortikális, limbikus és piriform agykérget felépítő neuron-populációkra egyaránt, Bayer és mtsai., 1993). Fontos megemlíteni, hogy az agykérgi struktúrák kialakításában központi szerepű Cajal-Retzius sejtek keletkezésének és proliferációjának ideje is a kísérletesen indukált gyulladási reakció idejére esik (Bayer és mtsai., 1993). Az abnormális nagyagykéreg kifejlődésében tehát a neuronális migráció irányításában fontos Cajal-Retzius sejtek is

szerepet játszhattak, amely sejtpopuláció régóta ismertén érintett számos KIR-i betegség (többek közt a skizofrénia) kialakulásában (Soriano és Del Río, 2005). Az anyai immunaktivációt előidéző beavatkozás sikerességét mutatta, hogy a 20 µg/testtömeg kg dózisban, i.p. beadott LPS gyors testhőmérséklet növekedést idézett elő az anyaállatokban, amely változás megegyezett egy korábbi munkánk során ugyanekkora dózisban beadott LPS hatására kapott eredményekkel (Kovács és mtsai., 2006).

A kezelés a teljes szöveti telencephalon szintjén is megmutatkozó proteomikai eltéréseket eredményezett 24 órával a beavatkozás után. A vizsgált szövetmintán kimutatható proteomikai változások jelentősége figyelemreméltó, hiszen a rendkívül változatos sejtes állományból felépülő magzati telencephalonban, nagyfokú heterogenitása folytán, az eredő fehérje mennyiségi különbségek könnyen „elmaszkolhatják” egymást. Tudomásunk szerint ez az első nagy-átersztőképességű vizsgálat, amely a fehérjék szintjén vizsgálja az anyai gyulladásos reakció magzati, fejlődő telencephalonra kifejtett hatását. A fehérjék funkcionális besorolása rámutatott a fehérje szintézisben, feltekeredésben és lebontásban érintett proteinek szembevető feldúsulására a megváltozott fehérjék közt. E megfigyelés a jelenleg detektáltnál még kiterjedtebb proteom-szintű módosulásokra utalhat, melyek valószínűsíthetően csak bizonyos sejtpopulációk analízise során válnának kimutathatóvá. Specifikusan a neuronális géntranszkripció általános áthangolására utal a heterogén nukleáris ribonukleoprotein H (Hnrnp1) megnövekedett mennyisége, amely csökkenti a neurogenézist az idegsejtek differenciációjában alapvető fontosságú ún. telomer ismétlődés-kötő faktor 2 fehérje (Trf2) expressziójának szabályozásán keresztül (Grammatikakis és mtsai., 2016). Érdekes módon, ez utóbbi fehérje egyik interakciós partnerét, a Terf2ip proteint szintén megváltozott mennyiségben detektáltuk. A Terf2ip fehérje pedig egyben az NFκB-jelátviteli útvonal egyik fontos eleme, amely nemcsak a kaszkád pozitív regulátora, de mennyisége egyben növekedést is mutat e jelátviteli útvonal aktiválódásakor (Teo és mtsai., 2010). Amennyiben az NFκB-jelátviteli útvonal valóban inicializálódik kísérleti modellünkben, úgy ez megmagyarázhatja a kiterjedt KIR-i fejlődési zavart, tekintve, hogy ez a molekuláris kaszkád, citokinek és kemokinek expressziójának szabályozásán keresztül alapvetően befolyásolhatja a fejlődő progenitor és idegsejtek extracelluláris környezetét (Zhang és Hu, 2012). Az embrionális KIR sejtpopulációinak migrációjában bekövetkező zavarokra utalhat több, kulcsfontosságú citoskeletális és nyúlványnövekedést befolyásoló fehérje megváltozott mennyisége, melyek közül kiemelendő a nagyagykéreg fejlődési zavarában bizonyítottan érintett cofilin-1 (Cfl1) fehérje emelkedett szintje (Bellenchi és mtsai., 2007).

Végül megemlítendő, hogy eredményeink feltételezik a fokozott oxidatív stressz jelenlétét az anyai immunaktivációt követően a magzati, fejlődő agyi kompartmentben is. Erre utal a gyulladási mediátor, Mif fehérje mennyiségi növekedése, amelynek szekréciója ismertén fokozódik e körülmények között (Gupta és mtsai., 2016), illetve egyben védekező funkciót lát el az oxidatív stressz indukcióját követően (Nguyen és mtsai., 2003). További bizonyítékot jelenthet az oxidatív stressz szerepére a Clic1 fehérje detektálása. Vizsgálatunkban a fehérje poszttranszlációs és nem expressziós változását mutattuk ki (nem változott a fehérje teljes mennyisége Western blot vizsgálatunk alapján), és ismert, hogy a Clic1, az oxidatív stressz érzékelőjeként, poszttranszlációs változáson megy át (Littler és mtsai., 2004). A Clic1 oxidatív stressz következtében bekövetkező módosulása és transzlokációja a plazmamembránba pedig hozzájárul a további reaktív oxigéngyökök képződéséhez és a gyulladási folyamat továbbgyűrűzéséhez (Milton és mtsai., 2008; Xu és mtsai., 2016). Az irodalmi adatok által nyújtott bizonyítékok alapján megalkotott hipotézisünk szerint a Clic1 fehérje közvetlenül hozzájárulhat az anyai és magzati, szisztémás gyulladási reakció lokális megjelenéséhez és felerősítéséhez a fejlődő KIR-ben. Az általunk kapott eredmények összhangban vannak korábbi tanulmányokban megfigyeltekkel, amelyekben közvetlen bizonyítékokat találtak a reaktív oxigéngyökök által indukált módosulásokra (pl. fokozott fehérje karboniláció) (Lanté és mtsai., 2007), illetve az oxidatív stressz reakcióval összefüggésbe hozott gének megemelkedett expresszióját írták le (Oskvig és mtsai., 2012) a fejlődő embrionális agyban, anyai LPS-kezelést követően.

Összességében, vizsgálatunk rámutatott, hogy az anyai immunaktiváció számos ponton képes beavatkozni a fejlődő telencephalon működésébe e kritikus ontogenetikus periódusban. A fent felsorolt molekuláris- és sejtes mechanizmusok pedig együtt hozzájárulhatnak a később megnyilvánuló pathológiás tünetek megjelenéséhez.

A beavatkozás hosszú távú hatásait 35 napos korú patkányokon vizsgáltuk. Ebben az életkorban már kimutathatók a kóros elváltozások az anyai immunaktiváció rágcslómodelljében (Meyer és mtsai., 2009a). A 35 napos kor megfeleltethető továbbá emberekben a fiatal felnőttkorral, mely életkorban sokszor már megjelennek a skizofrénia tünetei (Spear és mtsai., 2000). Kísérletünkben a skizofrénia és ASD betegségekben kiterjedten érintett nagyagykérget (Cheung és mtsai., 2010) vizsgáltuk. A teljes agyszövet komplexitása sokszor ellehetetlenítheti a kis mennyiségben detektálható, de funkcionálisan jelentős fehérjék mennyiségi változásának kimutatását, így kutatásunk során az ASD (Chen és mtsai., 2014) és skizofrénia (Seshadri és mtsai., 2013) pathomechanizmusában különösen jelentős szerepű, szinaptikus struktúrára fókuszáltunk. Munkánk során sikeresen

elválasztottuk a nagyagykéregből preparált szinaptoszóma frakción belül a pre-, illetve posztszinaptikus struktúrákat, és különböző, gél-alapú proteomikai technikák kombinálásával kiterjedt változásokat tártunk fel a prenatális immunaktiváción átesett állatokban. Érdekes módon, kiemelkedően több pre-, mint posztszinaptikus fehérje érintettségét mutattuk ki, amely ugyanakkor összhangban áll a preszinaptikus funkciózavar skizofréniában (Mirnic és mtsai., 2000; Siegert és mtsai., 2015) és az ASD-vel összefüggésben álló Fragilis X-szindrómában (Klemmer és mtsai., 2011; Broek és mtsai., 2016) korábban már hangsúlyozott szerepével.

A megváltozott mennyiségben kimutatott fehérjék listájának bioinformatikai analízise rávilágított, hogy a pre- és posztszinaptikus kompartmentre egyaránt jellemző a sejtvezetési rendszer, illetve a vezikulumok reciklizációját végző molekuláris gépezet érintettsége. A citoskeletális fehérje mennyiségi változások figyelemreméltó kiterjedtsége jól tükrözi a páciensekben, illetve a használt állatmodellben már korábban kimutatott, nagyagykérgi sejtes rétegekben (Boksa, 2010; Smith és mtsai., 2012), és dendritarborizációban (Penzes és mtsai., 2011; Weir és mtsai., 2015) megnyilvánuló eltéréseket. A vezikula reciklizációért felelős rendszer, illetve specifikusan a klatrin-mediált endocitózis hibás működése közvetlen összefüggésben állhat a skizofréniával (Schubert és mtsai., 2012). Az analízis kimutatta továbbá, hogy a preszinaptikus oldalt minden bizonnyal az energia háztartás zavara, illetve az oxidatív stressz állapota jellemzi, amely megfigyelés szintén kapcsolatba hozható korábbi kutatási eredményekkel (Chauhan és Chauhan, 2006; Yao és Keshavan, 2011). Az oxidatív stressz szerepének valószínűségét erősíti, hogy a preszinaptikus oldalon megváltozott mennyiségű fehérjék potenciális közös regulátorai közül a legvalószínűbb éppen a szuperoxid diszmutáz (Sod1) fehérje, bioinformatikai analízisünk alapján. Eredményeink a posztszinaptikus térben, ezen túlmenően rámutattak számos olyan jelátviteli útvonalra, amelyek potenciálisan közvetlen kapcsolatban állhatnak a szinaptikus funkciózavarral. Az általunk leírt, megváltozott mennyiségben kimutatható jelátviteli fehérjék, illetve az ASD és/vagy skizofrénia között korábban már összefüggést állapítottak meg a Camk2a (Yamasaki és mtsai., 2008), a növekedési faktor receptor-kötött fehérje 2 (Grb2) (Sun és mtsai., 2011), az 1-foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfát foszodiészteráz béta-1 (Plcb1) (Lo Vasco és mtsai., 2012), a vizinin-szerű fehérje 1 (Vsnl1) (Braunewell és mtsai., 2011) és a 14-3-3 fehérje epsilon (Ywhae) (Kido és mtsai., 2014) esetében. Különösen figyelemreméltó a Camk2a fehérje csökkent szintje a posztszinaptikus kompartmentben, mivel ez a jelátviteli fehérje központi szerepet játszik a szinaptikus plaszticitásban, többek közt neurotranszmitter receptorokkal és sejtvezetési komponensekkel interakcióban állva (Hell, 2014). Vizsgálataink

rámutattak, hogy a Camk2a csökkent expressziója a pszichiátriai betegségekben különösen érintett dlPFC régióban (Callicott és mtsai., 2000; Koenigs és Grafman, 2009) ugyan kimutatható, de nem úgy a somatosensoros rendszer első agykérgi állomásának megfelelő primer somatosensoros kéregben. Eredményünk alapján feltételezhető a patológiás állapotban leginkább érintett területeken a posztszinaptikus kompartment plaszticitásának zavara, amelyet a folyamat kulcsszereplőjének, a Camk2a fehérjének az egyértelműen csökkent expressziója jelez. Végezetül, a kapott fehérjék irodalmi adatokkal való összehasonlítása alapján elmondható, hogy jelentős mennyiségben detektáltunk szignifikáns változást mutató, korábban az ASD, és elsősorban a skizofrénia betegségekkel már összefüggésbe hozott fehérjéket. Eredményeink tehát tovább erősítik a használt állatmodell relevanciáját az ASD és skizofrénia kutatásában, és rámutattak a prenatális immunaktiváción átesett patkányok proteomjában leírható, a vártnál jóval kiterjedtebb pre- és posztszinaptikus változásokra.

