

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

## Inzulin és GLP-1 receptorok expressziója az agykéreg interneuronjaiban

Dr. Csajbók Éva



Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

1. sz. Belgyógyászati Klinika

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető

Prof. Dr. Lengyel Csaba

Prof. Dr. Tamás Gábor

Szeged

2019

### **A tézisek a következő publikációkon alapulnak:**

- I. Csajbók ÉA, Kocsis AK, Faragó N, Kovács B, Lovas S, Molnár G, Likó I, Zvara A, Puskás LG, Patócs A, Tamás G: Expression of GLP-1 receptors in insulin-containing interneurons of rat cerebral cortex. *Diabetologia* 2019 in press, <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4803-z>. IF<sub>2017</sub>: 6.023
- II. Csajbók ÉA, Tamás G: Cerebral cortex: a target and source of insulin? *Diabetologia* 2016 59(8):1609-15. doi: 10.1007/s00125-016-3996-2. IF<sub>2016</sub>: 6.08
- III. Molnár G, Faragó N, Kocsis ÁK, Rózsa M, Lovas S, Boldog E, Báldi R, Csajbók É, Gardi J, Puskás LG, Tamás G: GABAergic Neurogliaform Cells Represent Local Sources of Insulin in the Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience* 2014, 34(4): 1133-1137. doi:10.1523/JNEUROSCI.4082-13. IF<sub>2014</sub>: 6.344

### **A tézisek témáján kívüli válogatott publikációk:**

- Grolmusz, V.K., Borka, K., Kövesdi, A., Németh, K., Balogh, K., Dékány, C., Kiss, A., Szentpéteri, A., Sárman, B., Somogyi, A., Csajbók, É., Valkusz, Z., Tóth, M., Igaz, P., Rác, K., Patócs, A., 2017. MEN1 mutations and potentially MEN1-targeting miRNAs are responsible for menin deficiency in sporadic and MEN1 syndrome-associated primary hyperparathyroidism. *Virchows Arch.* 471, 401–411.
- Orosz, A., Csajbók, É., Czékus, C., Gavallér, H., Magony, S., Valkusz, Z., Várkonyi, T.T., Nemes, A., Baczkó, I., Forster, T., Wittmann, T., Papp, J.G., Varró, A., Lengyel, C., 2015. Increased Short-Term Beat-To-Beat Variability of QT Interval in Patients with Acromegaly. *PLoS One* 10, e0125639.
- Lendvai, N., Tóth, M., Valkusz, Z., Bekő, G., Szücs, N., Csajbók, E., Igaz, P., Kriszt, B., Kovács, B., Rác, K., Patócs, A., 2012. Over-representation of the G12S polymorphism of the SDHD gene in patients with MEN2A syndrome. *Clinics (Sao Paulo)*. 67 Suppl 1, 85–9.
- Csajbók, E., Kalapos, A., Gavallér, H., Wittmann, T., Csanády, M., Forster, T., Nemes, A., 2011. Prognostic significance of aortic stiffness index in acromegaly--results from a 4-year follow-up. *Int. J. Cardiol.* 147, 457–9.
- Nemes, A., Gavallér, H., Csajbók, É., Forster, T., Csanády, M., 2008. Obesity is associated with aortic enlargement and increased stiffness: an echocardiographic study. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* 24, 165–171.
- Nemes, A., Gavallér, H., Csajbók, E., Lengyel, C., Forster, T., Csanády, M., 2007. Does diabetes mellitus facilitate aortic stiffening in acromegaly? *Diabetes Res. Clin. Pract.* 78, e7-8.
- Barzó, P., Vörös, E., Csajbók, E., Veres, R., 2003. Odontoidectomy in the treatment of neurogenic hypertension. Case illustration. *J. Neurosurg.* 99, 934.
- Gálfí, M., Balásipiri, L., Tóth, R., Pávó, I., Csajbók, E., László, F., Morschl, E., Varga, C., László, F.A., 2003. Inhibitory effect of galanin on dopamine induced increased oxytocin secretion in rat neurohypophyseal tissue cultures. *Regul. Pept.* 116, 35–41.

## BEVEZETÉS

A központi idegrendszerben az inzulin 10–100-szor nagyobb koncentrációban van jelen, mint az vérplazmában. Az inzulin szabályozza cukorbetegség, öregedés, elhízás és Alzheimer-kór esetén a mikrohálózatokban bekövetkező metabolikus, molekuláris és kognitív változásokat. Az agyban található inzulin kettős eredetű, mivel mind a hasnyálmirigy, mind a lokálisan szintetizált inzulin jelenlétére van bizonyíték. Az inzulin telíthető transzportrendszeren keresztül áthaladhat a vér-agy gáton, amit egyrészt a cerebrospinalis folyadék perifériás inzulin-infúzió utáni megnövekedett inzulinszintje mutat, másrészt a vérplazma és a cerebrospinalis folyadék egyensúlyi endogén inzulinszintje közötti korreláció is alátámaszt. A központi idegrendszerben történő lokális inzulinszintézist támasztja alá a kísérletesen tapasztalt és a patológiás állapotokban változó agy/vér inzulin arány, valamint azok az in situ hibridizációs és immunocitokémiai vizsgálatok, amelyek a fejlődő és felnőtt neuronokban valamint neuronális progenitor sejtekben inzulint és inzulin mRNS-t detektáltak. Nem világos azonban, hogy a sokféle agyi idegsejt típus közül melyek szintetizálnak, illetve szabadítanak fel inzulint.

A bél L-sejtjei által termelt glükagon-szerű peptid 1 (GLP-1) hatása fontos a vércukor-homeosztázisban, amely számos klasszikus mechanizmuson keresztül érvényesül, ideértve a gyomorkiürülés gátlását, illetve a glükagon szekréciójának csökkentését és az inzulin felszabadulásának elősegítését a hasnyálmirigyben. A vérben keringő GLP-1 direkt hatása a hasnyálmirigy béta-sejtjein található G-fehérjéhez kapcsolt GLP-1 receptorokon glükózfüggő módon következik be, amely ATP-érzékeny  $K^+$  csatornák bezárásához vezet, majd az ezt követő depolarizáció,  $Ca^{2+}$  beáramlás és a sejten belüli  $Ca^{2+}$  raktárakból történő  $Ca^{2+}$ -függő  $Ca^{2+}$  felszabadulás inzulinszekréciót eredményez. Nagy klinikai jelentőséggel bír, hogy a GLP-1 a vércukorszint csökkenését csak postprandialisan idézi elő, amikor a vércukorszint meghaladja az éhgyomri koncentrációt. A glükózfüggő jelleg miatt az intravénásan beadott GLP-1 hipoglikémiában hatástalan, ezért a 2. típusú cukorbetegség jelenlegi kezelésében GLP-1 receptor agonistákat is alkalmaznak.

A keringésbe jutott GLP-1 azonban a hasnyálmirigyen kívül további célpontokon is kifejti hatását. A natív GLP-1 áthalad a vér-agy gáton, és így a perifériából érkező incretinek, beleértve a bél L-sejtjei által termelt GLP-1-et és a 2. típusú diabetes mellitusban receptre felírt GLP-1 analógokat is, hatást fejthetnek ki a GLP-1 receptorokat expresszáló neuronokra a hippocampus és a neocortex területén. Az agyban található neuronok központi idegrendszeri forrásokból származó GLP-1-et is érzékelhetnek azon eredmények alapján, amelyek a GLP-1 expresszióját mutatják az agytörzsben elhelyezkedő nucleus tractus solitarii idegsejtjeiben. Főként patkányokon végzett kísérleteken alapuló bizonyítékok alapján valószínűsíthető, hogy az agykéreg neuronjai is szintetizálnak inzulint. A központi idegrendszerből származó inzulin

hatékonyan szabályozza a szinaptikus és mikrocirkulációs aktivitást a patkány neocortexben, ami felveti annak lehetőségét, hogy az agyi inzulin szabályozhatja a neurális hálózatok energiaigényét.

Az agyba intranazálisan beadott inzulin ígéretes az enyhe kognitív zavar és az Alzheimer-kór terápiájában és a diabetes kezelésében alkalmazott GLP-1-analógok is jótékony hatásúak az Alzheimer-kór korai szakaszában. Az új terápiás stratégiák magukban foglalhatják a GLP-1 agonisták alkalmazását az agykérgi idegsejtek inzulin termelésének modulálására a cukorbetegség, az elhízás és a neurodegeneratív betegségek kezelésére. Ezért fontos lehet, hogy az intesztinális vagy neurális eredetű GLP-1 vagy a terápiásán alkalmazott GLP-1 receptor agonisták hatnak-e az inzulintermelésre képes neuronokon.

## KUTATÁSI CÉLOK

Vizsgálatainkat a következő kérdésekre összpontosítottuk:

1. Mekkora az inzulin mRNS-ek száma az agykéreg különböző sejttypusaiban?
2. Felszabadul az inzulin agykérgi mikrohálózatokban?
3. Előfordulnak GLP-1 receptorok az inzulint tartalmazó neuronokon?
4. Kimutatható a GLP-1 receptorok funkciója az inzulin expresszáló neuronokon?

## ANYAG ÉS MÓDSZER

**Elektrofiziológia és képpalkotás.** Agyszeleteket (350  $\mu\text{m}$ ) készítettünk hím 28-35 napos Wistar patkányok szomatoszenzoros kéregéből. A regisztrátumokat 36 °C-on vettük fel a 1-3 agykérgi rétegben infravörös differenciál interferencia kontraszt videomikroszkópiával megjelenített sejtekből. A mikropipettákat 126 mmol/l K-glükonátot, 4 mmol/l KCl-ot, 10 mmol/l HEPES-t, 10 mmol/l kreatin-foszfátot és 8 mmol/l biocitint (pH 7,25; 300 mOsm) tartalmazó intracelluláris oldattal töltöttünk fel. Az RNS lebomlását RN-áz inhibitorral (1 U/ $\mu\text{l}$ ), akadályoztuk meg. A szeleteket előzetesen 0,5 mmol/l glükózban inkubáltuk 4 órán át, mielőtt hipoglikémiás körülmények között felvettük a regisztrátumokat. Az exendin-3(9-39) (1  $\mu\text{mol/l}$ ) előkezelést 4 órán keresztül alkalmaztuk az adatok felvételét megelőzően hiperglikémiás (10 mmol/l glükóz) körülmények között. A spontán EPSC-k detektálása az Igor Pro NeuroMatic szoftverrel történt, a GABA-erg áramok elkülönítése azok polaritásán alapult. A képpalkotáshoz a neurogliaform sejteket ATP-mentes intracelluláris oldathoz adott 10  $\mu\text{M}$  Alexa594-gyel és 120  $\mu\text{M}$  OGB-1-gyel töltöttük hipoglikémiás extracelluláris oldat alkalmazása mellett, a jelek detektálása Andor Revolution XD rendszerrel történt.

**Szövettan és a neuronok rekonstrukciója.** Az elektrofiziológiai felvételeket követően a szeleteket 4% paraformaldehidet, 15% telített pikrinsavat és 1,25% glutáraldehidet tartalmazó foszfátpufferben (0,1 mol/l, pH 7,4) fixáltuk. Az elektrofiziológiailag vizsgált sejtek belsejében lévő biocitin vizualizálása végett az agyszeletekből 60 µm-es metszeteket készítettünk a standard ABC-reakcióhoz, majd 1% -os uranil-acetátban utófestettük, növekvő etanol-sorozattal dehidratáltuk, végül tárgylemezeken Durcupanba ágyasztuk a metszeteket. A háromdimenziós fénymikroszkópos idegsejt rekonstrukciókat 100x objektív használatával Neurolucida rendszerrel végeztük.

**Egysejt alapú reverz transzkripció, QRT-PCR és digitális PCR.** Az elektrofiziológiai felvételek végén a sejtek beltartalmát a pipettákba szívtuk, miközben a gigaohmos membrán-pipetta kapcsolatot fenntartottuk, majd az elvezető pipetták tartalmát (~1,5 µl) közvetlenül 0,5 µl térfogatú SingleCellProtect oldatba jutattuk, amely megakadályozza nukleinsav degradációt és kompatibilis a reverz transzkripció eljárásával. A minták folyékony nitrogénben fagyasztását követte a reverz transzkripció első lépése, ezt 5 percig 65 °C-on végeztük 5 µl teljes reakciótérfogatban. A reakcióhoz 2 µl, a neuron citoplazmatikus tartalmával kevert SingleCellProtect intracelluláris oldatot, 0,3 µl TaqMan reagenst, 0,3 µl 10 mmol/l dezoxinukleotid-trifoszfátokat (dNTP-eket), 1 µl 5X első szál puffert, 0,3 µl 0,1 mol/l ditiotreitolt, 0,3 µl RN-áz inhibitor és 100 U reverz transzkriptázt (SuperScript III) használtunk. A reakció második lépését 55 °C-on 1 órán át végeztük, majd a reakciót 75 °C-on 15 percig melegítve fejeztük be. Egysejtes QRT-PCR esetén a reakciókat a cDNS 20 µl teljes térfogatban történő preamplifikálása után hajtottuk végre a MyGenie 32 Thermal Block szabványos protokolljaival (5 µl RT termék, 1 µl Taqman primer (*Rps18*: Rn01428913\_gH; *Ins2*: Rn01774648\_g1), 10 µl TaqMan PreAmp Master Mix és 4,5 µl nukleázmentes víz). A digitális PCR analízishez a reverz transzkripció reakcióelegy felét (2,5 µl), 2 µl TaqMan-reagenst, 10 µl OpenArray digitális PCR mesterkeveréket és 5,5 µl nukleáz-mentes vizet elegyítettünk összesen 20 µl térfogatban. Az OpenArray tárgylemez feldolgozását, az OpenArray NT ciklusokat és az adatelemzést szabványos protokollok szerint végeztük.