## **6.2. A felnőttkori, perifériás gyulladási reakció által indukált fokozott epileptogenezisben szerepet játszó neuroproteomikai változások értelmezése**

Laboratóriumunk által korábban publikált eredmények alapján elmondható, hogy a perifériásan indukált gyulladási reakció jelentősen emeli az SWD-genezist az abszensz epilepsziás rohamok kialakulását fokozottan mutató, WAG/Rij patkánytörzsben (Kovács és mtsai., 2006; Györfly és mtsai., 2014). Az akut gyulladási reakció által kiváltott, KIR-i molekuláris változások vizsgálatát 12 órával az LPS-kezelést követően végeztük. Feltételezésünk szerint ebben az időpontban már a proteom szintjén is megnyilvánulhattak és technikai eljárásunkkal detektálhatóvá válhattak a gyulladási reakció következményei, ugyanakkor a hatás befejeztével feltételezhetően bekövetkező fehérje degradáció még nem ment kiterjedten végbe (habár az SWD-genezis viszonylag hamar, 24 órával a kezelést követően lecsökken, sőt visszaáll a kontroll periódusnál is alacsonyabb szintre; Györfly és mtsai., 2014). A kísérlet során a fronto-parietalis agykérget és thalamust vizsgáltuk, melyek reciprok kapcsolatrendszere a rohamok inicializálásában és fenntartásában egyaránt kulcsfontosságú (Avoli, 2012). A két agyterület közül kiterjedtebb változást mutattunk ki a thalamusban, mint a fronto-parietalis agykéregben a proteom szintjén. Mindez arra utalhat, hogy a thalamus az agykérgi területnél jelentősebb funkcionális zavart szenved a perifériás gyulladás hatására. Habár a mintagyűjtés időpontjának egyezése, továbbá a proteom változásának időbeli monitorozásának hiánya miatt nem állapítható meg, hogy a kettő közül



elsődlegesen melyik agyterület felelős a rohamok kialakulásáért, viszont erősen feltételezhető, hogy a thalamus az a struktúra, ahol a molekuláris átrendeződés nagyobb mértékben ment végbe.

A kapott fehérjék funkcionális klaszterezése után világossá vált, hogy a legszembetűnőbb eltérés a citoszkeletális fehérjék mennyiségében érhető tetten a thalamusban. Habár a sejtvezetési rendszer nagyfokú érintettsége összhangban áll korábbi megfigyelésekkel, melyekben kimutatták számos mikrotubuláris, intermedier, és aktin filamentum-alkotó fehérje direkt és indirekt kapcsolatát az epilepszia pathogenezisével (Gardiner és Marc, 2010), e rendszer jelenleg kimutatott változása a thalamusban a vártnál is kiterjedtebb – különösen az agykérgi proteom módosulásaival összehasonlítva. A rohamok által indukált dendritikus sejtvezetési destabilizáció ismert jelenség (Wong, 2008), melynek felismerése egyben terápiás célpontokat is szolgáltatott a rohamokkal összefüggésben bekövetkező, KIR-i, degeneratív folyamatok gátlása érdekében (pl. a calcineurin esetében (Zeng és mtsai., 2007)). Eredményeink összességében rámutattak e folyamat relevanciájára a thalamusban is a gyulladás által kiváltott abszensz roham-fokozódás során.

Proteomikai vizsgálatunk eredményeinek szakirodalmi adatokkal való összehasonlítása rámutatott, hogy a kapott fehérjék jelentős hányada már ismert kapcsolatban áll a gyulladással, epilepsziával, továbbá az alvás-ébrenléti ciklussal. Ez az eredmény molekuláris szinten is alátámasztja, hogy a gyulladási reakció összefüggésben van az abszensz epilepsziás rohamok kialakulásával, az alvás-ébrenléti ciklus módosításával egy időben. E megfigyelés feltételezi, hogy a gyulladást kiváltó ágensek szomnogén mediátorokon (elsősorban pro-inflammatorikus citokineken) keresztül, az alvás-ébrenléti ciklus változásában is megnyilvánuló módon, áthangolják a thalamo-kortikális aktivitást, mely elvezet az SWD-tevékenység emelkedéséhez fokozott fogékonyság esetén – ahogyan a genetikailag hajlamos, WAG/Rij patkányok vizsgálata során láthatóvá vált.

Az eredmények analízise során kíváncsiak voltunk arra, hogy a kapott fehérjék részét képezik e valamely jól definiálható molekuláris hálózatnak. A bioinformatikai elemzés kimutatta, hogy az LPS elsődleges receptora, a TLR4 által indukált NF $\kappa$ B-útvonal szoros kapcsolatban van a megváltozott fehérjékészlet tagjaival, a korábbi szakirodalmi adatok alapján. Ismert, hogy ez az útvonal nemcsak aktiválódik az epilepsziás rohamok alatt (Rong és Baudry, 1996), hanem egyben befolyásolja is a rohamok kialakulásához szükséges „küszöböt” (Lubin és mtsai., 2007). Eredményünk, miszerint az NF $\kappa$ B-szignalizáció aktiválására képes LPS fokozza az abszensz rohamok kialakulását, továbbá, ez az útvonal szerepet játszik számos megváltozott mennyiségű fehérje szabályozásában, feltételezi, hogy a

fenti jelátviteli kaszkád inicializációja nemcsak a rohamok következménye, hanem egyben oki tényezőként is szerepel az abszensz epilepszia kialakulásában.

### **6.3. A komplementrendszer által közvetített szinapszis-vesztés háttérében álló szinaptikus proteom-változások értelmezése**

A szinaptikus kapcsolatok kialakítása és megszűnése dinamikus folyamat, amelynek egyedülálló jelentősége van a KIR plaszticitásának biztosításában, és amelyet alapvetően befolyásolnak a szinapszisokat körülvevő makrofágok, a mikroglia sejtek (Schafer és mtsai., 2013). A klasszikusan az immunrendszer elemének tekintett komplementrendszer szinaptikus kapcsolatok eltávolításában játszott szerepének felfedezése óta (Stevens és mtsai., 2007) eltelt egy évtizedben pedig egyre fokozódó érdeklődés mutatkozott a komplement-mediált, mikroglia sejtek által elvégzett, szelektív szinapszis-fagocitózis jelensége iránt. A jelenleg bemutatásra kerülő munkánkban a C1q-jelölt szinapszisok molekuláris karakterizálását és a szelektív szinaptikus C1q-jelölés háttérében álló mechanizmusokat vizsgáltuk felnőtt egerek nagyagykérgében, fiziológiás körülmények között.

Elsőként, kimutattuk, hogy a szinaptikus szubcelluláris frakcióban jelenlévő C1q fehérje elsősorban preszinaptikus helyzetű. Feltételezhető tehát, hogy a C1q fehérje által felismert, a szinaptikus felszínen bizonyos körülmények között megjelenő, C1q-kötő molekulák elsősorban preszinaptikusan lokalizáltak. Mindez továbbá arra is utalhat, hogy az eltávolítandó szinapszisok esetleges funkciózavara közvetlenül a pre-, és nem a posztzinaptikus oldalhoz kapcsolt. Eredményünk összhangban áll a megfigyeléssel, mely szerint a mikroglia sejtekben elsősorban a fagocitált preszinaptikus specializáció figyelhető meg a fejlődő vizuális rendszer neuronális aktivitás- és komplement-függő átalakulása során (Schafer és mtsai., 2012).

Az eltávolítandó, C1q-jelölt szinapszisokat jellemző molekuláris változások kimutatásához elvégeztük a FACS technikával különválasztott, C1q-jelölt és nem jelölt szinaptoszómák proteomikai analízisét. Munkánk során a szinaptoszómák szortolását optimalizáltuk, és egy olyan, a korábban publikált protokolloktól részben eltérő eljárást javasoltunk, mely lehetővé teszi egy gyorsan előállítható, így életképes, ugyanakkor nagyfokú tisztaságot mutató szinaptoszóma frakció immunjelölését, majd az egyes szinaptoszómák multiparaméteres analízisét, és szortolását. A két szinaptoszóma populáció proteomikai összehasonlítása számos sejtes funkcióban megnyilvánuló különbségre

rámutatott. Érdekes módon, a fehérjék mennyiségi változásának iránya és a funkcionális klaszterezésük feltételezi a szinaptikus transzmisszió csökkenését az energia háztartásban érintett fehérjék mennyiségi növekedése mellett. Adataink specifikusan a szinaptikus vezikulumok reciklizációjának zavarára is utalnak, tekintve, hogy három, a folyamatban kiemelten érintett fehérjét is kimutattunk (komplexin-1 (Cplx1), béta-szinuklein (Sncb) és szinapszin-2 (Syn)) a változó proteinek között. A szinaptikus kommunikáció hatékonyságának zavarát feltételező hipotézist alátámasztja, hogy a kevésbé aktív szinaptikus kapcsolatokat jelentősen nagyobb valószínűséggel távolítják el a mikroglia sejtek a hatékonyabb szinapszisoknál (Schafer és mtsai., 2012). Kimutattunk több jelátviteli fehérjét is, melyek közül a foszfatidilinozitol transzfer fehérje alfa izoforma (Pitpna) a foszfolipáz-C útvonalon keresztül érintett az idegsejt nyúlványok növekedésében (Xie és mtsai., 2005), míg a kalcineurin B alegység 1-es típus (Ppp3r1) a szinaptikus plaszticitást számos ponton befolyásoló fehérje (Baumgärtel és Mansuy, 2012).

A proteomikai eredmények együttes, bioinformatikai elemzése rámutatott az apoptózis folyamatának jelentőségére a C1q-jelölt szinapszisokban. A szinaptikus kompartmentben detektálható apoptotikus folyamatok és a C1q-jelölés közötti kapcsolatot pedig kísérletes úton is igazoltuk. A szinaptikusan lokalizált, úgynevezett limitált apoptózis jelenségét korábban már leírták (Mattson és mtsai., 1998; Williams és mtsai., 2006b; Ertürk és mtsai., 2014), de eddig még nem mutatták ki ennek összefüggését a szinaptikus C1q-jelöléssel. A szinaptikus kompartmentben inicializálódó apoptotikus mechanizmusok jelentőségét mutatja, hogy szerepüket hangsúlyozzák például az Alzheimer-kór (Mattson és mtsai., 2001) és skizofrénia (Glantz és mtsai., 2006) esetében is. Specifikusan a lokális kaszpáz-3 aktiválódás és szinaptikus funkciózavar között pedig ok-okozati összefüggést írtak le (D'Amelio és mtsai., 2011). A C1q fehérje ismerten szerepet játszik az apoptotikussá váló sejtek felismerésében a periférián (Navratil és mtsai., 2001; Nauta és mtsai., 2002; Fox és mtsai., 2015), továbbá neuronális sejtenyészetek esetében is (Fraser és mtsai., 2010). Ugyanakkor vizsgálatunk kimutatta, hogy a lokális, szinaptikus apoptotikus folyamatok a KIR-ben képesek kiváltani a C1q-kötődést. Feltételezésünk szerint a szinaptikus funkciózavar következményeként kialakuló lokális apoptotikus kaszkád inicializációja olyan, eddig szisztematikusan nem vizsgált kötőpartner, illetve kötőpartnerek megjelenését váltja ki, melyekhez a C1q fehérje kapcsolódva előidézi e szinapszisok lokális, mikroglialis fagocitózisát.

A C1q-kötőpartnerek egyike lehet a proteomikai vizsgálatunkban is kimutatott Nptx1, tekintve, hogy a pentraxin fehérjecsalád más tagjai esetében publikálásra került direkt

interakciójuk a C1q fehérjével (és ennek szerepe a komplement-aktivációban) (Nauta és mtsai., 2003; Du Clos és Mold, 2011). Kísérletes vizsgálataink során, különböző metodikai eljárásokkal igazoltuk az Nptx1 és C1q fehérje kolokalizációját, amely valószínűsíti a két fehérje feltételezett interakcióját a KIR-ben, a szinapszisok felszínén. A C1q-jelölt szinapszoszómák proteomikai analízise, majd az Nptx1 poszttranszlációs állapotának vizsgálata pedig rámutatott, hogy az Nptx1 foszforilált és minden bizonnyal glikozilált formában lehet képes a szinaptikus felszínen a C1q kötésére. Az Nptx1 expressziója alacsony neuronális aktivitás esetén indukálódik és a fehérje pro-apoptotikus szereppel bír (DeGregorio-Rocasolano és mtsai., 2001). Továbbá ismert, hogy az apoptózis inicializációja kiváltja e fehérje szekrécióját (Thatipamula és Hossain, 2014). Eredményeink összhangban állnak az Nptx1 korábban leírt funkcióival, és feltételezik, hogy az apoptotikussá váló szinaptikus kompartmentben aktiválódó, majd poszttranszlációsán módosult Nptx1 a szinaptikus felszínen a C1q fehérje „célpontjaként” játszhat szerepet az apoptotikus szinapszisok szelektív kijelölésében, majd eltávolításában.

Hipotézisünk szerint a C1q-mediált szinapszis-eltávolítás mechanizmusa segíthet a funkciózavart szenvedő, apoptotikus szinaptikus kapcsolatok lokális eliminációjában, mielőtt kiterjedt szinapszis- és neuronvesztés indukálódhatna, amely összhangban állhat a C1q feltételezett neuroprotektív hatásával (Fraser és mtsai., 2010). Mindemellett, a fokozott szinapszis-vesztéssel járó neurodegeneratív betegségek, így az Alzheimer-kór esetében is szintén kulcsszerepet játszik a komplement-mediált, mikroglialis szinapszis-fagocitózis a betegség kialakulásában (Hong és mtsai., 2016). A fiziológiás és pathológiás komplement-mediált szinapszis-vesztés közti különbség megértése tehát kiemelt jelentőségű lehet a jövőben.

## Összefoglalás

Az ideg- és immunrendszer, látszólagos elszigeteltségük ellenére, szoros funkcionális kapcsolatban van egymással, amely kétirányú interakció jelentőségére egyre több fiziológias és pathológias folyamat során derül fény. A dolgozatban három ilyen, a központi idegrendszer (KIR) működését befolyásoló neuroimmunológiai kölcsönhatás vizsgálatával kapott eredményeket mutattuk be. E folyamatok molekuláris mechanizmusainak jobb megismerése érdekében vizsgálataink alapját nagy-áteresztőképességű, proteomikai technikai megközelítés képezte. Első vizsgálatsorozatunkban, a pszichiátriai betegségek kialakulásával összefüggésbe hozott, prenatális immunaktiváció rövid és hosszú távú neuroproteomikai hatásait írtuk le. Az eredményeink alapján elmondható, hogy e korai stresszor képes a magzati telencephalonban is pro-inflammatorikus és oxidatív stresszel jellemezhető környezetet teremteni. Kimutattuk, hogy mindez molekuláris szinten is hosszú távú következményekkel jár, elsősorban a preszinaptikus kompartment érintettségével. A detektált fehérjék közt számos, korábban már a skizofréniával és autizmussal összefüggésbe hozott proteint kimutattunk, és leírtuk a Camk2a fehérje csökkent expresszióját a pszichiátriai betegségekkel szoros kapcsolatban álló dorsolateralis prefrontalis agykéregben. Ezt követő vizsgálatainkban a felnőttkori, perifériásan indukált gyulladásos reakció epileptogenezist fokozó hatásának molekuláris hátterére fókuszáltunk. Kimutattuk, hogy az abszensz epilepsziás rohamok kialakulásában kulcsfontosságú thalamus és fronto-parietalis agykéreg közül az előbbi érintett kiterjedtebben, és különösen domináns a sejtvezetési rendszer módosulása. A kapott fehérjék kiemelkedően magas hányada kapcsolatba hozható a gyulladásos folyamatokkal (és különösen az NF $\kappa$ B-útvonallal), epilepsziával és az alvás-ébrenléti ciklussal, szakirodalmi adatok alapján, amely így molekuláris szintű bizonyítékot is jelent e három mechanizmus szinergikus kapcsolatára a betegségben. Végül, utolsó témakörünket a szinapszisok mikroglia sejtek általi, komplementrendszer-mediált eltávolításának hátterében álló folyamatok vizsgálata jelentette. Kimutattuk, hogy az eltávolítandó szinapszisokat kijelölő C1q molekula elsősorban preszinaptikus helyzetű, és kidolgoztuk a C1q-jelölt szinaptoszómák szelektív szortálásának technikáját. Proteomikai és további kísérletes eredményeink rámutattak a lokális, szinaptikus apoptotikus folyamatok szerepére a szinaptikus C1q-jelölésben, továbbá karakterizáltuk az ebben potenciálisan érintett Nptx1 szinaptikus lokalizációját és posztranszlációs módosulásait. Összességében, eredményeink hangsúlyozzák a neuroimmunológiai kommunikáció szerepét a KIR-i működésben és további adatokat szolgáltatnak e kölcsönhatások hátterében álló molekuláris mechanizmusokról.

## Summary

Despite their apparent isolation, the nervous and immune system are in a tight functional connection with each other, and the significance of this bidirectional interaction is uncovered in the case of an ever-growing number of known physiological and pathological processes. In the dissertation, we presented the results obtained from the investigation of three of these neuroimmune interactions influencing the functions of the central nervous system (CNS). To gain a better understanding on the molecular mechanisms of these processes, the high-throughput, proteomic technical approach formed the basis for our investigations. In our first study, we described the short- and long-term neuroproteomic effects of the prenatal immune activation linked to the development of psychiatric disorders. According to our results, this early stressor is able to induce a pro-inflammatory environment characterized by oxidative stress in the fetal telencephalon. We demonstrated that this leads to long-term consequences at the molecular level, primarily in the presynaptic compartment. Among the detected proteins, we identified numerous ones which were previously already associated with schizophrenia and autism, moreover, we revealed the reduced expression of Camk2a in the dorsolateral prefrontal cortex tightly connected with psychiatric disorders. In the next series of experiments, we focused on the molecular background lying behind the epileptogenic effects of the peripherally induced inflammatory reaction in adulthood. We uncovered that among the thalamus and fronto-parietal cortex, two brain structures playing key role in the genesis of absence seizures, the former is affected primarily, and the modification of the cytoskeleton is prominent. The outstanding portion of the identified proteins is linked to inflammatory processes (and especially to the NF $\kappa$ B-pathway), epilepsy and sleep-wake cycle, according to the literature, therefore, providing evidences at the molecular level on the synergic connection between these three mechanisms. Finally, our last topic was the investigation of the background mechanisms of the complement-mediated microglial elimination of synapses. We unveiled that the C1q protein, responsible for the tagging of the eliminable synapses is mainly presynaptically localized, and we elaborated the method for the selective sorting of C1q-tagged synaptosomes. Our proteomic and further experimental results pointed out the role of local, synaptic apoptotic processes in synaptic C1q-tagging, moreover, we characterized the synaptic localization and posttranslational modifications of Nptx1 which protein is presumably involved in this process. In sum, our results emphasize the role of neuroimmune communication in CNS functions and provide further details on the molecular mechanisms lying in the background of these interactions.

## Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Kékesi Adrienna Katalinnak és Dr. Juhász Gábornak, hogy szakdolgozóként és doktoranduszként a Proteomikai Laboratóriumban dolgozhattam, szakmai és személyes támogatásukra mindig számíthattam.

Köszönöm Dr. Kardos Józsefnek, hogy doktoranduszi éveim után az MTA-ELTE NAP B Neuroimmunológiai Kutatócsoportban dolgozhattam.

Köszönettel tartozom Dr. Erdei Annának, Dr. Sass Miklósnak és Dr. Juhász Gábornak, hogy doktoranduszként tanulmányaimat az ELTE TTK, Biológia Doktori Iskola, Molekuláris, sejt- és neurobiológia doktori programjában végezhettem.

Köszönöm a Proteomikai Laboratórium, illetve az ELTE, TTK, Biokémiai Tanszéken működő MTA-ELTE NAP B Neuroimmunológiai Kutatócsoport minden korábbi és jelenlegi munkatársának a munka elkészüléséhez nyújtott, nélkülözhetetlen segítségüket. Köszönöm továbbá Dr. Borhegyi Zsoltnak és Dr. Matkó Jánosnak szakmai tanácsaikát, segítségüket.

Köszönöm családomnak, páromnak, Kirchner Kittinek és barátaimnak, hogy mindvégig támogattak.

## Hivatkozásjegyzék

Abramoff MD, Magalhaes PJ és mtsai. (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 11(7):36-42.

Ackerman KD, Felten SY és mtsai. (1989) Parallel development of noradrenergic innervation and cellular compartmentation in the rat spleen. *Exp Neurol*. 103(3):239-55.

Afagh A, Cummings BJ és mtsai. (1996) Localization and cell association of C1q in Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol*. 138(1):22-32.

Annegers JF, Hauser WA és mtsai. (1988) The risk of unprovoked seizures after encephalitis and meningitis. *Neurology* 38(9):1407-10.

Arnold GJ, Fröhlich T. (2012) 2D DIGE saturation labeling for minute sample amounts. *Methods Mol Biol*. 854:89-112.

Aronica E, Boer K és mtsai. (2007) Complement activation in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*. 26(3):497-511.

Aronsson F, Lannebo C és mtsai. (2002) Persistence of viral RNA in the brain of offspring to mice infected with influenza A/WSN/33 virus during pregnancy. *J Neurovirol*. 8(4):353-7.

Aronsson M, Fuxe K és mtsai. (1988) Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(23):9331-5.

- Ashdown H, Dumont Y és mtsai. (2006) The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 11(1):47-55.
- Atladóttir HO, Thorsen P és mtsai. (2010) Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*. 40(12):1423-30.
- Avoli M. (2012) A brief history on the oscillating roles of thalamus and cortex in absence seizures. *Epilepsia*. 53(5):779-89.
- Azab SF, Abdalhady MA és mtsai. (2016) Interleukin-6 gene polymorphisms in Egyptian children with febrile seizures: a case-control study. *Ital J Pediatr*. 42:31.
- Babri S, Doosti MH és mtsai. (2014) Strain-dependent effects of prenatal maternal immune activation on anxiety- and depression-like behaviors in offspring. *Brain Behav Immun*. 37:164-76.
- Bajor M, Michaluk P és mtsai. (2012) Synaptic cell adhesion molecule-2 and collapsin response mediator protein-2 are novel members of the matrix metalloproteinase-9 degradome. *J Neurochem*. 122(4):775-88.
- Banks WA. (2005) Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. *Curr Pharm Des*. 11(8):973-84.
- Baran H, Vass K és mtsai. (1994) The cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitor BW755C protects rats against kainic acid-induced seizures and neurotoxicity. *Brain Res*. 646(2):201-6.
- Barnes PJ. (1998) Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 94(6):557-72.
- Barnum SR. (1995) Complement biosynthesis in the central nervous system. *Crit Rev Oral Biol Med*. 6(2):132-46.
- Barr CE, Mednick SA és mtsai. (1990) Exposure to influenza epidemics during gestation and adult schizophrenia. A 40-year study. *Arch Gen Psychiatry*. 47(9):869-74.
- Bartfai T, Schultzberg M. (1993) Cytokines in neuronal cell types. *Neurochem Int*. 22(5):435-44.
- Baruah P, Dumitriu IE és mtsai. (2006) The tissue pentraxin PTX3 limits C1q-mediated complement activation and phagocytosis of apoptotic cells by dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 80(1):87-95.
- Başaran N, Hincal F és mtsai. (1994) Humoral and cellular immune parameters in untreated and phenytoin-or carbamazepine-treated epileptic patients. *Int J Immunopharmacol*. 16(12):1071-7.
- Başaran N, Kansu E és mtsai. (1989) Serum immunoglobulins, complement levels and lymphocyte subpopulations in phenytoin-treated epileptic patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 11(2-3):335-46.
- Bauman MD, Iosif AM és mtsai. (2014) Activation of the maternal immune system during pregnancy alters behavioral development of rhesus monkey offspring. *Biol Psychiatry*. 75(4):332-41.
- Baumgärtel K, Mansuy IM. (2012) Neural functions of calcineurin in synaptic plasticity and memory. *Learn Mem*. 19(9):375-84.
- Bayer SA, Altman J és mtsai. (1993) Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology*. 14(1):83-144.
- Bechmann I, Galea I és mtsai. (2007) What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol*. 28(1):5-11.