**Radioimmunoassay.** A sejtek inzulin extrakcióját hidegen végeztük sav-etanol technikával. A minták inzulin tartalmának meghatározásához a radioimmunoassay vizsgálatokat 2 pg/cső érzékenységgel Millipore Sensitive Rat Insulin RIA kitel végeztük. A teljes fehérjetartalom kimutatására Pierce BCA protein assay kitel használtunk.

**Statisztikai analízis.** Az adatokat átlag ± SD értéként adjuk meg. Az adathalmazokat statisztikailag egyszempontos ANOVA, Kruskal–Wallis, Wilcoxon vagy Mann–Whitney U

teszt segítségével SPSS szoftverrel hasonlítottuk össze. A különbségeket  $p < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

## EREDMÉNYEK

### Sejttípusfüggő inzulin mRNA expresszió az agykéregben

Vizsgálataink során először arra kerestük a választ, hogy a patkányban a preproinzulint kódoló *Ins2* gén mRNA-e kifejeződik-e a neokortikális neuronok különböző típusaiban, melyeket teljes sejtes patch clamp módszerrel és korrelált fénymikroszkópos vizsgálatokkal azonosítottunk. A membránparaméterek és tüzelési tulajdonságok alapján történt elektrofiziológiai jellemzést, majd anatómiai sejttípus azonosítást követően a sejtek legyűjtött citoplazmáját egysejt alapú hagyományos preamplifikációs QRT-PCR módszerrel vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a tesztelt 19 neurogliaform sejtől 15-ben *Ins2* mRNA volt detektálható. Annak érdekében, hogy meghatározzuk az agykérgi sejttípusok legyűjtött periszomatikus citoplazmájában jelenlévő *Ins2* mRNA molekulák számát, a digitális PCR-módszert adaptáltuk egyetlen idegsejt vizsgálatára. Nem alkalmaztunk előzetes amplifikációs lépéseket, amelyek csökkentik a megbízhatóságot. Magas extracelluláris glükózkoncentrációban (10 mmol/l), amely általánosan használatos az agyszelet elektrofiziológiában, az egyesével vizsgált neurogliaform sejtek ( $n = 10$ ) nagyobb számú *Ins2* mRNA-t ( $30 \pm 13$ ) tartalmaztak, mint a piramis sejtek ( $7 \pm 2$ ,  $n = 6$ ) és gyorsan tüzelő interneuronok ( $5 \pm 3$ ,  $n = 5$ ,  $p < 0,002$ ). Funkcionális kontrollként csökkentettük a glükózkoncentrációt az agyban a normoglikémiában (2,4 mmol/l) és a hipoglikémiában (0,5 mmol/l) mért szintre. Hiperglikémiához viszonyítva normoglikémiában csökkent az *Ins2* mRNA molekulák száma ( $14 \pm 3$ ) egyetlen neurogliaform sejtben ( $n = 5$ ,  $p < 0,008$ ) és ez sejtenként tovább csökkent hipoglikémiában ( $7 \pm 4$ ;  $n = 5$ ,  $p < 0,04$ ). Ezzel ellentétben a homeosztatisz riboszómális S18 fehérjét kódoló *Rps18* mRNA-ek másolatai hasonló számban voltak jelen a neurogliaform ( $n = 16$ ,  $65 \pm 18$ ), a piramis ( $n = 14$ ,  $63 \pm 26$ ) és a gyorsan tüzelő sejtek esetében ( $n = 15$ ,  $61 \pm 25$ ) függetlenül a külső glükóz koncentrációtól. További kontroll kísérletként gliasejtekben ( $n = 5$  és  $4$ ) is meghatároztuk az *Rps18* ( $26 \pm 6$ ) és az *Ins2* ( $1 \pm 0,8$ ) mRNA-ek számát; mind az *Rps18* ( $p < 0,01$ ), mind az *Ins2* ( $p < 0,04$ ) mRNA-ek kópiaszáma kevesebb volt, mint a tesztelt három neuron típus bármelyikében. A gliasejtekben mért mRNA alacsony kópiaszámok ugyanakkor kizárják a kisméretű sejtekben potenciálisan előforduló DNS szennyezés jelenlétét kísérleteinkben. Megismételtük mind *Rps18*, mind *Ins2* esetén hagyományos és digitális PCR kísérleteinket reverz transzkriptáz reakció nélkül is, de nem találtunk amplifikációt és PCR-termékeket, ami azt jelenti, hogy a genomi DNS-amplifikáció elhanyagolható volt.