- Bellenchi GC, Gurniak CB és mtsai. (2007) N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex. *Genes Dev.* 21(18):2347-57.
- Bellinger DL, Felten SY és mtsai. (1989) Origin of noradrenergic innervation of the spleen in rats. *Brain Behav Immun.* 3(4):291-311.
- Berg AT, Berkovic SF és mtsai. (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia.* 51(4):676-85.
- Besedovsky HO, del Rey A. (2000) The cytokine-HPA axis feed-back circuit. *Z Rheumatol.* 59 Suppl 2:II/26-30.
- Bialas AR, Stevens B. (2013) TGF- $\beta$  signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nat Neurosci.* 16(12):1773-82.
- Bien CG, Urbach H és mtsai. (2007) Limbic encephalitis as a precipitating event in adult-onset temporal lobe epilepsy. *Neurology.* 69(12):1236-44.
- Biesemann C, Grønborg M és mtsai. (2014) Proteomic screening of glutamatergic mouse brain synaptosomes isolated by fluorescence activated sorting. *EMBO J.* 33(2):157-70.
- Boksa P. (2010) Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun.* 24(6):881-97.
- Bonizzi G, Karin M. (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25(6):280-8.
- Borovikova LV, Ivanova S és mtsai. (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* 405(6785):458-62.
- Bouffard G. (1906) Injection des couleurs de benzidine aux animaux normaux. *Ann. d. l'Inst. Pasteur.* Paris, 20:539-548.
- Boulanger LM. (2009) Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron.* 64(1):93-109.
- Boumpas DT, Chrousos GP és mtsai. (1993) Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med.* 119(12):1198-208.
- Braff DL, Freedman R és mtsai. (2007) Deconstructing schizophrenia: an overview of the use of endophenotypes in order to understand a complex disorder. *Schizophr Bull.* 33(1):21-32.
- Braunewell KH, Dwary AD és mtsai. (2011) Association of VSNL1 with schizophrenia, frontal cortical function, and biological significance for its gene product as a modulator of cAMP levels and neuronal morphology. *Transl Psychiatry.* 1:e22.
- Broek JA, Lin Z és mtsai. (2016) Synaptic vesicle dynamic changes in a model of fragile X. *Mol Autism.* 7:17.
- Brown AS, Begg MD és mtsai. (2004a) Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 61(8):774-80.
- Brown AS, Derkits EJ. (2010) Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *Am J Psychiatry.* 167(3):261-80.

- Brown AS, Hooton J és mtsai. (2004b) Elevated maternal interleukin-8 levels and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am J Psychiatry*. 161(5):889-95.
- Brown AS, Schaefer CA és mtsai. (2005) Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am J Psychiatry*. 162(4):767-73.
- Brown AS, Sourander A és mtsai. (2014) Hinkka-Yli-Salomäki S, McKeague IW, Sundvall J, Surcel HM. Elevated maternal C-reactive protein and autism in a national birth cohort. *Mol Psychiatry*. 19(2):259-64.
- Brown AS. (2011) The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog Neurobiol*. 93(1):23-58.
- Buka SL, Tsuang MT és mtsai. (2001a) Maternal infections and subsequent psychosis among offspring. *Arch Gen Psychiatry*. 58(11):1032-7.
- Buka SL, Tsuang MT és mtsai. (2001b) Maternal cytokine levels during pregnancy and adult psychosis. *Brain Behav Immun*. 15(4):411-20.
- Buzsáki G. (1991) The thalamic clock: emergent network properties. *Neuroscience*. 41(2-3):351-64.
- Caesar M, Felk S és mtsai. (2015) Changes in actin dynamics and F-actin structure both in synaptoneurosome of LRRK2(R1441G) mutant mice and in primary human fibroblasts of LRRK2(G2019S) mutation carriers. *Neuroscience*. 284:311-24.
- Cai Z, Pan ZL és mtsai. (2000) Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr Res*. 47(1):64-72.
- Cain SM, Snutch TP. (2010) Voltage-gated calcium channels in epilepsy. *Epilepsia*. 51:11
- Callicott JH, Bertolino A és mtsai. (2000) Physiological dysfunction of the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia revisited. *Cereb Cortex*. 10(11):1078-92.
- Canetta SE, Bao Y és mtsai. (2014) Serological documentation of maternal influenza exposure and bipolar disorder in adult offspring. *Am J Psychiatry*. 171(5):557-63.
- Caratsch CG, Santoni A és mtsai. (1994) Interferon-alpha, beta and tumor necrosis factor-alpha enhance the frequency of miniature end-plate potentials at rat neuromuscular junction. *Neurosci Lett*. 166(1):97-100.
- Carlin RK, Grab DJ és mtsai. (1980) Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J Cell Biol*. 86(3):831-45.
- Chauhan A, Chauhan V. (2006) Oxidative stress in autism. *Pathophysiology*. 13(3):171-81.
- Chen J, Yu S és mtsai. (2014) Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders. *Front Cell Neurosci*. 8:276.
- Chess S. (1971) Autism in children with congenital rubella. *J Autism Child Schizophr*. 1(1):33-47.
- Cheung C, Yu K és mtsai. (2010) Autistic disorders and schizophrenia: related or remote? An anatomical likelihood estimation. *PLoS One*. 5(8):e12233.
- Chevalier F. (2010) Highlights on the capacities of "Gel-based" proteomics. *Proteome Sci*. 8:23.

- Cho KO, Hunt CA és mtsai. (1992) The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron*. 9(5):929-42.
- Choi GB, Yim YS és mtsai. (2016) The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*. 351(6276):933-9.
- Choi J, Min HJ és mtsai. (2011) Increased levels of HMGB1 and pro-inflammatory cytokines in children with febrile seizures. *J Neuroinflammation*. 8:135.
- Choi J, Nordli DR Jr és mtsai. (2009a) Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. *J Neuroinflammation*. 6:38.
- Choi JS, Kim SY és mtsai. (2003) Upregulation of gp130 and differential activation of STAT and p42/44 MAPK in the rat hippocampus following kainic acid-induced seizures. *Brain Res Mol Brain Res*. 119(1):10-8.
- Choi SW, Gerencser AA és mtsai. (2009b) Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure. *J Neurochem*. 109(4):1179-91.
- Chou IC, Lin WD és mtsai. (2010) Interleukin (IL)-1beta, IL-1 receptor antagonist, IL-6, IL-8, IL-10, and tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms in patients with febrile seizures. *J Clin Lab Anal*. 24(3):154-9.
- Chu Y, Jin X és mtsai. (2010) Enhanced synaptic connectivity and epilepsy in C1q knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(17):7975-80.
- Chung WS, Clarke LE és mtsai. (2013) Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*. 504(7480):394-400.
- Clancy B, Finlay BL és mtsai. (2007) Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology*. 28(5):931-7.
- Coenen AM, Van Luijtelaar EL. (2003) Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet*. 33(6):635-55.
- Cohen RS, Blomberg F és mtsai. (1977) The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex. I. Overall morphology and protein composition. *J Cell Biol*. 74(1):181-203.
- Coiro P, Padmashri R és mtsai. (2015) Impaired synaptic development in a maternal immune activation mouse model of neurodevelopmental disorders. *Brain Behav Immun*. 50:249-58.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. (1981) Proposal for revised clinical and electrographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. 22:489-501.
- Cotter D, Takei N és mtsai. (1995) Does prenatal exposure to influenza in mice induce pyramidal cell disarray in the dorsal hippocampus? *Schizophr Res*. 16(3):233-41.
- Crunelli V, Leresche N. (2002) Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks. *Nat Rev Neurosci*. 3(5):371-82.
- Cserr HF, Knopf PM. (1992) Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today*. 13(12):507-12.

- Dalmau J, Gleichman AJ és mtsai. (2008) Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol.* 7(12):1091-8.
- D'Ambrosio AL, Pinsky DJ és mtsai. (2001) The role of the complement cascade in ischemia/reperfusion injury: implications for neuroprotection. *Mol Med.* 7(6):367-82.
- D'Amelio M, Cavallucci V és mtsai. (2011) Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 14(1):69-76.
- DeGregorio-Rocasolano N, Gasull T és mtsai. (2001) Overexpression of neuronal pentraxin 1 is involved in neuronal death evoked by low K(+) in cerebellar granule cells. *J Biol Chem.* 276(1):796-803.
- De Simoni MG, Perego C és mtsai. (2000) Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci.* 12(7):2623-33.
- Dean K, Murray RM. (2005) Environmental risk factors for psychosis. *Dialogues Clin Neurosci.* 7(1):69-80.
- Deverman BE, Patterson PH. (2009) Cytokines and CNS development. *Neuron.* 64(1):61-78.
- Dhabhar FS, McEwen BS. (1999) Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(3):1059-64.
- Dickerson DD, Bilkey DK. (2013) Aberrant neural synchrony in the maternal immune activation model: using translatable measures to explore targeted interventions. *Front Behav Neurosci.* 7:217.
- Dietert RR, Dietert JM és mtsai. (2011) Environmental risk factors for autism. *Emerg Health Threats J.* 4:7111.
- Dogan MD, Ataoglu H és mtsai. (2000) Effects of different serotypes of Escherichia coli lipopolysaccharides on body temperature in rats. *Life Sci.* 67(19):2319-29.
- Dong H, Zhang X és mtsai. (2014) Mast cells and neuroinflammation. *Med Sci Monit Basic Res.* 20:200-6.
- Doose H, Gerken H és mtsai. (1973) Genetic factors in spike-wave absences. *Epilepsia.* 14(1):57-75.
- Driggers RW, Ho CY és mtsai. (2016) Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *N Engl J Med.* 374(22):2142-51.
- Drinkenburg WH, Coenen AM és mtsai. (1991) Spike-wave discharges and sleep-wake states in rats with absence epilepsy. *Epilepsy Res.* 9(3):218-24.
- Du Clos TW, Mold C. (2011) Pentraxins (CRP, SAP) in the process of complement activation and clearance of apoptotic bodies through Fcγ receptors. *Curr Opin Organ Transplant.* 16(1):15-20.
- Dubé CM, Brewster AL és mtsai. (2007) Fever, febrile seizures and epilepsy. *Trends Neurosci.* 30(10):490-6.
- Duvernoy HM, Risold PY. (2007) The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev.* 56(1):119-47.
- Earnshaw WC, Martins LM és mtsai. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 68:383-424.

- Eaton SL, Roche SL és mtsai. (2013) Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting. *PLoS One*. 8(8):e72457.
- Edgar JC, Miller GA és mtsai. (2005) Cross-modal generality of the gating deficit. *Psychophysiology*. 42(3):318-27.
- Ehrlich P. (1885) Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie. [On the oxygen consumption of the body. A study using intravital dyes.], Verlag von August Hirschwald, Berlin
- Ehrlich P. (1906) The relations existing between chemical constitution, distribution and pharmacological action, in: Collected studies on Immunity, John Wiley and Sons, Ltd., New York, 404-443.
- Eikelenboom P, Hack CE és mtsai. (1989) Complement activation in amyloid plaques in Alzheimer's dementia. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 56(4):259-62.
- Elenkov IJ. (2007) Effects of Catecholamines on the Immune Response, in: NeuroImmune Biology, Vol. 7, 1-394. Elsevier, ISBN: 978-0-444-53040-0.
- Emmerling MR, Watson MD és mtsai. (2000) The role of complement in Alzheimer's disease pathology. *Biochim Biophys Acta*. 1502(1):158-71.
- Ertürk A, Wang Y és mtsai. (2014) Local pruning of dendrites and spines by caspase-3-dependent and proteasome-limited mechanisms. *J Neurosci*. 34(5):1672-88.
- Estes ML, McAllister AK. (2015) Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*. 16(8):469-86.
- Estes ML, McAllister AK. (2016) Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science*. 353(6301):772-7.
- Fabene PF, Navarro Mora G és mtsai. (2008) A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *Nat Med*. 14(12):1377-83.
- Fabry Z, Fitzsimmons KM és mtsai. (1993) Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes. *J Neuroimmunol*. 47(1):23-34.
- Farrell MA, Droogan O és mtsai. (1995) Chronic encephalitis associated with epilepsy: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Acta Neuropathol*. 89(4):313-21.
- Fatemi SH, Earle J és mtsai. (2002) Prenatal viral infection leads to pyramidal cell atrophy and macrocephaly in adulthood: implications for genesis of autism and schizophrenia. *Cell Mol Neurobiol*. 22(1):25-33.
- Fatemi SH, Folsom TD és mtsai. (2012) The viral theory of schizophrenia revisited: abnormal placental gene expression and structural changes with lack of evidence for H1N1 viral presence in placentae of infected mice or brains of exposed offspring. *Neuropharmacology*. 62(3):1290-8.
- Fatemi SH, Sidwell R és mtsai. (1998a) Human influenza viral infection in utero increases nNOS expression in hippocampi of neonatal mice. *Synapse*. 29(1):84-8.
- Fatemi SH, Sidwell R és mtsai. (1998b) Differential expression of synaptosome-associated protein 25 kDa [SNAP-25] in hippocampi of neonatal mice following exposure to human influenza virus in utero. *Brain Res*. 800(1):1-9.

- Felten DL, Felten SY és mtsai. (1985) Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J Immunol.* 135(2 Suppl):755s-765s.
- Felten DL, Livnat S és mtsai. (1984) Sympathetic innervation of lymph nodes in mice. *Brain Res Bull.* 13(6):693-9.
- Ferreira VP, Pangburn MK és mtsai. (2010) Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol.* 47(13):2187-97.
- Fic E, Kedracka-Krok S és mtsai. (2010) Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. *Electrophoresis.* 31(21):3573-9.
- Figueiro-Silva J, Gruart A és mtsai. (2015) Neuronal pentraxin 1 negatively regulates excitatory synapse density and synaptic plasticity. *J Neurosci.* 35(14):5504-21.
- Fisher RS, Prince DA. (1977) Spike-wave rhythms in cat cortex induced by parenteral penicillin. I. Electroencephalographic features. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 42(5):608-24.
- Flierl MA, Rittirsch D és mtsai. (2008) Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box? *Mol Med.* 14(3-4):195-204.
- Fonseca MI, Chu SH és mtsai. (2017) Cell-specific deletion of C1qa identifies microglia as the dominant source of C1q in mouse brain. *J Neuroinflammation.* 14(1):48.
- Fonseca MI, Kawas CH és mtsai. (2004a) Neuronal localization of C1q in preclinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 15(1):40-6.
- Fonseca MI, Zhou J és mtsai. (2004b) Absence of C1q leads to less neuropathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 24(29):6457-65.
- Fox S, Ryan KA és mtsai. (2015) The role of C1q in recognition of apoptotic epithelial cells and inflammatory cytokine production by phagocytes during *Helicobacter pylori* infection. *J Inflamm (Lond).* 12:51.
- Frankel WN. (1999) Detecting genes in new and old mouse models for epilepsy: a prospectus through the magnifying glass. *Epilepsy Res.* 36(2-3):97-110.
- Fraser DA, Pisalyaput K és mtsai. (2010) C1q enhances microglial clearance of apoptotic neurons and neuronal blebs, and modulates subsequent inflammatory cytokine production. *J Neurochem.* 112(3):733-43.
- Galic MA, Riazi K és mtsai. (2008) Postnatal inflammation increases seizure susceptibility in adult rats. *J Neurosci.* 28(27):6904-13.
- Galic MA, Riazi K és mtsai. (2012) Cytokines and brain excitability. *Front Neuroendocrinol.* 33(1):116-25.
- Gardiner J, Marc J. (2010) Disruption of normal cytoskeletal dynamics may play a key role in the pathogenesis of epilepsy. *Neuroscientist.* 16(1):28-39.
- Gardiner RM. (1990) Genes and epilepsy. *J Med Genet.* 27(9):537-44.
- Gasque P, Fontaine M és mtsai. (1995) Complement expression in human brain. Biosynthesis of terminal pathway components and regulators in human glial cells and cell lines. *J Immunol.* 154(9):4726-33.

- Gauguier D, van Luijtelaaar G és mtsai. (2004) Chromosomal mapping of genetic loci controlling absence epilepsy phenotypes in the WAG/Rij rat. *Epilepsia*. 45(8):908-15.
- Gewurz H, Zhang XH és mtsai. (1995) Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immunol*. 7(1):54-64.
- Ginhoux F, Greter M és mtsai. (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 330(6005):841-5.
- Glantz LA, Gilmore JH és mtsai. (2006) Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia. *Schizophr Res*. 81(1):47-63.
- Gloor P. (1968) Generalized cortico-reticular epilepsies. Some considerations on the pathophysiology of generalized bilaterally synchronous spike and wave discharge. *Epilepsia*. 9(3):249-63.
- Golan HM, Lev V és mtsai. (2005) Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology*. 48(6):903-17.
- Goldmann EE. (1909) Die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der 'vitalen Färbung.' *Beiträg Klinische Chirurgie*. 64:192–265.
- Goldmann EE. (1913) Vitalfärbung am Zentralnervensystem. Beitrag zur Physio-Pathologie des plexus chorioideus und der Hirnhäute. Abh preuss, Akad Wiss Phys-Math Kl 1:1–60.
- Goto M, Yoshioka T és mtsai. (1994) LPS injected into the pregnant rat late in gestation does not induce fetal endotoxemia. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 85(1):109-12.
- Grammatikakis I, Zhang P és mtsai. (2016) Alternative Splicing of Neuronal Differentiation Factor TRF2 Regulated by HNRNPH1/H2. *Cell Rep*. 15(5):926-34.
- Grether JK, Nelson KB. (1997) Maternal infection and cerebral palsy in infants of normal birth weight. *JAMA*. 278(3):207-11.
- Gupta Y, Pasupuleti V és mtsai. (2016) Macrophage Migration Inhibitory Factor Secretion Is Induced by Ionizing Radiation and Oxidative Stress in Cancer Cells. *PLoS One*. 11(1):e0146482.
- Gyls KH, Fein JA és mtsai. (2000) Quantitative characterization of crude synaptosomal fraction (P-2) components by flow cytometry. *J Neurosci Res*. 61(2):186-92.
- Györfly BA, Gulyácssy P és mtsai. (2016) Widespread alterations in the synaptic proteome of the adolescent cerebral cortex following prenatal immune activation in rats. *Brain Behav Immun*. 56:289-309.
- Györfly B, Kovács Z és mtsai. (2014) Brain protein expression changes in WAG/Rij rats, a genetic rat model of absence epilepsy after peripheral lipopolysaccharide treatment. *Brain Behav Immun*. 35:86-95.
- Hahn CG, Banerjee A és mtsai. (2009) The post-synaptic density of human postmortem brain tissues: an experimental study paradigm for neuropsychiatric illnesses. *PLoS One*. 4(4):e5251.
- Hanisch UK. (2013) Functional diversity of microglia - how heterogeneous are they to begin with? *Front Cell Neurosci*. 7:65.

- Hanke ML, Kielian T. (2011) Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*. 121(9):367-87.
- Hartering J, Stenius K és mtsai. (1996) 16-BAC/SDS-PAGE: a two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins. *Anal Biochem*. 240(1):126-33.
- Hell JW. (2014) CaMKII: claiming center stage in postsynaptic function and organization. *Neuron*. 81(2):249-65.
- Hench PS, Kendall EC és mtsai. (1950) Effects of cortisone acetate and pituitary ACTH on rheumatoid arthritis, rheumatic fever and certain other conditions. *Arch Intern Med (Chic)*. 85(4):545-666.
- Holloway T, Moreno JL és mtsai. (2013) Prenatal stress induces schizophrenia-like alterations of serotonin 2A and metabotropic glutamate 2 receptors in the adult offspring: role of maternal immune system. *J Neurosci*. 33(3):1088-98.
- Hong S, Beja-Glasser VF és mtsai. (2016) Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*. 352(6286):712-6.
- Hooper AW, Alamilla JF és mtsai. (2016) Neuronal pentraxin 1 depletion delays neurodegeneration and extends life in Sandhoff disease mice. *Hum Mol Genet*. pii: ddw422.
- Hosack DA, Dennis G Jr és mtsai. (2003) Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol*. 4(10):R70.
- Hosokawa M, Klegeris A és mtsai. (2003) Expression of complement messenger RNAs and proteins by human oligodendroglial cells. *Glia*. 42(4):417-23.
- Hsiao EY, Patterson PH. (2011) Activation of the maternal immune system induces endocrine changes in the placenta via IL-6. *Brain Behav Immun*. 25(4):604-15.
- Huang da W, Sherman BT és mtsai. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 4(1):44-57.
- Huang Y, Smith DE és mtsai. (2011) Neuron-specific effects of interleukin-1 $\beta$  are mediated by a novel isoform of the IL-1 receptor accessory protein. *J Neurosci*. 31(49):18048-59.
- Hughes JR. (2009) Absence seizures: a review of recent reports with new concepts. *Epilepsy Behav*. 15(4):404-12.
- Jankowsky JL, Patterson PH. (1999) Cytokine and growth factor involvement in long-term potentiation. *Mol Cell Neurosci*. 14(6):273-86.
- Johnson AK, Gross PM. (1993) Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J*. 7(8):678-86.
- Johnson MW, Chotiner JK és mtsai. (1997) Isolation and characterization of synaptoneurosomes from single rat hippocampal slices. *J Neurosci Methods*. 77(2):151-6.
- Juckel G, Manitz MP és mtsai. (2011) Microglial activation in a neuroinflammatory animal model of schizophrenia--a pilot study. *Schizophr Res*. 131(1-3):96-100.
- Kanamori T, Kanai MI és mtsai. (2013) Compartmentalized calcium transients trigger dendrite pruning in *Drosophila* sensory neurons. *Science*. 340(6139):1475-8.