## **Inzulin felszabadulás azonosított neuronokból**

Az extracelluláris glükózsint növekedése fiziológiai indítójelként működhet az inzulin felszabadításában az *Ins2* mRNS-eket tartalmazó neurogliaform sejtek számára. E hipotézis teszteléséhez először a kívülről a rendszerbe adott inzulin elektrofiziológiailag mérhető hatásait kerestük az agyszeletekben. Az inzulint extracellulárisan olyan koncentrációban (100 nmol/l) alkalmaztuk, hogy az elektrofiziológiai elvezetések helyénél néhány nanomolos koncentrációt érjünk el, figyelembe véve az extra- és intracelluláris térarányt (0,18) és a szelet belsejébe jutáshoz szükséges ~140 µm-es diffúziót. Az inzulin reverzibilisen csökkentette a spontán EPSC-k gyakoriságát ( $13,0 \pm 9,4$  Hz-ről  $7,3 \pm 5,5$  Hz-re,  $n = 16$ ,  $p < 0,001$ ) és amplitúdóját ( $12,1 \pm 8,13$  pA-ról  $10,1 \pm 6,28$  pA-re,  $n = 15$ ,  $p < 0,005$ ). A neokortikális neuronokon mind a hipoglikémia (0,5 mmol/l), mind a specifikus inzulin receptor antagonistá S961 (20 nmol/l) alkalmazása megakadályozta az inzulin hatását ( $12,2 \pm 8,6$  Hz és  $12,5 \pm 9,47$  pA). Annak eldöntésére, hogy a neurogliaform sejtek utánozzák-e a kívülről bevitt inzulin reverzibilis hatását, hipoglikémiás (0,5 mmol/l) körülmények között lokálisan hiperglikémiás extracelluláris oldatot (10 mmol/l) juttattunk a neurogliaform sejtek sejttestjéhez, miközben a spontán EPSC-k gyakoriságát mértük a neurogliaform sejt közelében elhelyezkedő neuronokon ( $n = 5$  piramisisejten,  $n = 4$  gyorsan tüzelő kosár és  $n = 1$  axo-axonikus sejt), az adatokat összevontuk, mivel nem találtunk különbséget a sejt típusok között). A kontrollhoz viszonyítva a spontán EPSC-k gyakorisága ( $9,0 \pm 8,3$  Hz) a neurogliaform sejtekre lokálisan érkező hiperglikémiás oldat érkezését követően  $2,4 \pm 1,6$  Hz-re csökkent a közelben elhelyezkedő sejteken ( $n = 10$ ,  $p < 0,004$ ). Amikor a neurogliaform sejteken a helyi hiperglikémia előtt S961-et (20 nmol/l) alkalmaztunk, a spontán EPSC-k gyakorisága a környező sejteken változatlan maradt ( $8,7 \pm 2,9$  Hz és  $8,6 \pm 2,2$  Hz,  $n = 7$ ,  $p = 0,47$ ). A lokálisan neurogliaform sejtekre alkalmazott glükóz környező sejteken mért hatása az Y-kináz jelátviteltől függött, mert a szomszédos piramisisejtekben intracellulárisan alkalmazott 5 µM lavendustin megakadályozta a glükóz-indukált spontán EPSC-k frekvencia és amplitúdó csökkenését ( $6,67 \pm 5,84$  Hz vs.  $7,12 \pm 5,76$  Hz,  $n = 5$ ,  $p = 0,78$  és  $12,50 \pm 4,45$  pA vs.  $12,92 \pm 3,16$  pA,  $p = 0,44$ ). Egyidőben végzett páros elvezetések 2/3 rétegi piramisisejtek és posztoszínaptikus piramisisejtek ( $n = 5$ ) vagy posztoszínaptikus gyorsan tüzelő kosársejtek ( $n = 4$ ) között azt mutatták, hogy az inzulin csökkentette az egysejt eredetű EPSC amplitúdóját  $7,18 \pm 5,02$ -ről  $4,61 \pm 3,72$  pA-ra ( $n = 9$ ,  $p < 0,004$ ), de a páros pulzus arány stabil maradt ( $0,82 \pm 0,34$  és  $0,84 \pm 0,36$ ,  $p = 0,97$ ), ami posztoszínaptikus hatásmechanizmusra utal. A fentiek szerint a neurogliaform sejtekre korlátozott helyi hiperglikémia inzulinreceptor által közvetített válaszokat váltott ki a környező mikrohálózatban, ami megegyezett a kívülről bevitt inzulin hatásával.

## **A neurogliaform sejtek inzulinszerű hatását eredményező mechanizmusok**

Korábbi vizsgálatok szerint az ATP-érzékeny kálium csatorna ( $K_{ATP}$ ) blokkoló glibenklamid elősegíti az inzulin expresszióját és felszabadulását, mi pedig megvizsgáltuk a  $K_{ATP}$  csatornák jelenlétét a neurogliaform sejtekben interneuronokon már alkalmazott eljárások segítségével. Hipoglikémiás körülmények között, ahol a  $K_{ATP}$  csatornák csak részlegesen aktívak az alacsony glükózkoncentráció (0,5 mmol/l) miatt, az extracellulárisan adott glibenklamid (20  $\mu$ M) hatására neurogliaform sejtekben ( $n = 8$ ) a  $K_{ATP}$  csatornák áram-feszültség jellemzőinek megfelelő, a kálium-egyensúlyi potenciál közelébe eső fordulási potenciállal ( $-96,6 \pm 2,9$  mV) rendelkező áramokat mértünk. Az extracelluláris glibenklamid (20  $\mu$ M) ezen túlmenően a neurogliaform sejtekben megemelte az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentrációt, amelyet az OGB-1 fluoreszcencia változásai alapján észleltünk 50 másodperces időablakokban 100-150 másodperccel az glibenklamid alkalmazása előtt, illetve után mérve ( $n = 5$ ,  $1,6 \pm 0,4\%$ ,  $\Delta F/F_0$ ,  $p < 0,01$ ). Amikor a glibenklamidot (20  $\mu$ M) hipoglikémiában (0,5 mmol/l) lokálisan a neurogliaform sejtek sejttestjére juttattuk, a spontán EPSC-k gyakorisága a környező piramissejteken ( $n = 5$ ) és a gyorsan tüzelő kosársejteken ( $n = 5$ ) csökkent ( $11,3 \pm 7,3$  Hz-ről  $6,1 \pm 5,3$  Hz-re) és ezt a hatást S961 (20 nmol/l) megfordította ( $n = 11$ ,  $9,2 \pm 6,2$  Hz,  $p < 0,001$ ). Amikor az S961-et glibenklamid előtt alkalmaztuk, a spontán EPSC-k gyakorisága változatlan maradt ( $8,5 \pm 7,8$  Hz, szemben a  $9,7 \pm 10,0$  Hz,  $n = 9$ ,  $p = 0,47$ ). A glibenklamiddal lokálisan kezelt neurogliaform sejtekben intracellulárisan alkalmazott  $Ca^{2+}$ -kelátor BAPTA (4 mmol/l) szintén megakadályozta a spontán EPSC-k gyakoriságának változását ( $7,2 \pm 2,6$  Hz versus  $6,8 \pm 2,7$  Hz,  $n = 9$ ,  $p > 0,30$ ), ami megerősítette, hogy a glibenklamid hatása  $Ca^{2+}$ -függő volt. A neurogliaform sejtek elérhetik a GABAB receptorokat, de a GABAB blokkolás CGP35348-cal (40  $\mu$ M) nem akadályozta meg a glibenklamid szuppresszív hatását a spontán EPSC-k gyakoriságán ( $10,4 \pm 2,8$  Hz,  $8,5 \pm 3,4$  Hz,  $n = 5$ ,  $p < 0,01$ ). Az egysejtes digitális PCR-rel mért alacsony *Ins2* RNS kópiaszámmal összhangban nem észleltünk hatást a környező piramissejtek ( $n = 14$ ) vagy gyorsan tüzelő kosársejtek ( $n = 6$ ) spontán EPSC frekvenciáin, ha a glibenklamid lokális alkalmazását neurogliaform sejtek helyett a piramissejtekre ( $n = 11$ ,  $9,5 \pm 4,5$  Hz, illetve  $9,1 \pm 3,8$  Hz,  $p = 0,76$ ) vagy gyorsan tüzelő kosársejtekre ( $n = 9$ ,  $7,4 \pm 2,8$  Hz, illetve  $7,1 \pm 2,7$  Hz,  $p = 0,65$ ) céloztuk. Ezt követően radioimmunoassay segítségével megmértük a neokortikális agyszeletek inzulintartalmát hipoglikémiás (0,5 mmol/l) körülmények között ( $60,4 \pm 21,7$  pg / mg fehérje,  $n = 10$ ), majd megismételtük a kísérletet extracelluláris glibenklamiddal (20  $\mu$ M) 30 percig kezelt agyszeleteken is, amelyekben megnövekedett inzulinszintet észleltünk ( $80,8 \pm 17,5$  pg / mg fehérje,  $n = 10$ ,  $p < 0,04$ ). A glibenklamid hatására megnövekedett inzulin szintet kizárólag az agyszeletekben helyben szintetizált inzulin emelhetette meg, ugyanis az agyszelet készítési eljárás a véráramtól és a hasnyálmirigy eredetű inzulintól izolálta a preparátumot. Mivel a glibenklamid lokálisan piramis és gyorsan tüzelő interneuronokon