- Kanner L. (1943) Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*. Vol. 2:217-250.
- Katsuki H, Nakai S és mtsai. (1990) Interleukin-1 beta inhibits long-term potentiation in the CA3 region of mouse hippocampal slices. *Eur J Pharmacol*. 181(3):323-6.
- Kawai T, Akira S. (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*. 13(11):460-9.
- Kenney MJ, Ganta CK. (2014) Autonomic nervous system and immune system interactions. *Compr Physiol*. 4(3):1177-200.
- Kerner J, Lee K és mtsai. (2012) VDAC proteomics: post-translation modifications. *Biochim Biophys Acta*. 1818(6):1520-5.
- Khan D, Fernando P és mtsai. (2014) Long-term effects of maternal immune activation on depression-like behavior in the mouse. *Transl Psychiatry*. 4:e363.
- Kido M, Nakamura Y és mtsai. (2014) The polymorphism of YWHAE, a gene encoding 14-3-3epsilon, and brain morphology in schizophrenia: a voxel-based morphometric study. *PLoS One*. 9(8):e103571.
- Klein R, Livingston S. (1950) The effect of adrenocorticotrophic hormone in epilepsy. *J Pediatr*. 37(5):733-42.
- Klemmer P, Meredith RM és mtsai. (2011) Proteomics, ultrastructure, and physiology of hippocampal synapses in a fragile X syndrome mouse model reveal presynaptic phenotype. *J Biol Chem*. 286(29):25495-504.
- Knuesel I, Chicha L és mtsai. (2014) Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat Rev Neurol*. 10(11):643-60.
- Koenigs M, Grafman J. (2009) The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. *Behav Brain Res*. 201(2):239-43.
- Kovács Z, Czurkó A és mtsai. (2011) Intracerebroventricularly administered lipopolysaccharide enhances spike-wave discharges in freely moving WAG/Rij rats. *Brain Res Bull*. 85(6):410-6.
- Kovács Z, Dobolyi A és mtsai. (2014) Lipopolysaccharide induced increase in seizure activity in two animal models of absence epilepsy WAG/Rij and GAERS rats and Long Evans rats. *Brain Res Bull*. 104:7-18.
- Kovács Z, Kékesi KA és mtsai. (2006) Facilitation of spike-wave discharge activity by lipopolysaccharides in Wistar Albino Glaxo/Rijswijk rats. *Neuroscience*. 140(2):731-42.
- Kronfol Z, Remick DG. (2000) Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry*. 157(5):683-94.
- Krueger JM, Toth LA. (1994) Cytokines as regulators of sleep. *Ann N Y Acad Sci*. 739:299-310.
- Krueger JM. (2008) The role of cytokines in sleep regulation. *Curr Pharm Des*. 14(32):3408-16.
- Kruger TE. (1996) Immunomodulation of peripheral lymphocytes by hormones of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Adv Neuroimmunol*. 6(4):387-95.
- Kumar S, Kumar V és mtsai. (2013) Immunological Variations in Epileptic Children. *Open Journal of Applied Sciences*. 3:71-91
- Labouesse MA, Dong E és mtsai. (2015) Maternal immune activation induces GAD1 and GAD2 promoter remodeling in the offspring prefrontal cortex. *Epigenetics*. 10(12):1143-55.

- Lanté F, Meunier J és mtsai. (2007) Neurodevelopmental damage after prenatal infection: role of oxidative stress in the fetal brain. *Free Radic Biol Med.* 42(8):1231-45.
- Lawson LJ, Perry VH és mtsai. (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* 48(2):405-15.
- Lenkov DN, Volnova AB és mtsai. (2013) Advantages and limitations of brain imaging methods in the research of absence epilepsy in humans and animal models. *J Neurosci Methods.* 212(2):195-202.
- Lennox WG, Jolly DH. (1954) Seizures, brain waves and intelligence tests of epileptic twins. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 33:325-45.
- Lévi-Strauss M, Mallat M. (1987) Primary cultures of murine astrocytes produce C3 and factor B, two components of the alternative pathway of complement activation. *J Immunol.* 139(7):2361-6.
- Lewandowsky M. (1900) Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit. *Z. Clin. Med.* 40:480-494
- Li G, Bauer S és mtsai. (2011) Cytokines and epilepsy. *Seizure.* 20(3):249-56.
- Li Q, Cheung C és mtsai. (2009) Prenatal immune challenge is an environmental risk factor for brain and behavior change relevant to schizophrenia: evidence from MRI in a mouse model. *PLoS One.* 4(7):e6354.
- Li T, Zhang S. (2016) Microgliosis in the Injured Brain: Infiltrating Cells and Reactive Microglia Both Play a Role. *Neuroscientist.* 22(2):165-70.
- Liimatainen S, Fallah M és mtsai. (2009) Interleukin-6 levels are increased in temporal lobe epilepsy but not in extra-temporal lobe epilepsy. *J Neurol.* 256(5):796-802.
- Linnartz B, Kopatz J és mtsai. (2012) Sialic acid on the neuronal glycolyx prevents complement C1 binding and complement receptor-3-mediated removal by microglia. *J Neurosci.* 32(3):946-52
- Littler DR, Harrop SJ és mtsai. (2004) The intracellular chloride ion channel protein CLIC1 undergoes a redox-controlled structural transition. *J Biol Chem.* 279(10):9298-305.
- Lo Vasco VR, Cardinale G és mtsai. (2012) Deletion of PLCB1 gene in schizophrenia-affected patients. *J Cell Mol Med.* 16(4):844-51.
- Louveau A, Smirnov I és mtsai. (2015) Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature.* 523(7560):337-41.
- Löscher W. (2011) Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure.* 20(5):359-68.
- Lubin FD, Ren Y és mtsai. (2007) Nuclear factor-kappa B regulates seizure threshold and gene transcription following convulsant stimulation. *J Neurochem.* 103(4):1381-95.
- Luchicchi A, Lecca S és mtsai. (2016) Maternal Immune Activation Disrupts Dopamine System in the Offspring. *Int J Neuropsychopharmacol.* 19(7). pii: pyw007.
- Lui H, Zhang J és mtsai. (2016) Progranulin Deficiency Promotes Circuit-Specific Synaptic Pruning by Microglia via Complement Activation. *Cell.* 165(4):921-35.

- Ma Y, Ramachandran A és mtsai. (2013) Remodeling of dendrites and spines in the C1q knockout model of genetic epilepsy. *Epilepsia*. 54(7):1232-9.
- Macfarlane DE. (1989) Two dimensional benzyldimethyl-n-hexadecylammonium chloride----sodium dodecyl sulfate preparative polyacrylamide gel electrophoresis: a high capacity high resolution technique for the purification of proteins from complex mixtures. *Anal Biochem*. 176(2):457-63.
- Machón RA, Mednick SA és mtsai. (1997) Adult major affective disorder after prenatal exposure to an influenza epidemic. *Arch Gen Psychiatry*. 54(4):322-8.
- Magi B, Bini L és mtsai. (1998) Charge heterogeneity of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human liver and breast tissue. *Electrophoresis*. 19(11):2010-3.
- Maier SF, Goehler LE és mtsai. (1998) The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. *Ann N Y Acad Sci*. 840:289-300.
- Malkova NV, Yu CZ és mtsai. (2012) Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain Behav Immun*. 26(4):607-16.
- Mannion A, Leader G. (2013) Comorbidity in autism spectrum disorder: A literature review. *Research in Autism Spectrum Disorders*. 12:1595-1616.
- Marco EJ, Khatibi K és mtsai. (2012) Children with autism show reduced somatosensory response: an MEG study. *Autism Res*. 5(5):340-51.
- Marescaux C, Vergnes M és mtsai. (1992) Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg--a review. *J Neural Transm Suppl*. 35:37-69.
- Markowitz PI. (1983) Autism in a child with congenital cytomegalovirus infection. *J Autism Dev Disord*. 13(3):249-53.
- Marmarou A. (2007) A review of progress in understanding the pathophysiology and treatment of brain edema. *Neurosurg Focus*. 22(5):E1.
- Mattson MP, Keller JN és mtsai. (1998) Evidence for synaptic apoptosis. *Exp Neurol*. 153(1):35-48.
- Mattson MP, Gary DS és mtsai. (2001) Perturbed endoplasmic reticulum function, synaptic apoptosis and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Symp*. (67):151-62.
- Maynard TM, Sikich L és mtsai. (2001) Neural development, cell-cell signaling, and the "two-hit" hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 27(3):457-76.
- McKnight K, Jiang Y és mtsai. (2005) Serum antibodies in epilepsy and seizure-associated disorders. *Neurology*. 65(11):1730-6.
- Medawar PB. (1948) Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol*. 29(1):58-69.
- Mednick SA, Machon RA és mtsai. (1988) Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic. *Arch Gen Psychiatry*. 45(2):189-92.

- Meeren H, van Luijckelaeer G és mtsai. (2005) Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. *Arch Neurol.* 62(3):371-6.
- Meldrum BS. (1993) Excitotoxicity and selective neuronal loss in epilepsy. *Brain Pathol.* 3(4):405-12.
- Meyer U, Feldon J és mtsai. (2011) Schizophrenia and autism: both shared and disorder-specific pathogenesis via perinatal inflammation? *Pediatr Res.* 69(5 Pt 2):26R-33R.
- Meyer U, Feldon J és mtsai. (2009a) In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 33(7):1061-79.
- Meyer U, Feldon J és mtsai. (2009b) A review of the fetal brain cytokine imbalance hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 35(5):959-72.
- Meyer U, Murray PJ és mtsai. (2008b) Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling. *Mol Psychiatry.* 13(2):208-21.
- Meyer U, Nyffeler M és mtsai. (2006) The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci.* 26(18):4752-62.
- Meyer U, Nyffeler M és mtsai. (2008a) Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. *Brain Behav Immun.* 22(4):469-86.
- Miles JH. (2011) Autism spectrum disorders--a genetics review. *Genet Med.* 13(4):278-94.
- Miller AH, Haroon E és mtsai. (2013) Cytokine targets in the brain: impact on neurotransmitters and neurocircuits. *Depress Anxiety.* 30(4):297-306.
- Milton RH, Abeti R és mtsai. (2008) CLIC1 function is required for beta-amyloid-induced generation of reactive oxygen species by microglia. *J Neurosci.* 28(45):11488-99.
- Minami M, Kuraishi Y és mtsai. (1991) Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha and LIF in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 176(2):593-8.
- Mindruta I, Dimitriu A és mtsai (2011) Insights in classification of seizures and epilepsies – review of key concepts throughout history. *Romanian Journal of Neurology.* Vol. 10 Issue 4, p161
- Mirnic K, Middleton FA és mtsai. (2000) Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron.* 28(1):53-67.
- Misra UK, Tan CT és mtsai. (2008) Viral encephalitis and epilepsy. *Epilepsia.* 49 Suppl 6:13-8.
- Miyamoto A, Wake H és mtsai. (2013) Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. *Front Cell Neurosci.* 7:70.
- Miyamoto S, Miyake N és mtsai. (2012) Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. *Mol Psychiatry.* 17(12):1206-27.
- Morgan BP, Gasque P és mtsai. (1997) The role of complement in disorders of the nervous system. *Immunopharmacology.* 38(1-2):43-50.