alkalmazva nem, neurogliaform sejtekre juttatva viszont képes volt inzulin receptor által közvetített hatást kialakítani a neuronhálózatban, az agyszeletekben szintetizált inzulin egy részét neurogliaform interneuronok állíthatták elő. Az agykéregben történő inzulinszintézisre további bizonyíték, hogy a normoglikémiás (2,4 mmol/l) és hiperglikémiás (10 mmol/l) glükózt tartalmazó ACSF-ben inkubált agyszeletek megnövekedett inzulin tartalmat mutattak a hipoglikémiához (0,5 mmol/l) viszonyítva ( $75,4 \pm 14,1$  és  $104,2 \pm 26,9$  pg / mg fehérje,  $n = 10$ ,  $p < 0,05$  és  $p < 0,01$ ).

### **A GLP-1 receptorok funkcionális expressziója és kapcsolódó molekuláris jellemzői azonosított neurogliaform sejtekben**

Fenti kísérleteink kimutatták, hogy a neurogliaform sejtekben az *Ins2* gén expressziója változik az extracelluláris glükózkoncentráció függvényében, ami azt jelzi, hogy ezek az agykérgi neuronok molekuláris és funkcionális szempontból hasonlíthatnak a hasnyálmirigy béta-sejtjeire. A GLP-1 receptorok elősegítik az inzulin szekréciót a hasnyálmirigy béta-sejtjein, és ezeknek a receptoroknak az inzulint felszabadító neuronokon való expressziója terápiás jelentőségű lehet. A GLP-1 receptorok expresszióját elektrofiziológiailag és anatómiailag azonosított neurogliaform sejtekben detektáltuk egysejtes digitális PCR ( $n = 11$ ) alkalmazásával, referenciaként az *S18* (más néven *Rps18*) háztartási gént választottuk. Ezen túlmenően hipo- (0,5 mmol/l) és hiperglikémiában (10 mmol/l) összehasonlítottuk a *Glp1r* mRNS kópiaszámát neurogliaform sejtekben és megállapítottuk, hogy a másolatok száma hiperglikémiában 9,6-szeresére nőtt, ha normalizáltuk a háztartási *S18* gén másolatainak számához ( $0,0457 \pm 0,0427$  és  $0,0048 \pm 0,0066$ ;  $p < 0,008$ ).

Ezt követően megkérdeztük, hogy a GLP-1 receptorok és az inzulin együttes kimutatása lehetséges-e ugyanazon neurogliaform sejtekben. Egysejt alapú digitális PCR-módszerünk legfeljebb két gén mRNS kópiaszámának pontos mérését teszi lehetővé, így a háztartási *S18* gént helyettesítettük az *Ins2* génnel a GLP-1 receptor és az inzulin koexpresszió tesztelésére. Hasonlóan a hasnyálmirigy béta-sejtekhez, a neurogliaform sejtek koexpresszálták az *Ins2* és a *Glp1r* gének mRNS-eit. Hiperglikémiában ( $n = 5$ ) a tesztelt neurogliaform sejtek mind az *Ins2* ( $8,60 \pm 3,97$ ), mind a *Glp1r* ( $8,40 \pm 4,47$ ) esetén magasabb mRNS kópiaszámot mutattak, mint a hipoglikémiában vizsgált neurogliaform sejtek ( $n = 5$ ;  $2,60 \pm 1,34$  és  $0,80 \pm 1,30$ ,  $p < 0,037$  és  $p < 0,016$ ). A külső glükózkoncentráció tehát befolyásolja az inzulin és a GLP-1 receptorok együttes expresszióját a neurogliaform sejtekben. Ezek az adatok ugyanakkor megerősítik a neurogliaform sejtekben háztartási génhez normalizált inzulin és GLP-1 receptor expresszióval és annak glükóz modulációjával kapcsolatos fenti eredményeinket.

A GLP-1 receptorok funkcionális expressziójának megerősítése céljából a GLP-1 elektrofiziológiailag és anatómiailag azonosított neurogliaform sejtekre gyakorolt hatását

teszteltük hiperglikémiás extracelluláris glükóz koncentráció alkalmazásával. A teljes sejt konfigurációban végzett patch clamp vizsgálatokban a  $-90$  mV-os tartópotenciálhoz szükséges áram mérése extracelluláris GLP-1 (100 nmol/l) alkalmazása előtt ( $-228 \pm 39$  pA,  $n = 11$ ), alatt ( $-194 \pm 49$  pA,  $n = 11$ ) és után ( $-214 \pm 55$  pA,  $n = 7$ ) kimutatta a tartóáram csökkenését ( $p < 0,003$ ), amely a kimosás után reverzibilis volt ( $p < 0,022$ ). A GLP-1 receptor-specifikus antagonistá exendin-3(9-39) (1  $\mu$ mol/l) előkezelés hatékonyan blokkolta az azonosított neurogliaform sejtek válaszát ( $n = 7$ ) a GLP-1 alkalmazására ( $-171 \pm 39$  pA vs  $-166 \pm 32$  pA;  $p = 0,205$ ), továbbá hipoglikémiás körülmények között a neurogliaform sejtekben ( $n = 6$ ) a GLP-1 alkalmazása során a tartóáram változása nem következett be ( $-201 \pm 59$  pA vs  $-204 \pm 58$  pA;  $p = 0,401$ ). A neurogliaform sejtekben tehát az egysejt alapú digitális PCR által detektált, de a háztartási génhez viszonyítva alacsony mRNS kópiaszámok elegendőek ahhoz, hogy a neurogliaform interneuronokban funkcionális GLP-1 válasz legyen mérhető.

A GLP-1 receptorok és inzulin együttes expressziója a neurogliaform sejtekben potenciálisan szélesebb molekuláris hasonlóságra utalhat a hasnyálmirigy béta-sejtjei és az agykéreg neurogliaform neuronjai között. Korábbi vizsgálatok összefüggésbe is hozták a hasnyálmirigy endokrin sejtjeire és az agyi neuronokra jellemző egyedfejlődési útvonalakat. Ennek nyomán azonosított neurogliaform sejteken ( $n = 5$ ) a béta-sejtek fejlődésében fontos transzkripciós faktorok expresszióját mutattuk ki egysejt alapú digitális PCR-rel hiperglikémiában (*Pdx1*, *Isl1* és *Mafb* kópiaszám *S18*-hoz normalizálva:  $0,0755 \pm 0,0395$ ,  $0,0218 \pm 0,0057$  és  $0,0279 \pm 0,0254$ ). Végül szignifikánsan alacsonyabb normalizált mRNS-számokat detektáltunk a *Pdx1* és az *Isl1* esetén hipoglikémiában ( $n = 5$ ;  $0,0073 \pm 0,0163$ ,  $0,0051 \pm 0,0072$ ;  $p < 0,037$  és  $p < 0,016$ ).

## MEGBESZÉLÉS

### **Inzulin expresszió és felszabadulás az agykéreg interneuronjaiban**

A neurotranszmitterek azonosítására szolgáló tankönyvi módszer szerint a neurogliaform sejtek a kívülről bevitt inzulin reverzibilis hatását produkálják egy olyan anyag felszabadításával, amelyet specifikus receptor antagonistája alapján inzulinként azonosítottunk. Részletesen máig nem ismert, hogy a peptidek miként szabadulnak fel az agykéregi interneuronokból. Kimutatták, hogy a neuropeptid felszabadulás függ a dendritikus  $Ca^{2+}$  koncentráció emelkedésétől, de nem feltétlenül igényel szomatikus hatást. Az inzulin felszabadulásának hiánya szomatikus akciós potenciálok megléte mellett arra utal, hogy szükség lehet a helyi dendritikus elektrogenézisre, valószínűleg válaszul a neurogliaform dendritekre fókuszáltan érkező serkentő bemenetekre. A neurogliaform sejtek akciós

potenciáljai nem csökkentették az spontán EPSC-eket a GABA receptor és az NPY receptor blokkolás során a szomszédos és szinaptikusan kapcsolt sejteken (ezen adatainkat nem mutattuk be). Ugyanakkor a glükózsztint helyi változása élettanilag releváns koncentrációkban vagy a glibenklamid célzott alkalmazása a neurogliaform sejteken akciós potenciálok nélkül is inzulin receptor által közvetített hatás kialakítására volt képes. A glibenklamid ( $4,2 \pm 1,4$  mV,  $n = 5$ ,  $p < 0,02$ ) és a glükóz ( $4,4 \pm 0,6$  mV,  $n = 8$ ,  $p < 0,04$ ) depolarizálta a neurogliaform sejtek szómáját, amely funkcionálisan kompatibilis a  $Ca^{2+}$  bevitellel. Ez arra utal, hogy az agykérgi GABAerg sejtek hozzájárulhatnak a helyi inzulin felszabadulásához olyan körülmények között, amikor a hasnyálmirigy inzulinellátása átmenetileg vagy tartósan nem felel meg a szükségletnek.

### **GLP-1 receptorok jelenléte inzulin expresszáló neuronokban**

Eredményeink igazolják a GLP-1 receptor expresszióját olyan idegsejtekben, amelyekről ismert, hogy az agykéregben inzulint szabadítanak fel. A hiperglikémia növeli a GLP-1 receptorok expresszióját a neurogliaform sejtekben, ami arra utal, hogy az endogén inkretinek és a terápiás GLP-1 receptor agonisták hatással lehetnek ezekre a neuronokra, hasonlóan a hasnyálmirigy beta-sejtjeihez. Emellett olyan transzkripciós faktorokat (*Pdx1*, *Isl1*, *Mafb*) észleltünk a neurogliaform sejtekben, amelyekről ismert, hogy az egyedfejlődés alatt fontosak a béta-sejtek kialakulásában.

A GLP-1-inzulin kölcsönhatás döntő génje, az *Ins2*, szignifikáns eltéréseket mutat különféle agykérgi sejt típusokban hasonló kísérleti körülmények között, ezért a vizsgálatba bevont interneuron típus(ok) azonosítása elengedhetetlen az eredmények megfelelő értelmezéséhez. Kombinált elektrofiziológiai, neuroanatómiai és molekuláris technikáink lehetővé tették számunkra, hogy figyelemmel kísérjük az extracelluláris glükózkoncentráció kísérletesen szabályozott változásaival összefüggő transzkripciós változásokat, és meghatározzuk az mintánkban szereplő valamennyi neuron típusát. Kevés az irodalmi adat azonosított neuronok transzkripciós változásairól a glükózkoncentráció függvényében, de az eredmények egybeesnek a tekintetben, hogy *Ins2* és *Glp1r* mRNS-ek neurononkénti tíz kópiája funkcionálisan mérhető hatású. A funkcionális GLP-1 receptor válasz expressziós küszöbértéke úgy tűnik, hogy magasabb sejtenként kettő kópia *Glp1r* mRNS-nél, amit alacsony külső glükózkoncentráció esetén detektáltunk. Ez arra utal, hogy génchip vagy új generációs szekvenálási technikák által észlelt alacsony expressziós szintekkel rendelkező géneket, amelyek potenciálisan érdekesek az inzulin/inkretin hatásban, funkcionális kísérletekben is érdemes tesztelni.

Az azonosított neurogliaform interneuronokban az *Ins2* és *Glp1r* gének expressziójának együttes modulációja azt sugallja, hogy a GLP-1 által indukált fokozott inzulin felszabadulásra klasszikusan a hasnyálmirigyben leírt mechanizmusok az agyban is

működhetnek. A glibenklamid alkalmazása, amelyről ismert, hogy elősegíti az inzulin felszabadulását a hasnyálmirigy béta-sejtjeiből, sikeresen kiváltotta az inzulin felszabadulását a neurogliaform sejtekből. Bár az endogén inkretinek vagy más GLP-1 receptor agonisták közvetlen hatása a neuronális inzulin felszabadulásában további kísérleteket igényel, a GLP-1 hatás módja és a válaszok polaritása valószínűleg sejtípus-specifikus. A neurogliaform sejtekben a GLP-1-re adott kimenő irányú áramválasz a vizsgálatainkban alkalmazott tartópotenciálon arra utal, hogy a GLP-1 receptorok aktiválása a szomatikus  $K^+$ -csatornák megnyitásához vezet, amelyek valószínűleg GABAB receptorokhoz kapcsolódnak hasonlóan hipotalamusz neuronjaiban GLP-1-re adott válaszhoz. Figyelembe véve a GLP-1 hatását a hippokampális piramissejtekre érkező szinaptikus és tónusos gátló áramok fokozásában, és ismerve az extraszinaptikus GABAA receptor delta alegységek magas expresszióját a neurogliaform sejtek közbenső és távoli dendritjein, nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy eredményeink a disztális dendriteken található GABAA csatornák aktiválódását is tükrözik. A GLP-1 által a neurogliaform sejteken indukált tónusos GABAA áramok összhangban vannak a neurogliaform sejtek szinaptikus és extraszinaptikus gátlásban való részvételével, amit tovább erősíthet az inzulin tónusos gátlást segítő hatása, ami GABAA receptorok sejfelszínre kerülésével valósul meg. Még nem tisztázott, hogy a neurogliaform sejtek fogadnak-e bemenetet az agytörzs GLP-1 felszabadító neuronjaiból; azonban lehetséges, hogy a bélből származó GLP-1 vagy a terápiás GLP-1 receptor agonisták elérik az agykérget a vér-agy gáton keresztül, hasonlóan a natív GLP-1-hez, és módosíthatják a neurogliaform sejtekből az inzulin felszabadítását.

### **A hasnyálmirigy beta-sejtjei és az agykéreg neurogliaform sejtjei**

Az irodalomban felmerült az ontogenetikus útvonalak rokonsága a hasnyálmirigy endokrin sejtjeit és az idegsejteket illetően. A neurogliaform sejtekben tesztelt korlátozott számú transzkripciós faktoron alapuló eredményeink támogatják ezt az elképzelést. A *Pdx1* központi szerepet játszik a hasnyálmirigy egyedfejlődésében és a béta-sejtek progenitor sejtekből történő differenciálódásában. A GLP-1 béta-sejt proliferációra és szekréciós funkcióra gyakorolt hatása függ az inzulin jelátviteli útvonal fehérjéivel való kölcsönhatásoktól és transzkripciós faktorok, mint például a pankreatikus és duodenális homeobox 1 (PDX1), modulációjától. Emiatt a neurogliaform sejtekben meglévő *Glp1r* és *Pdx1* koexpresszió a neurogliaform és a béta-sejtek egyedfejlődésen túlmutató funkcionális homológiáját sugallja. Hasonlóképpen az ISL1 (insulin gene enhancer binding protein, islet factor 1) expressziója ismert a fejlődő hasnyálmirigyből és a központi idegrendszerből. Együtműködésben a BETA2 transzkripciós faktoral, az ISL1 aktiválja az inzulin promótert a béta-sejtekben, elősegíti a hasnyálmirigy-szigetsejtek proliferációját és szükséges a gerincvelőben lévő interneuronok differenciálódásához. A *Mafa* és a *Maifb* gének szerepe a béta-sejtekben döntő

fontosságú az egyedfejlődés során (*Mafb*) és a felnőttkorban (*Mafa* egérben, illetve *MAFA* és *MAFB* emberben). Kísérleteink neurogliaform sejtekben megerősítik a MAFB széles körben elterjedt expresszióját, amelyet korábban a fejlődő és differenciált neokortikális interneuronokban mutattak ki. Eredményeink arra utalnak, hogy az agykéreg inzulint és GLP-1 receptort expresszáló neurogliaform interneuronjai részben rendelkeznek az inzulin-szintetizáló hasnyálmirigy béta sejtek fejlődésében szerepet játszó transzkripcióeszközkészlettel.

### **Neuronból származó inzulin alapú terápia**

Kísérletünk alapján a glibenklamid hatékony a neuronokból történő inzulin felszabadításban, ezért a hasnyálmirigy béta-sejtjeiből inzulin felszabadulását elősegítő anyagok agyba juttatása a terápiásan is fontos lehet. Az Alzheimer-kór által érintett kulcsfontosságú területeken, például a hippocampusban és a neocortexben egy még nem tesztelt terápiás stratégia lehet az az inzulin felszabadulásának fokozása idegsejtekből vagy az inzulint lokálisan expresszáló neuronális progenitorokból. A szulfonilureák mellett az inkretinek több okból is a tesztelendő molekulák ígéretes csoportját képviselhetik. A hippocampus és a neocortex neuronjaiban expresszálódnak a GLP-1 receptorok, kísérleteink pedig kimutatták a GLP-1 receptorok expresszióját inzulin expresszáló neuronokon. Érdekes módon a GLP-1 agonisták hatása az inzulinéhoz hasonló a tónusos gátló GABAerg áramokra, ami hipotetikusán GLP-1 receptor által közvetített inzulin felszabadulásra utal. Az agytörzsben GLP-1 termelődik, ezért a központi idegrendszerben szintetizált GLP-1 a vázolt mechanizmusokon keresztül hatékony lehet az agyi inzulin szintézisben. Azonban a bél L-sejtjei által termelt GLP-1 áthalad a vér-agy gáton, így a perifériából érkező inkretinek is fokozhatják agyi neuronokból az inzulin felszabadulást. Kiemelendő, hogy ezek közé a perifériás inkretinek közé tartoznak a 2. típusú diabetes mellitusban receptre felírt GLP-1 analógok is. Felvetjük, hogy a GLP-1 receptor analóg alapú terápia által okozott testsúlycsökkenés (amely elsősorban a gyomorürítés gátlásának tulajdonítható) további szinergikus komponenst tartalmazhat az agy neuronjaiból származó GLP-1 receptor által közvetített inzulin felszabaduláson keresztül. Képzelt vizsgálatok szerint ugyanis a prefrontális kéreg fontos az emberi táplálékfelvétel gátló szabályozásában és emberi agyszelet kísérletek kimutatták, hogy a neurogliaform sejtek széles körben gátolják a prefrontális mikrohálózatokat. A GABAerg interneuron szubpopulációk szelektív részvétele valószínűsíthető neurodegeneratív betegségekben is. Tekintettel arra, hogy a GLP-1 receptor agonisták a traumatikus agykárosodás, az Alzheimer-kór és a Parkinson-kór modelljeiben a neurodegeneráció elleni terápiában hatékonyak lehetnek, a GLP-1 receptor által közvetített inzulinszintézis forgatókönyve kiterjeszhető az említett betegségek terápiájára.

A bizonyíték az agyi inzulin szintézisre felveti azt a kérdést, hogy az agyból származó inzulint használhatjuk-e az 1. típusú diabéteszben a perifériás inzulin helyettesítésére. Az agyban szintetizált inzulin nem valószínű, hogy áthalad a vér-agy gáton az agy-vér irányban a plazma glükózkoncentrációjának euglikémiás szabályozásához szükséges mennyiségben, az intranazális inzulinadagolás ugyanis nem növeli a plazma inzulinszintjét. Egy alternatív megközelítés az inzulin-expresszálo neuronok vagy neurális progenitor sejtek autológ graftjait használhatja az elvesztett hasnyálmirigy béta-sejtek helyettesítésére. A cukorbetegség neuron- vagy neurális őssejt-alapú terápiája olyan kísérleteken alapulhat, amelyeket felnőtt agyból izolált, a béta-sejteket funkcionálisan helyettesítő neurális őssejtekkel végeztek. A gyrus dentatus vagy a szaglógumó inzulint expresszálo neurális őssejtjeit transzplantálták közvetlenül diabéteszes patkányok hasnyálmirigyébe, ahol a hasnyálmirigy niche a neuronális őssejteket Wnt szignalizáció útján átprogramozza az inzulin expresszálására. Az 1. és a 2. típusú cukorbetegség állatmodelljeiben (streptozotocin indukált, illetve Goto–Kakizaki patkány) az átültetett őssejtsejtek túléltek, hosszú ideig inzulint termeltek és drasztikusan csökkentették a vércukorszintet. E módszer emberi cukorbetegségre alkalmazásának terápiás jelentősége jelentős, mert nincs szükség genetikai manipulációra, és az eljárás megkerüli a daganatképző pluripotens őssejteket és a krónikus immunszuppresszióval kapcsolatos aggályokat.

## **ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK**

Az inzulin hatása nem korlátozódik a perifériás szervekre. A periférián leírt inzulinreceptorok és jelátviteli útvonalak a központi idegrendszer számos funkciójában részt vesznek. Általánosan elfogadott, hogy a hasnyálmirigy béta-sejtjei által fiziológias körülmények között előállított vagy az Alzheimer-kórban terápiás céllal alkalmazott intranazális inzulin eléri az agykéreg idegsejtjeit. A perifériás inzulin lassan jut el az agyban található neuronok közelébe, összhangban a idegi hálózatok hosszú távú homeosztatis szabályozásával. A közelmúltban végzett munka megmutatta, hogy az agykéregben is szintetizálódik inzulin. A neuronból származó inzulin képes a szinaptikus és mikrohalozati mechanizmusok gyors modulálására és feltevésünk szerint szabalyozza az idegi hálózatok metabolikus igény szerinti energia homeosztázisát. Eredményeink igazolják a GLP-1 receptorok funkcionális expresszióját olyan agykérgi idegsejtekben, amelyek inzulint szabadítanak fel. A hiperglikémia növeli a GLP-1 receptorok expresszióját ezekben a neurogliaform sejtekben, ami arra utal, hogy az endogén inkretinek és a terápiás GLP-1 receptor agonisták hasonló hatással lehetnek ezekre a neuronokra, mint a hasnyálmirigy béta-sejtjeire. Javaslatunk szerint érdemes olyan új terápiás

stratégiákat megfontolni, amelyek a GLP-1 agonistákon keresztül az agyban modulálják az idegsejtek inzulintermelését cukorbetegség, elhízás neurodegeneratív betegségek esetén.

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Köszönöm Molnár Gábor, Furdan Szabina, Kovács Balázs, Rózsa Márton és Lovas Sándor segítségét a patch clamp kísérletek kivitelezésében. Köszönöm Faragó Nóra, Kocsis, Á. Katalin, Zvara Ágnes és Puskás László segítségét a szekvenálási, QRT- és digitális PCR kísérletekkel kapcsolatban, Likó István és Patócs Attila segítségét a molekuláris adatok elemzésében, Boldog Eszter és Báldi Rita szerepét a neuronális rekonstrukciók kivitelezésében. Köszönöm Gardi Jánosnak a radioimmunoassay mérések kivitelezését, Tóth Évának, Várady Margitnak és Tóth Nelinek az asszisztenciát, valamint Lengyel Csabának és Tamás Gábornak a kísérletek tervezésében, az eredmények interpretálásában és a kéziratok kritikus szerkesztésében nyújtott segítségét.

## Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott Dr. Tamás Gábor (felelős társszerző) kijelentem, hogy Dr. Csajbók Éva (pályázó) PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - közösen publikált - tudományos eredmények elérésében a pályázónak meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

2019. február 13.

dátum

*Dr. Tamás Gábor*  
.....

szerző

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemények:

Molnár G, Faragó N, Kocsis ÁK, Rózsa M, Lovas S, Boldog E, Báldi R, Csajbók É, Gardi J, Puskás LG, Tamás G: GABAergic Neurogliaform Cells Represent Local Sources of Insulin in the Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience* 2014, 34(4): 1133-1137. doi:10.1523/JNEUROSCI.4082-13