- Morgan BP, Gasque P. (1996) Expression of complement in the brain: role in health and disease. *Immunol Today*. 17(10):461-6.
- Mrass P, Weninger W. (2006) Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors. *Immunol Rev*. 213:195-212.
- Murphy JB, Sturm E. (1923) Conditions determining the transplantability of tissues in the brain. *J Exp Med*. 38(2):183-97.
- Müller-Eberhard HJ. (1988) Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem*. 57:321-47.
- Nauta AJ, Bottazzi B és mtsai. (2003) Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *Eur J Immunol*. 33(2):465-73.
- Nauta AJ, Trouw LA és mtsai. (2002) Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol*. 32(6):1726-36.
- Navratil JS, Watkins SC és mtsai. (2001) The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells. *J Immunol*. 166(5):3231-9.
- Neuwelt EA, Bauer B és mtsai. (2011) Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat Rev Neurosci*. 12(3):169-82.
- Nguyen MT, Lue H és mtsai. (2003) The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis. *J Immunol*. 170(6):3337-47.
- Niederhorn JY. (2006) See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nat Immunol*. 7(4):354-9.
- Niquet J, Ben-Ari Y és mtsai. (1994) Glial reaction after seizure induced hippocampal lesion: immunohistochemical characterization of proliferating glial cells. *J Neurocytol*. 23(10):641-56.
- Nørgaard M, Ehrenstein V és mtsai. (2012) Maternal use of antibiotics, hospitalisation for infection during pregnancy, and risk of childhood epilepsy: a population-based cohort study. *PLoS One*. 7(1):e30850.
- O'Brien R, Xu D és mtsai. (2002) Synaptically targeted narp plays an essential role in the aggregation of AMPA receptors at excitatory synapses in cultured spinal neurons. *J Neurosci*. 22(11):4487-98.
- Oby E, Janigro D. (2006) The blood-brain barrier and epilepsy. *Epilepsia*. 47(11):1761-74.
- Olmos-Alonso A, Schetters ST és mtsai. (2016) Pharmacological targeting of CSF1R inhibits microglial proliferation and prevents the progression of Alzheimer's-like pathology. *Brain*. 139(Pt 3):891-907.
- Opp MR. (2005) Cytokines and sleep. *Sleep Med Rev*. 9(5):355-64.
- Oskvig DB, Elkahlon AG és mtsai. (2012) Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain Behav Immun*. 26(4):623-34.
- Ousman SS, Kubes P. (2012) Immune surveillance in the central nervous system. *Nat Neurosci*. 15(8):1096-101.
- Owens DG, Johnstone EC és mtsai. (1985) Lateral ventricular size in schizophrenia: relationship to the disease process and its clinical manifestations. *Psychol Med*. 15(1):27-41.

- Ozaki T, Yamashita T és mtsai. (2009) Mitochondrial m-calpain plays a role in the release of truncated apoptosis-inducing factor from the mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1793(12):1848-59.
- Païdassi H, Tacnet-Delorme P és mtsai. (2008) C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition. *J Immunol*. 180(4):2329-38.
- Pan W, Stone KP és mtsai. (2011) Cytokine signaling modulates blood-brain barrier function. *Curr Pharm Des*. 17(33):3729-40.
- Panayiotopoulos CP. (1999) Typical absence seizures and their treatment. *Arch Dis Child*. 81(4):351-5.
- Parboosing R, Bao Y és mtsai. (2013) Gestational influenza and bipolar disorder in adult offspring. *JAMA Psychiatry*. 70(7):677-85.
- Parker-Athill E, Luo D és mtsai. (2009) Flavonoids, a prenatal prophylaxis via targeting JAK2/STAT3 signaling to oppose IL-6/MIA associated autism. *J Neuroimmunol*. 217(1-2):20-7.
- Parwani A, Duncan EJ és mtsai. (2000) Impaired prepulse inhibition of acoustic startle in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 47(7):662-9.
- Patterson PH. (2009) Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behav Brain Res*. 204(2):313-21.
- Patterson PH. (2011) Modeling autistic features in animals. *Pediatr Res*. 69(5 Pt 2):34R-40R.
- Pavlov VA, Parrish WR és mtsai. (2009) Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun*. 23(1):41-5.
- Pelkey KA, Barksdale E és mtsai. (2015) Pentraxins coordinate excitatory synapse maturation and circuit integration of parvalbumin interneurons. *Neuron*. 85(6):1257-72.
- Peltola J, Palmio J és mtsai. (2000) Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in cerebrospinal fluid from patients with recent tonic-clonic seizures. *Epilepsy Res*. 41(3):205-11.
- Penfield WG, Jasper HH. (1954) *Epilepsy and the Functional Anatomy of the Human Brain*. Boston, Mass: Little Brown & Co
- Penzes P, Cahill ME és mtsai. (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*. 14(3):285-93.
- Perissutti S, Tedesco F. (1994) Effect of cytokines on the secretion of the fifth and eighth complement components by HepG2 cells. *Int J Clin Lab Res*. 24(1):45-8.
- Perry VH, O'Connor V. (2008) C1q: the perfect complement for a synaptic feast? *Nat Rev Neurosci*. 9(11):807-11.
- Perry W, Minassian A és mtsai. (2007) Sensorimotor gating deficits in adults with autism. *Biol Psychiatry*. 61(4):482-6.
- Phillips GR, Huang JK és mtsai. (2001) The presynaptic particle web: ultrastructure, composition, dissolution, and reconstitution. *Neuron*. 32(1):63-77.
- Plata-Salamán CR, Ilyin SE és mtsai. (2000) Kindling modulates the IL-1beta system, TNF-alpha, TGF-beta1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. *Brain Res Mol Brain Res*. 75(2):248-58.

- Postupna NO, Keene CD és mtsai. (2014) Flow cytometry analysis of synaptosomes from post-mortem human brain reveals changes specific to Lewy body and Alzheimer's disease. *Lab Invest.* 94(10):1161-72.
- Prinz M, Priller J. (2014) Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci.* 15(5):300-12.
- Pulver AE, Stewart W és mtsai. (1983) Risk factors in schizophrenia: season birth in Maryland, USA. *Br J Psychiatry.* 143:389-96.
- Ransohoff RM, Kivisäkk P és mtsai. (2003) Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 3(7):569-81.
- Rasmussen T, Olszewski J és mtsai. (1958) Focal seizures due to chronic localized encephalitis. *Neurology.* 8(6):435-45.
- Ravizza T, Vezzani A. (2006) Status epilepticus induces time-dependent neuronal and astrocytic expression of interleukin-1 receptor type I in the rat limbic system. *Neuroscience.* 137(1):301-8.
- Reese TS, Karnovsky MJ. (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol.* 34(1):207-17.
- Rhen T, Cidlowski JA. (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med.* 353(16):1711-23.
- Riazi K, Galic MA és mtsai. (2008) Microglial activation and TNF $\alpha$  production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(44):17151-6.
- Richetto J, Calabrese F és mtsai. (2014) Prenatal immune activation induces maturation-dependent alterations in the prefrontal GABAergic transcriptome. *Schizophr Bull.* 40(2):351-61.
- Ricklin D, Hajishengallis G és mtsai. (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 11(9):785-97.
- Rippon G, Brock J és mtsai. (2007) Disordered connectivity in the autistic brain: challenges for the "new psychophysiology". *Int J Psychophysiol.* 63(2):164-72.
- Robel S. (2016) Astroglial Scarring and Seizures: A Cell Biological Perspective on Epilepsy. *Neuroscientist.* pii: 1073858416645498.
- Rogers CA, Gasque P és mtsai. (1996) Expression and function of membrane regulators of complement on rat astrocytes in culture. *Immunology.* 88(1):153-61.
- Romero E, Guaza C és mtsai. (2010) Ontogeny of sensorimotor gating and immune impairment induced by prenatal immune challenge in rats: implications for the etiopathology of schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 15(4):372-83.
- Rong Y, Baudry M. (1996) Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. *J Neurochem.* 67(2):662-8.
- Roth J, Harré EM és mtsai. (2004) Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. *Front Biosci.* 9:290-300.

- Roumier A, Pascual O és mtsai. (2008) Prenatal activation of microglia induces delayed impairment of glutamatergic synaptic function. *PLoS One*. 3(7):e2595.
- Rudolf G, Bihoreau MT és mtsai. (2004) Polygenic control of idiopathic generalized epilepsy phenotypes in the genetic absence rats from Strasbourg (GAERS). *Epilepsia*. 45(4):301-8.
- Rus HG, Kim LM és mtsai. (1992) Induction of C3 expression in astrocytes is regulated by cytokines and Newcastle disease virus. *J Immunol*. 148(3):928-33.
- Saha S, Chant D és mtsai. (2005) A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med*. 2(5):e141.
- Saijo K, Glass CK. (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 11(11):775-87.
- Samuelsson AM, Jennische E és mtsai. (2006) Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 290(5):R1345-56.
- Sarma JV, Ward PA. (2011) The complement system. *Cell Tissue Res*. 343(1):227-35.
- Saunders NR, Dreifuss JJ és mtsai. (2014) The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. *Front Neurosci*. 8:404.
- Saunders NR, Ek CJ és mtsai. (2008) Barriers in the brain: a renaissance? *Trends Neurosci*. 31(6):279-86.
- Schafer DP, Lehrman EK és mtsai. (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*. 74(4):691-705.
- Schafer DP, Lehrman EK és mtsai. (2013) The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia*. 61(1):24-36.
- Schägger H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc*. 1(1):16-22.
- Schiffelholz T, Lancel M. (2001) Sleep changes induced by lipopolysaccharide in the rat are influenced by age. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 280(2):R398-403.
- Schinagl A, Thiele M és mtsai. (2016) Oxidized macrophage migration inhibitory factor is a potential new tissue marker and drug target in cancer. *Oncotarget*. 7(45):73486-73496.
- Schmid I, Uittenbogaart CH és mtsai. (1991) A gentle fixation and permeabilization method for combined cell surface and intracellular staining with improved precision in DNA quantification. *Cytometry*. 12(3):279-85.
- Schubert KO, Föcking M és mtsai. (2012) Hypothesis review: are clathrin-mediated endocytosis and clathrin-dependent membrane and protein trafficking core pathophysiological processes in schizophrenia and bipolar disorder? *Mol Psychiatry*. 17(7):669-81.
- Seruga B, Zhang H és mtsai. (2008) Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. *Nat Rev Cancer*. 8(11):887-99.
- Seshadri S, Zeledon M és mtsai. (2013) Synapse-specific contributions in the cortical pathology of schizophrenia. *Neurobiol Dis*. 53:26-35.



- Sham PC, O'Callaghan E és mtsai. (1992) Schizophrenia following pre-natal exposure to influenza epidemics between 1939 and 1960. *Br J Psychiatry*. 160:461-6.
- Shatz CJ. (2009) MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity. *Neuron*. 64(1):40-5.
- Shaw JA, Perry VH és mtsai. (1994) MHC class II expression by microglia in tetanus toxin-induced experimental epilepsy in the rat. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 20(4):392-8.
- Shevchenko A, Tomas H és mtsai. (2006) Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*. 1(6):2856-60.
- Shi L, Fatemi SH és mtsai. (2003) Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J Neurosci*. 23(1):297-302.
- Shi L, Tu N és mtsai. (2005) Maternal influenza infection is likely to alter fetal brain development indirectly: the virus is not detected in the fetus. *Int J Dev Neurosci*. 23(2-3):299-305.
- Shirai Y. (1921) On the transplantation of rat sarcoma in adult heterogeneous animals. *Jpn. Med. World* 1:14-15
- Sia GM, Bélique JC és mtsai. (2007) Interaction of the N-terminal domain of the AMPA receptor GluR4 subunit with the neuronal pentraxin NP1 mediates GluR4 synaptic recruitment. *Neuron*. 55(1):87-102.
- Siegert S, Seo J és mtsai. (2015) The schizophrenia risk gene product miR-137 alters presynaptic plasticity. *Nat Neurosci*. 18(7):1008-16.
- Singh AK, Jiang Y. (2004) How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats? *Toxicology*. 201(1-3):197-207.
- Singh H, Ashley RH. (2006) Redox regulation of CLIC1 by cysteine residues associated with the putative channel pore. *Biophys J*. 90(5):1628-38.
- Smith SE, Elliott RM és mtsai. (2012) Maternal immune activation increases neonatal mouse cortex thickness and cell density. *J Neuroimmune Pharmacol*. 7(3):529-32.
- Smith SE, Li J és mtsai. (2007) Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci*. 27(40):10695-702.
- Snead OC 3rd. (1992) Pharmacological models of generalized absence seizures in rodents. *J Neural Transm Suppl*. 35:7-19.
- Soriano E, Del Río JA. (2005) The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron*. 46(3):389-94.
- Spangenberg EE, Lee RJ és mtsai. (2016) Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- $\beta$  pathology. *Brain*. 139(Pt 4):1265-81.
- Spear LP. (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev*. 24(4):417-63.
- Spencer KM, Nestor PG. (2003) Abnormal neural synchrony in schizophrenia. *J Neurosci*. 23(19):7407-11.
- Stafstrom CE. (2006) Epilepsy: a review of selected clinical syndromes and advances in basic science. *J Cereb Blood Flow Metab*. 26(8):983-1004.

- Stahel PF, Barnum SR. (1997) Bacterial meningitis: complement gene expression in the central nervous system. *Immunopharmacology*. 38(1-2):65-72.
- Stahel PF, Morganti-Kossmann MC és mtsai. (1998) The role of the complement system in traumatic brain injury. *Brain Res Brain Res Rev*. 27(3):243-56.
- Steinhauer HB, Hertting G. (1981) Lowering of the convulsive threshold by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur J Pharmacol*. 69(2):199-203.
- Stephan AH, Barres BA és mtsai. (2012) The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu Rev Neurosci*. 35:369-89.
- Stephan AH, Madison DV és mtsai. (2013) A dramatic increase of C1q protein in the CNS during normal aging. *J Neurosci*. 33(33):13460-74.
- Sternberg EM. (2006) Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 6(4):318-28.
- Stevens B, Allen NJ és mtsai. (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. 131(6):1164-78.
- Sun J, Wan C és mtsai. (2011) Application of systems biology approach identifies and validates GRB2 as a risk gene for schizophrenia in the Irish Case Control Study of Schizophrenia (ICCS) sample. *Schizophr Res*. 125(2-3):201-8.
- Sun Y, Vestergaard M és mtsai. (2008) Prenatal exposure to maternal infections and epilepsy in childhood: a population-based cohort study. *Pediatrics*. 121(5):e1100-7.
- Tandon R, Gaebel W és mtsai. (2013) Definition and description of schizophrenia in the DSM-5. *Schizophr Res*. 150(1):3-10.
- Tanriverdi F, Silveira LF és mtsai. (2003) The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *J Endocrinol*. 176(3):293-304.
- Tenner AJ, Fonseca MI. (2006) The double-edged flower: roles of complement protein C1q in neurodegenerative diseases. *Adv Exp Med Biol*. 586:153-76.
- Tenney JR, Glauser TA. (2013) The current state of absence epilepsy: can we have your attention? *Epilepsy Curr*. 13(3):135-40.
- Teo H, Ghosh S és mtsai. (2010) Telomere-independent Rap1 is an IKK adaptor and regulates NF-kappaB-dependent gene expression. *Nat Cell Biol*. 12(8):758-67.
- Thatipamula S, Hossain MA. (2014) Critical role of extracellularly secreted neuronal pentraxin 1 in ischemic neuronal death. *BMC Neurosci*. 15:133.
- Thoma RJ, Hanlon FM és mtsai. (2007) Impaired secondary somatosensory gating in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res*. 151(3):189-99.
- Thomas A, Gasque P és mtsai. (2000) Expression of a complete and functional complement system by human neuronal cells in vitro. *Int Immunol*. 12(7):1015-23.

- Torrey EF, Rawlings R és mtsai. (1988) Schizophrenic births and viral diseases in two states. *Schizophr Res.* 1(1):73-7.
- Tracey KJ. (2009) Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol.* 9(6):418-28.
- Urakubo A, Jarskog LF és mtsai. (2001) Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. *Schizophr Res.* 47(1):27-36.
- van Dooremaal JC. (1873) Die Entwicklung der in fremden Grund versetzten lebenden Geweba. *Albrecht Von Graefes Arch. Ophthalmol.* 19:358–373
- van Engeland M, Nieland LJ és mtsai. (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.* 31(1):1-9.
- van Luijtelaar EL, Coenen AM. (1986) Two types of electrocortical paroxysms in an inbred strain of rats. *Neurosci Lett.* 70(3):393-7.
- Vasek MJ, Garber C és mtsai. (2016) A complement-microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment. *Nature.* 534(7608):538-43.
- Veerhuis R, Nielsen HM és mtsai. (2011) Complement in the brain. *Mol Immunol.* 48(14):1592-603.
- Vergnes M, Marescaux C és mtsai. (1982) Spontaneous paroxysmal electroclinical patterns in rat: a model of generalized non-convulsive epilepsy. *Neurosci Lett.* 33(1):97-101.
- Verma S, Nakaoko R és mtsai. (2006) Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun.* 20(5):449-55.
- Vezzani A, French J és mtsai. (2011) The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 7(1):31-40.
- Vezzani A, Moneta D és mtsai. (2002) Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia.* 43 Suppl 5:30-5.
- Vezzani A, Viviani B. (2015) Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology.* 96(Pt A):70-82.
- Vezzani A. (2015) Anti-inflammatory drugs in epilepsy: does it impact epileptogenesis? *Expert Opin Drug Saf.* 14(4):583-92.
- Virta M, Hurme M és mtsai. (2002) Increased plasma levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in patients with febrile seizures. *Epilepsia.* 43(8):920-3.
- Volkmar FR, McPartland JC. (2014) From Kanner to DSM-5: autism as an evolving diagnostic concept. *Annu Rev Clin Psychol.* 10:193-212.
- Voutsinos-Porche B, Koning E és mtsai. (2004) Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 17(3):385-402.
- Walker E, Bollini AM. (2002) Pubertal neurodevelopment and the emergence of psychotic symptoms. *Schizophr Res.* 54(1-2):17-23.

- Wallenstein MC. (1987) Attenuation of penicillin models of epilepsy by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Exp Neurol.* 98(1):152-60.
- Wang HC, Klein JR. (2001) Immune function of thyroid stimulating hormone and receptor. *Crit Rev Immunol.* 21(4):323-37.
- Wang Y, Wang D és mtsai. (2015) Interictal cytokine levels were correlated to seizure severity of epileptic patients: a retrospective study on 1218 epileptic patients. *J Transl Med.* 13:378.
- Warren Z, McPheeters ML és mtsai. (2011) A systematic review of early intensive intervention for autism spectrum disorders. *Pediatrics.* 127(5):e1303-11.
- Wasserman MJ, Belton NR és mtsai. (1965) Effect of corticotropin (ACTH) on experimental seizures. Adrenal independence and relation to intracellular brain sodium. *Neurology.* 15(12):1136-41.
- Watson CG, Kucala T és mtsai. (1984) Schizophrenic birth seasonality in relation to the incidence of infectious diseases and temperature extremes. *Arch Gen Psychiatry.* 41(1):85-90.
- Weed LH. (1917) An anatomical consideration of the cerebro-spinal fluid. *Anat. Res.* 12:461–496.
- Weir RK, Forghany R és mtsai. (2015) Preliminary evidence of neuropathology in nonhuman primates prenatally exposed to maternal immune activation. *Brain Behav Immun.* 48:139-46.
- Werling DM, Geschwind DH. (2013) Sex differences in autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol.* 26(2):146-53.
- Whitehead E, Dodds L és mtsai. (2006) Relation of pregnancy and neonatal factors to subsequent development of childhood epilepsy: a population-based cohort study. *Pediatrics.* 117(4):1298-306.
- Whittaker VP. (1993) Thirty years of synaptosome research. *J Neurocytol.* 22(9):735-42.
- Wiedenmann B, Franke WW. (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell.* 41(3):1017-28.
- Wilhelm BG, Mandad S és mtsai. (2014) Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science.* 344(6187):1023-8.
- Williams DW, Kondo S és mtsai. (2006b) Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning. *Nat Neurosci.* 9(10):1234-6.
- Williams JG, Higgins JP és mtsai. (2006a) Systematic review of prevalence studies of autism spectrum disorders. *Arch Dis Child.* 91(1):8-15.
- Williams JM, Felten DL. (1981) Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: a comparative histofluorescence study. *Anat Rec.* 199(4):531-42.
- Wolf ME, Kapatos G. (1989) Flow cytometric analysis of rat striatal nerve terminals. *J Neurosci.* 9(1):94-105.
- Wong M. (2008) Stabilizing dendritic structure as a novel therapeutic approach for epilepsy. *Expert Rev Neurother.* 8(6):907-15.
- Wright P, Takei N és mtsai. (1995) Maternal influenza, obstetric complications, and schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 152(12):1714-20.

- Wu YW, Colford JM Jr. (2000) Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: A meta-analysis. *JAMA*. 284(11):1417-24.
- Xie Y, Ding YQ és mtsai. (2005) Phosphatidylinositol transfer protein-alpha in netrin-1-induced PLC signalling and neurite outgrowth. *Nat Cell Biol*. 7(11):1124-32.
- Xu D, Hopf C és mtsai. (2003) Narp and NP1 form heterocomplexes that function in developmental and activity-dependent synaptic plasticity. *Neuron*. 39(3):513-28.
- Xu Y, Zhu J és mtsai. (2016) CLIC1 Inhibition Attenuates Vascular Inflammation, Oxidative Stress, and Endothelial Injury. *PLoS One*. 11(11):e0166790.
- Xuan IC, Hampson DR. (2014) Gender-dependent effects of maternal immune activation on the behavior of mouse offspring. *PLoS One*. 9(8):e104433.
- Yamasaki N, Maekawa M és mtsai. (2008) Alpha-CaMKII deficiency causes immature dentate gyrus, a novel candidate endophenotype of psychiatric disorders. *Mol Brain*. 1:6.
- Yamashita Y, Fujimoto C és mtsai. (2003) Possible association between congenital cytomegalovirus infection and autistic disorder. *J Autism Dev Disord*. 33(4):455-9.
- Yao JK, Keshavan MS. (2011) Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view. *Antioxid Redox Signal*. 15(7):2011-35.
- Yin P, Zhang XT és mtsai. (2015) Maternal immune activation increases seizure susceptibility in juvenile rat offspring. *Epilepsy Behav*. 47:93-7.
- Zamponi GW, Lory P és mtsai. (2010) Role of voltage-gated calcium channels in epilepsy. *Pflugers Arch*. 460(2):395-403.
- Zeng LH, Xu L és mtsai. (2007) Kainate seizures cause acute dendritic injury and actin depolymerization in vivo. *J Neurosci*. 27(43):11604-13.
- Zhang Y, Hu W. (2012) NFκB signaling regulates embryonic and adult neurogenesis. *Front Biol (Beijing)*. 7(4).
- Zuckerman L, Rehavi M és mtsai. (2003) Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: a novel neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 28(10):1778-89.

## ADATLAP

### a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához\*

#### I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: **Györfly Balázs András**

MTMT-azonosító: **10034948**

A doktori értekezés címe és alcíme: **Neuroimmunológiai interakciók proteomikai vizsgálata**

DOI-azonosító: **10.15476/ELTE.2017.066**

A doktori iskola neve: **Biológia Doktori Iskola**

A doktori iskolán belüli doktori program neve: **Molekuláris, sejt- és neurobiológia doktori program**

A témavezető neve és tudományos fokozata: **Dr. Kékesi Adrienna Katalin**

A témavezető munkahelye: **ELTE, TTK, Biológiai Intézet, Élettani és Neurobiológiai Tanszék**

#### II. Nyilatkozatok

##### 1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatali Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

##### 2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: **2017. 04. 13., Budapest**

.....  
  
.....  
**a doktori értekezés szerzőjének aláírása**

\*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet