

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar

Biológiai Intézet, Ökológia Tanszék

**A disztrofin-glikoprotein komplex komponenseinek vizsgálata gerinces
taxonok központi idegrendszerében**

Készítette: Sebők Olivér Marcell

Témavezető: Prof. Dr. Kálmán Mihály

Egyetemi tanár

Semmelweis Egyetem; Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet



Budapest

2014

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1. <i>Taxonómia</i>	3
2.2. <i>A vér-agy gát</i>	5
2.3. <i>Disztrofin-glikoprotein komplex</i>	7
3. Anyag és módszer	9
3.1. <i>Az állatok beszerzése</i>	9
3.2. <i>Az állatok előkészítése és az agyak kioperálása</i>	9
3.3. <i>A minták feldolgozása</i>	10
3.4. <i>Kiértékelés</i>	12
3.5. <i>Elektronmikroszkópia</i>	12
3.6. <i>Western-blot</i>	13
4. Eredmények	14
4.1. <i>Immunhisztokémia</i>	14
4.2. <i>Elektronmikroszkópia</i>	16
4.3. <i>Western blot</i>	17
5. Megbeszélés	19
6. Összefoglalás	20
7. Summary	21
8. Mellékletek	22
9. Irodalomjegyzék	33
10. Köszönetnyilvánítás	35

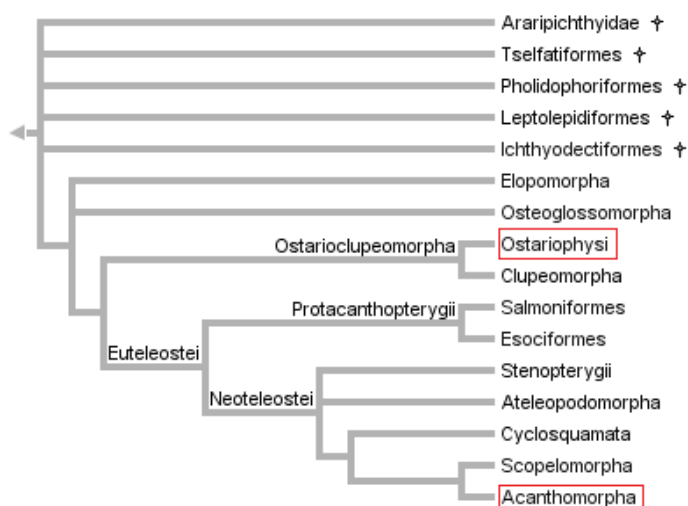
1. Bevezetés

Annak ellenére, hogy a sugarasúszójúak rendelkeznek a legnagyobb diverzitással és egyedszámmal a gerinces taxonok közül, kutatottságuk relatíve alulmarad a madarakhoz és az emlősökhöz képest. A szakdolgozat eredetileg a sugarasúszójú halak, különösen a pontyfélék gliaszerkezetének vizsgálatára irányult. Az agyszövetben megjelenő GFAP (gliális savanyú fehérje - intermedier filamentum) mintázat és a vér-agy gát fehérjéinek kimutatása által a perivaszkuláris glia eloszlásának feltérképezése volt a cél. A sugarasúszójúak perivaszkuláris gliája morfológiailag erősen eltér a más gerincesekben megfigyeltektől, ebben az esetben ugyanis a gliasejtek nem végtalpaikkal ölelik körül az ereket, hanem nyúlványaik párhuzamosan futnak az érpályákkal [1]. Az egyes vizsgálatok elvégzése után kapott eredmények azt mutatták, hogy a gliovaszkuláris kapcsolat komponenseit nem tudjuk kimutatni a csontoshalakban immunhisztokémiával, ugyanakkor porcos halakban ez sikerült [2]. Felmerült a kérdés, hogy a hiány valódi, vagy csak az általunk használt módszerek nem elég érzékenyek. A tapasztaltakból kiindulva bővítettük a vizsgálandó állatok körét a többi gerinces osztályból. Az összehasonlítás alapjául az emlősökben megfigyelhető képet vettük alapul. A komparatív vizsgálatok alapján rámutathatunk evolúciós változásokra.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Taxonómia

Jelenlegi tudásunk szerint a sugarasúszójú halak (Actinopterygii) a ma élő összes négy lábú gerinces testvércsoportjának tekinthető, mivel az utóbbiak az izmosúszójú halak (Sarcopterygii) leszármazottai. A sugarasúszójúak a Devonban bontakoztak ki. A jelenlegi csoportok ősei is ekkor alakultak ki, az uralkodó formák azonban a páncélos őshalak (Placodermi) és a porcos halak (Chondrichthyes) voltak [3]. A valódi csontos halak (Teleostei) a Perm-ben jelentek meg és a mezozoikumban kialakult a legtöbb jelen élő csoport és rendkívüli változatosságra tettek szert, mind tengeri, mind édesvízi környezetben (1. ábra). A jelenkori nagy diverzitás főként az Acanthopterygii öregrendbe tartozó taxonok kainozoikumi adaptív radiációja során keletkezett [4]. Az Actinopterygii osztályon belül a valódi csontos halak közül két öregrend (az Ostariophysii és az Acanthopterygii) három rendjéből vizsgáltunk halfajokat, melyeket az összesített fajlistán lehet megtekinteni (1. táblázat). Az általunk vizsgált pontyalakúak és a harcsaalakúak egymás közelebbi rokonai, míg a sügéralakúak az evolúciósan legújabb vonalat képviselik a sugarasúszójúak világában.



1. ábra: Teleostei törzsfa. A vizsgált csoportok pirossal kiemelve. Tree of Life Web Project alapján [5].

A kétéltűek állnak legközelebb az izmosúszójú halakhoz, ezt bizonyítják a fosszilis adatok. A Devonban alakultak ki és hatalmas evolúciós lépésként meghódították a part menti élőhelyeket, ezáltal utat nyitva a gerincesek szárazföldi elterjedésének. Recens három rendjük, a farkos kétéltűek (Caudata), a békák (Anura) és a lábatlan kétéltűek (Gymnophiona), a mezozoikum első felében terjedtek el. Fontos megjegyezni, hogy a ma élő kétéltűek (Lissamphibia) nem tartoznak az Amniota evolúciós vonalba, hanem oldalágként szerepelnek a törzsfán [6]. Az Anura és a Caudata rendből egyaránt két-két fajt választottunk, a Gymnophiona taxon nem szerepel jelen vizsgálatban. A farkos kétéltűek közül a spanyol bordás gőtére és a mexikói axolotlra esett a választás, mivel könnyen beszerezhetőek és taxonómiaailag is viszonylag távol állnak egymástól, hiszen az előbbi a szalamandrafélék, míg az utóbbi a harántfogúgöte-félék családjába tartozik. A békák rendjét az afrikai eredetű törpe karmosbéka és a hazánkban is honos hibrid, a kecskebéka képviselte a vizsgálatban. A karmosbékák a pipabékafélék (Pipidae) családjába tartoznak, ősi formának számítanak (Mesobatrachia alrend). A kecskebéka a valódi békafélék (Ranidae) közé sorolható, a kis tavibéka (*Pelophylax lessonae*) és a kacagóbéka (*Pelophylax ridibundus*) nászából létrejött fertilis hibrid faj (Neobatrachia alrend).

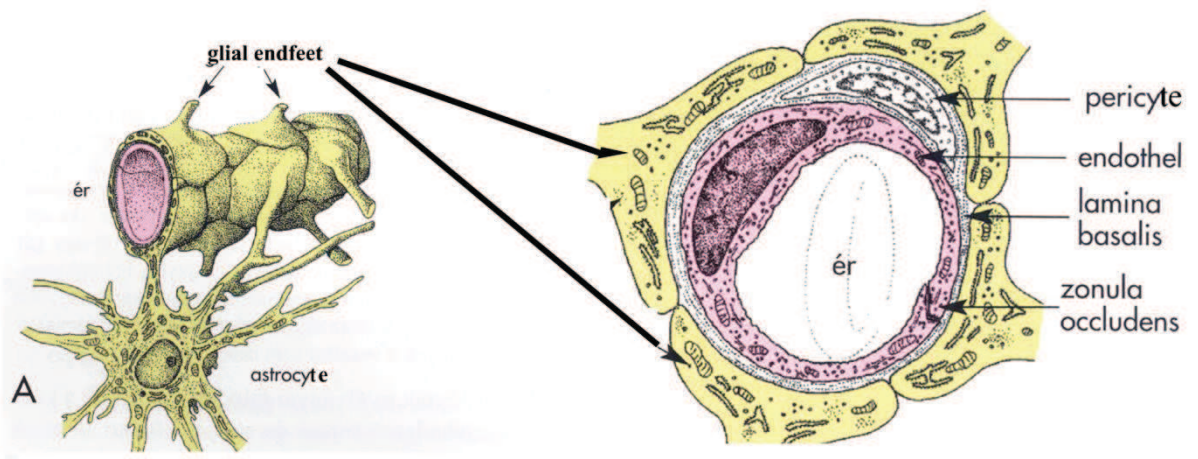
A magzatburkosok (Amniota) közül a Diapsida csoport recens formáit tekintve is igen változatos, a paleontológiából ismert csoportokról nem is beszélve. A Synapsida ma élő képviselői az emlősök. Figyelembe véve a teknősök új taxonómiai besorolását, az Anapsida képviselői eltűntek az élővilágból. Egyes szerzők szerint a teknősök a Lepidosauriával, tehát a gyíkok rokonságával alkot, mások szerint inkább az alapi Archosauriákhoz állnak közelebb, mindenesetre beleillenek a Diapsida rokonságba [7,8]. Ez az írás nem kíván taxonómiai vitát nyitni, elfogadja a teknősök Diapsida származását. A ma élő hüllők közül a Lepidosauria öregrend pikkelyes hüllői (Squamata) kerültek be a vizsgálatba, ezen belül a gekkófélék, a kaméleonfélék, valamint a kígyók két családjából választottunk állatokat. A madarak osztálya a Diapsida-Archosauria fejlődési vonalba tartozik [9].

1. táblázat: Vizsgált fajok. a) Amniota; b) Diapsida; c) Synapsida.

Osztály (Classis)	Rend (Ordo)	Család (Familia)	Faj - Species
Actinopterygii	Pontyalakúak (Cypriniformes)	Pontyfélék	ponyt - <i>Cyprinus carpio</i>
		Cyprinidae	aranyhal - <i>Carassius auratus auratus</i>
	Harcsaalakúak (Siluriformes)	Törpeharcsafélék	törpeharcsa - <i>Ameiurus nebulosus</i>
		Ictaluridae	
		Bölcsőszájúhal-félék	zebrasávós sügér - <i>Amatitlania nigrofasciata</i>
Sügéralakúak (Perciformes)	Cyclidae	Lombard sügér - <i>Maylandia lombardoi</i>	
		Red Jacob sügér - <i>Aulonocara jacobfreibergeri</i>	
Amphibia	Farkos kétéltűek (Caudata)	Szalamandrafélék	spanyol bordás göte - <i>Pleurodeles waltl</i>
		Salamandridae	
		Harántfogúgöte-félék	axolotl - <i>Ambystoma mexicanum</i>
	Békák (Anura)	Ambystomatidae	
		Valódi békafélék	kecskebéka - <i>Pelophylax kl. esculentus</i>
	Ranidae		
	Pipabékafélék	törpe karmosbéka - <i>Hymenochirus curtipes</i>	
	Pipidae		
Reptília ^a	Teknősök (Testudines) ^b	Mocsáriteknős-félék	vörösfülű ékszerteknős - <i>Trachemys scripta elegans</i>
		Emydidae	sárgafülű ékszerteknős - <i>Trachemys scripta scripta</i>
	Pikkelyes hüllők (Squamata) ^b	Gekkfélék	leopárdgekkó - <i>Eublepharis macularius</i>
		Gekkonidae	Standing-nappaligekkó - <i>Phelsuma standingi</i>
		Kaméleonfélék	sisakos kaméleon - <i>Chamaeleo calypttratus</i>
		Chamaeleonidae	párduckaméleon - <i>Furcifer pardalis</i>
		Pitonfélék	királypiton - <i>Python regius</i>
		Pythonidae	
		Siklófélék	tajvani sávofarkú sikló - <i>Orthriophis taeniurus friesei</i>
		Colubridae	
Aves ^{a,b}	Galambalakúak (Columbiformes)	Galambfélék	postagalamb - <i>Columba livia domestica</i>
		Columbidae	
Mammalia ^{a,c}	Rágcsálók (Rodentia)	Egérfélék	vándorpatkány - <i>Rattus norvegicus</i>
		Muridae	

2.2. A vér-agy gát

A központi idegrendszer jellemzője, hogy a vértől és a szövetközi folyadéktól egy határfelület választja el, amelynek funkciója, többek között, az idegsejtek megfelelő működéséhez szükséges ionegyensúly megteremtése. Ezt a dinamikus barriert különböző típusú sejtek alakítják ki. Már az állkapocsnélkülieknél (nyálkahalak - Myxiniformes) megjelenik a háromrétegű vér-agy gát (2. ábra). A gerincesek többségénél a vérerek endothel sejtjei között létrejövő szoros zárókapcsolatok (zonula occludens) hozzák létre a gátat, míg a lemezeskopoltyús porcos halakban (Elasmobranchii) ezt a funkciót a perivascularis gliasejtek látják el [1, 10].



2. ábra: A vér-agy gát szerkezete emlősökbenben. Jól látható, ahogyan a gliasejtek végtalpai körbefonják az erek falát. Az érfal és a gliasejt által létrehozott közös bazális laminába periciták ágyazódnak [11].

A gliasejtek feladata sem elhanyagolható, mivel végtalpaikkal az ereket teljes hosszukban beburkolják, ezáltal második szigetelőréteggént funkcionálnak az anyagtranszport szempontjából. A vér-agy gát harmadik komponense a két sejtréteg között elhelyezkedő lamina basalis, amely áll egy astrogliális és endotheliális eredetű rétegből, melyek összetapadhatnak. A vér-agy gát kialakulására indukáló hatással bírnak az asztrociták [1, 10]. Megjegyzendő, hogy egyes agyterületeken, a plexus choroideusban és az ún. circumventricularis szervekben (pl. eminentia mediana) a vér-agy gát nyitott, illetve zárt a subcommissuralis szervben [10].

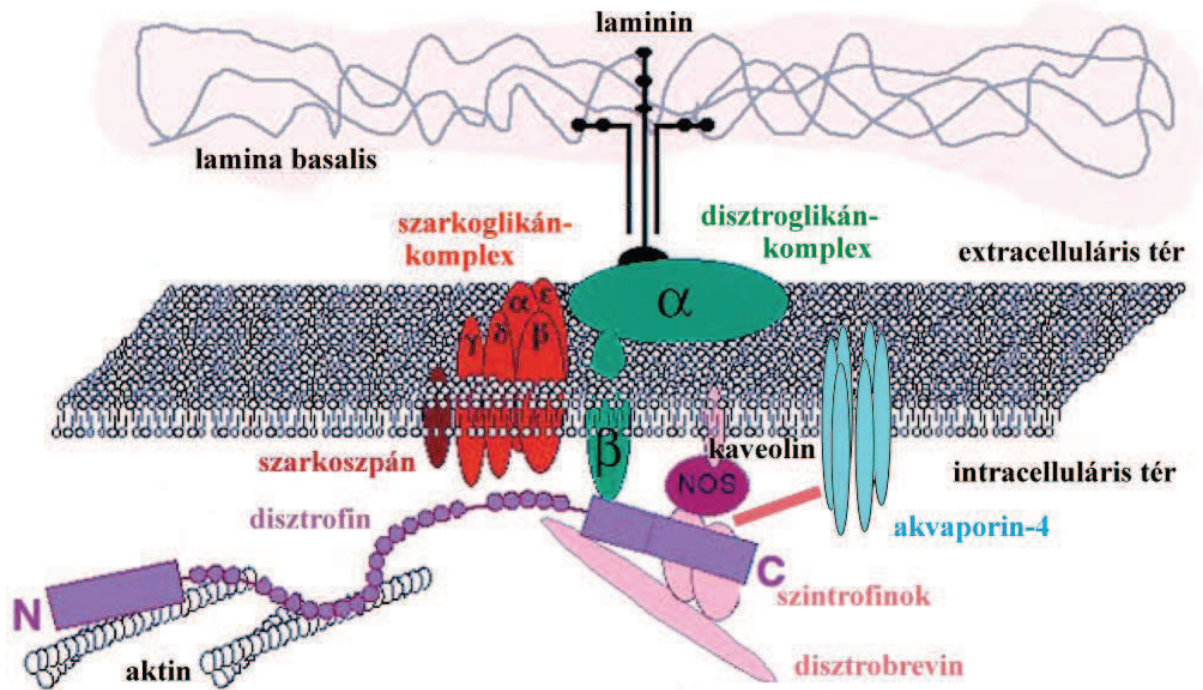
Fontos kihangsúlyozni az agyi hajszálereket alkotó endothel sejtek speciális tulajdonságait, mégpedig a rendkívül alacsony permeabilitást és transzcelluláris transzport aktivitást (1/100, mint máshol), valamint a magas elektromos ellenállást. Ezen tulajdonságok mind a gát funkció megfelelő betöltésének érdekében jöttek létre, ezek alapjául pedig a már említett tight junction típusú sejtkapcsolat szolgál. A zárókapcsolatok szorosságát több módon is képes szabályozni a szervezet, példának okáért a NO* és a cGMP fokozzák, míg a cAMP csökkenti a permeabilitást. Mivel a passzív áramlás erősen korlátozott az endothel sejteken keresztül, ezért speciális transzporterek szükségesek a megfelelő anyagáramlás biztosításához. Ennek értelmében az endothel sejt luminális és alaphártya felőli felszínén található transzportegységek különböznek. A luminális oldalon a tápanyagok agyszövetbe

juttatásáért felelős szállítófehérjék és a felesleges, valamint potenciálisan károsító hatású vegyületek eltávolításáért felelős pumpák expresszálnak (pl. P-glikoprotein, Multidrog-rezisztencia proteinek). Más efflux pumpák, többek között, a neurotranszmitterek, a glutamát, a szerves savak vérpályába való juttatásáért felelősek [1, 10].

Az asztrociták végtalpainak alaphártyával érintkező részén membránba ágyazott vízcsatornák, úgynevezett akvaporinok (Aqp) találhatóak [12-14]. Ezen csatornák több típusát ismerjük, szervenként eltérő van jelen. Az asztrocitákra jellemző a 4-es típusú változat, de a sejtesteken előfordul Aqp-9 is [15, 16]. Szakirodalom alapján elmondhatjuk, hogy az Aqp-4 szerves velejárója a vér-agy gát kialakulásának [10]. Jellemző elrendezésük a fagyasztva töréses elektronmikroszkópos technika alkalmazásakor megfigyelhető ún. OAP (orthogonal array of particles), amelyben stabil tetramer komplexet képeznek [17, 18].

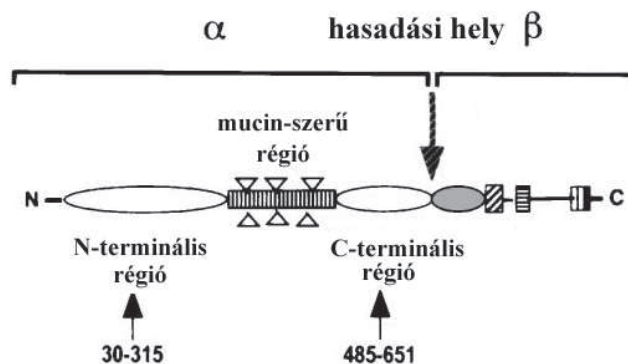
2.3. *Disztrofin-glikoprotein komplex*

A disztrofin-glikoprotein komplex (DGC), az integrinek mellett, az egyik legfontosabb sejt-extracelluláris mártix (ECM) kapcsoló struktúra. Számos fehérje alkotja, amelyek raftba rendeződve foglalnak helyet (3. ábra). Intracellulárisan a névadó komponens, a disztrofin, a disztrobrevin (Dbr) és a szintrofin helyezkednek el. A disztrofin N-terminálisa rögzíti a komplexet a citoskeletális F-aktin kötegekhez, C-terminális felőli része pedig a komplex többi összetevőjével kapcsolódik, így a disztrobrevinnel és a szintrofinokkal, valamint cisztein-gazdag része a disztroglikánnal. A disztrobrevin és a szintrofin felelősek a raft éppen adott funkciójának betöltéséért felelős membránfehérjék, mint például a nikotinos acetilkolin receptorok, illetőleg az Aqp-4 molekulák klaszteres elrendezéséért, továbbá stabilizálják a komplexet [1, 10]. A disztrobrevinnek eddig három izoformája ismeretes, az α , a β és a γ , melyek közül a γ csak sugarasúszójukban található meg. A γ izoforma két exonnal kevesebbet tartalmaz, mint a β izoforma, ezen felül szekvenciájukban viszont közel azonosak [19].



3. ábra: A disztroglikán-komplex felépítése. Az ábrán látható a disztroglikán transzmembrán β , illetve extracelluláris α alegysége, valamint az általunk vizsgált Aqp-4 OAP elrendeződése és a disztrobrevin az intracelluláris része. Sweeney és Barton alapján [20].

A disztroglikán fehérjét a DAG1 gén kódolja, amely által kódolt protein poszt-transzlációs hasítással két alegységre válik szét (4. ábra). Béta alegysége (43 kDa) transzmembrán protein lévén rögzíti az extracelluláris és intracelluláris komponenseket a sejtmembránhoz. Az α -disztroglikán (156 kDa) bazális lamina molekulák receptora, így például kapcsolatot létesít a perlekánnal, az agrinnal és a lamininek közül kihangsúlyozva, a Lam- α 2-vel [1, 10].



4. ábra: A DAG1 génről keletkező polipeptid. Zaccaria et al. 1995 [21]

Agyi erekben a DGC az asztrociták végtalpában van jelen, de természetesen más szövetekben is előfordul, sőt kiemelkedő szerepe van az izomrostok megfelelő szerkezetének kialakításában [22]. Érdekességképpen az endothelben integrin típusú ECM receptorok találhatóak, ráadásul más laminineket képesek megkötni, konkrétan a Lam-8-at és a Lam-10-et [1, 10].

3. Anyag és módszer

3.1. Az állatok beszerzése

A felhasznált állatok nagy részét állatkereskedésből vagy magánszemélyektől vásároltuk, így az összes hüllőt, a kétéltűek egy részét és a sүgéreket is. A pontyokat és a harcsákat a központi Vásárcsarnokból szereztük be. A kecskebékákat a Debreceni Egyetemről szereztük be, a postagalambokat pedig saját tenyészetből. A patkányokat a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetének állatháza biztosította.

3.2. Az állatok előkészítése és az agyak kioperálása

A felhasznált állatokat a leölés előtt parenterálisan, a hátsó végtag vagy a testfal izomzatába adott injekcióval altattuk el. Az állatok agyának fixálása során kezdetben két módon jártunk el, immerziós vagy perfúziós módszerrel. Immerziós módszer alkalmazásakor a mélyaltatásban lévő állatokat dekapitáltuk, majd a koponyatető eltávolításával és az agyidegek átvágása után az agyukat óvatosan kiemeltük, úgy, hogy a gerincvelő kezdeti szakasza is kivételre kerüljön. Az eltávolított agyat 4%-os paraformaldehidet tartalmazó műanyag edényekben tároltuk 4°C-on. Perfúziós fixálás esetén az állatok testüregét felnyitottuk és a szívkamrába vezetett kanülön keresztül először fiziológiás izotóniás sóoldattal, majd 4%-os paraformaldehiddel átmostuk a keringési rendszerükön keresztül az állatokat. Az agy kioperálása megegyezik az előzőekben ismertetett folyamattal. Az állatokból izommintákat is vettünk, erre általában a jól körülírható végtag-, vagy testfal-izmok szolgáltak. Az izmokban szintén megvizsgáltuk a DGC komponenseit, hogy kimutathatóak-e egy másik, jellegzetes előfordulási helyén. A műveletek során az altató, illetve a fiziológiás sóoldat és a formalin mennyiségét az állatok testméretétől függően

határoztuk meg. Az agyakat minden esetben legalább további két napon keresztül 4%-os paraformaldehidben utófixáltuk. A western blotra szánt mintákatat fixálás nélkül, folyékony nitrogénnel lefagyasztottuk, majd felhasználásig -80°C -on tároltuk.

3.3. A minták feldolgozása

Alapos fixálás után az egyes agyakat 4-5 %-os agarba ágyazva $70\ \mu\text{m}$ vékony metszetekre szeleteltük szagittális síkban, Vibratome-mal az immunhisztokémiai festéshez. A pontyfélék esetében $100\ \mu\text{m}$ -es szeletek készítésére is sor került a lobus nervi vagi területéről, amelyeket elektronmikroszkópos vizsgálat alá vetettünk. A szeleteket penicillines üvegekben tároltuk foszfát puffer (PBS, Sigma, $0,01\ \text{M}$) kíséretében a felhasználás idejéig, $4\ ^{\circ}\text{C}$ -on. Minden agyterületről válogatásra kerültek szeletek, amelyeket másfél órán keresztül 20%-os normál kecskesavóban inkubáltunk (disztrobrevin esetén normál lósavó). Erre a lépésre a nem-specifikus kötőhelyek telítésének érdekében van szükség. A blokkolási fázis után fél órán keresztül PBS-es öblítéssel eltávolítottuk a felesleges savót.

A primer ellenanyagok applikálása előtt a puffert azidos $0,05\%$ -os Triton X-100-at tartalmazó PBS-re cseréltük le. A triton detergensként fellazítja a szöveteket, az azid konzervál. A primer ellenanyagokat saját tapasztalat, valamint a gyártó ajánlott hígítási tartományát figyelembe véve mértük a szeletekhez. A használt primer ellenanyagok részletes információkkal megtekinthetőek (2. táblázat). Az inkubáció ebben az esetben megközelítőleg 48 órán keresztül tartott $4\ ^{\circ}\text{C}$ -on, hogy biztosítsuk az ellenanyagok megfelelő reakcióját. A primer antitesttel való inkubálás után újabb mosás PBS-ben, majd a szekunder ellenanyag festési eljárás szerinti kiválasztása és a szeletekre applikálása következett (3. táblázat). Kétféle immunhisztokémiai festést alkalmaztunk, fluorescens és peroxidáz alapú módszert. A fluoreszcens módszer lényege, hogy a szekunder ellenanyag (immunglobulin-G) Fc részén meghatározott hullámhosszon történő besugárzásra fluoreszkáló molekula található. A fluoreszcencia speciális mikroszkóppal tekinthető meg és kettős jelzés is kivitelezhető vele, viszont természetes fényen is igen hamar kifakul, ezért sötét helyen, hidegen tárolandó. A szekunder antitestek felhelyezése és a metszetek készítése ezen módszer esetén a következők: 3 órán keresztül PBS-ben hígított szekunder oldatban ázás, majd PBS mosás további egy órán keresztül. Az inkubáció

lehetőleg sötétben történjen, a fluoreszcens tag ugyanis veszít hatékonyságából fényexpozíció hatására. A metszetek felhúzása Petri-csészében történik, desztillált vízben. A tárgylemezre pár csepp 50%-os glicerint helyezünk Pasteur-pipettával, majd a fedőlemezrel óvatosan lefedjük, a metszet széleit lelakozzuk és sötét, hideg helyre helyezzük.

2. táblázat: A vizsgálat során használt primer ellenanyagok. A jelölések a következők: * monoklonális; ** ploklonális.

Antitest	Faj	Gyártó	Hígítás
anti- β -disztroglikán	egér *	Novocastra	1:100
anti-akvaporin-4	nyúl *	Sigma	1:200
anti-disztrobrevin	kecske **	Santa Cruz	1:100
anti-GFAP	nyúl **	Dako	1:100

A másik módszer a szintén általánosan használt peroxidáz-szubsztrát színreakció elvén alapul. Az általunk használt változatban a szekunder IgG Fc végén avidin segítségével biotinhoz kötött tormaperoxidáz (HRP) a DAB (3,3'-diaminobenzidin) szubsztrátot H₂O₂ jelenlétében oxidálja, ezáltal színreakció jön létre. Előnye, hogy hosszú távon tárolható szobahőmérsékleten és fényen egyaránt, specifikusabb reakciót ad, viszont a festés sikerességét nagyban befolyásolja a munkát végző személy szubjektív véleménye a színreakció erősségéről. Az idő előre haladtával ugyanis a metszetek színe egyre sötétül, míg végül megkülönböztethetetlen lesz a specifikus jel és a háttér egységes barnasága. További hátránya, hogy egyes szubsztrátok károsak lehetnek az egészségre. A következőkben a HRP-DAB festés folyamatának részletes leírása következik.

A szekunder antitesttel (3. táblázat) másfél órán át inkubáljuk a szeleteket. Fél óra PBS mosás után következik az enzim felvitele a szeletekre, mégpedig a Vectastain® (Vector Laboratories, hígítás 1:100) ABC kit felhasználásával, amely egy avidinhez rögzített biotinilált peroxidáz komplex. Ez a komplex az avidinen keresztül rögzül az ellenanyag biotinjához. Másfél órán keresztül hagyjuk a reagenseket kibontakozni, majd félórás TBS (0,05 M Tris-HCl puffer, pH 7,4) mosás következik. Maga az előhívás TBS-ben oldott DAB-al (60 μ L/100mL) történik, Petri-csészében. A folyamat ezen része csak pár percet vesz igénybe, de nagyfokú összpontosítás szükséges

hozzá. A szeleteket ezután tárgylemezre helyeztük és két napig száradni hagytuk, majd DePeX segítségével lefedtük.

3. táblázat: Felhasznált szekunder szérumok.

Konjugált molekula	Ellen	Eredet	Gyártó	Hígítás
Alexa 555	egér	szamár	Alexa Fluor	1:250
Alexa 488	nyúl	szamár	Alexa Fluor	1:250
biotin	egér	ló	Vector	1:100

Minden egyes immunhisztokémiai vizsgálat során a szeletek mellé patkány telencephalon szeleteket is helyeztünk, amelyek pozitív kontrollként szolgáltak. Negatív kontrollként primer ellenanyaggal kezelt sorozatokat használtunk, amelyeken szintén végigvittük az immunhisztokémiát. Az izmokból vett minták feldolgozása során is hasonlóan jártunk el, azzal a különbséggel, hogy a beágyazás paraffinba történt, valamint az ellenanyagokkal való kezeléseket már a tárgylemezre felvitt szeleteken valósult meg.

3.4. Kiértékelés

A kiértékeléshez egy Olympus BX51 mikroszkópot használtunk, a képeket a hozzácsatolt DP50 digitális kamerával készülték. Az egyes sorozatokhoz tartozó patkányanyag szeletek bizonyosságot adnak a reakció sikerességéről és viszonyítási pontként szolgálnak. Mivel az általunk vizsgált fehérjék a vér-agy gátban vagy annak közelében fordulnak elő, az ellenanyagok lényegében az érpályákat jelölik ki. Ennek értelmében a disztroglikán (Dg), a disztrobrevin (Dbr), az akvaporin-4 (Aqp) és a laminin (Lam) ellen irányuló immunhisztokémia esetén pozitív eredménynek számítjuk, ha a mikroszkópban folyamatos fallal rendelkező kapillárisokat látunk a szövet mélyén, tehát nem az endimális vagy a meningeális felszínen. A GFAP festés pozitívnak minősül, ha a gliasejtek nyúlványai kifejezetten erősebb reakciót mutatnak a háttér színénél.

3.5. Elektronmikroszkópia

Pontyon és teknősen végeztünk pre-embedding immunhisztokémiai reakciót GFAP ellen. A szövetmintákon elvégzett immunreakció után azokat fél órán keresztül

kezeltük 1%-os ozmium-tetroxid oldattal. PBS mosást követően felszálló alkoholsoron dehidratáltuk a metszeteket. Ezután propilén-oxidos immerzió következett, majd epoxi-gyantába ágyaztuk az agyszeleteket. Félvékony metszeteket készítettünk és megjelöltük a számunkra érdekes területeket, majd ultramikrotómmal (Reichert Ultracut S) ultravékony metszeteket szelünk. Ezeket gridre felvéve vizsgáltuk egy JEOL 100B típusú elektronmikroszkópon, a képek Sys Morada digitális kamerával készültek.

Teknősön immunreakció nélküli megfigyelést is végeztünk (melléklet 13. ábra). A feldolgozás ekkor uranil-acetáttal és ólom citráttal történt, a fixálás és a metszés nem különbözött.

3.6. *Western-blot*

A mintákat a folyékony nitrogénben fagyasztott agyaból készítettük el Potter homogenizátorral segítségével. Összesen 5 mintát vizsgáltunk: lombard sügér (S) 0,2 g/0,8 mL (fagyasztott agytömeg/ oldószernek használt PBS), törpe karmosbéka (B), axolotl (A), Standing-nappaligekő (G) és patkány (P), mind 0,06 g/0,3 mL mennyiségben. A sügér esetén 20 μ L, a többi minta esetében 6 μ L, 1:1 proteáz-EDTA (Thermo Scientific) keveréket adagoltunk a proteinek bomlásának elkerülése érdekében. A Western blot további fázisainak elvégzése a SZIE ÁOTK Anatómiai és Szövetani Tanszékén került sor, az Élettani és Biokémiai Tanszék közreműködésével. A minták fehérjekoncentrációjának meghatározására Folin-módszert alkalmaztunk. A meghatározott koncentrációk 100x hígításon 1000 μ g/mL körül mozogtak, kivéve a gekő esetében, amikor az érték 1500 μ g/mL fölé esett. Ilyen mértékű eltérést nem tekintettünk lényegesnek, így nem korrigáltuk további hígítással.

A fehérjék szétválasztása SDS-PAGE módszerrel, 0.75 mm vékony gélen történt (futtató gél: 10% akrilamid, 2,7% bisz-akrilamid; zsebes gél 4% akrilamid, 2,7% bisz). A futtatás során 4 μ L protein homogenizátumot adtunk 36 μ L minta pufferhez (0,5 M Tris bázis, pH 6,8), majd 80 μ L-re hígítottuk Laemmli pufferrel. A gél zsebeibe egyenként 10 μ L-t pipettáztunk be Hamilton fecskendővel. A futtatott minták elrendezése a két, egyenként 10 zsebes gélen a következő volt: molekulatömeg

marker (Novex® BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder), patkány, sügér, béka, axolotl, gekkó és patkány. A második patkány mintára amiatt volt szükség, hogy megakadályozzuk a többi minta oldalirányú migrációját a kitöltetlen 3 zseb alatti régióba. Futtató pufferként 0,025 M Tris bázis, 0,192 glicin és 0,1% SDS összetételű oldatot használtunk, az elektroforézis 200V-on, 40 mA-es áramerősségen történt. A szétválasztott fehérjéket PVDF (polivinilén-fluorid) membránra blottoltuk 50 V, 300mA áramerősséggel, 42 perces időbeállítással. A blottoláshoz optimális időtartamot empirikus módon következtettük ki, ugyanis 1 óra alatt a proteinek átfutottak a szűrőpapírba, fél óra alatt viszont nem mentek át a membránra. A primer ellenanyagokkal való inkubáció előtt 5% sovány tejporthoz tartalmazó TBS-ben (10x) kezeltük a membránokat, a nem specifikus kötések telítésének érdekében. Ugyanazt az anti-Dg primer ellenanyagot használtuk, mint az immunhisztokémia során, 140x és 300x hígítással TBST-ben (TBS, 0,1% Tween20) és két napon keresztül áztattuk, hűtőben, folyamatos mozgattal. A primer oldat eltávolítása után 15 percen keresztül 1%-os sovány tejporthoz tartalmazó TBS-el mostuk, majd másfél órás inkubáció következett a szekunder ellenanyaggal (250x hígítás). A kezelés után 45 perces mosás következett, ugyanazon pufferrel, amit a két inkubáció között használtunk. Az előhívást kemilumineszcens jelöléssel (Thermo Scientific: SuperSignal™) Röntgen filmen végeztük, három különböző ideig (fél perc, 1 perc és 2 perc).

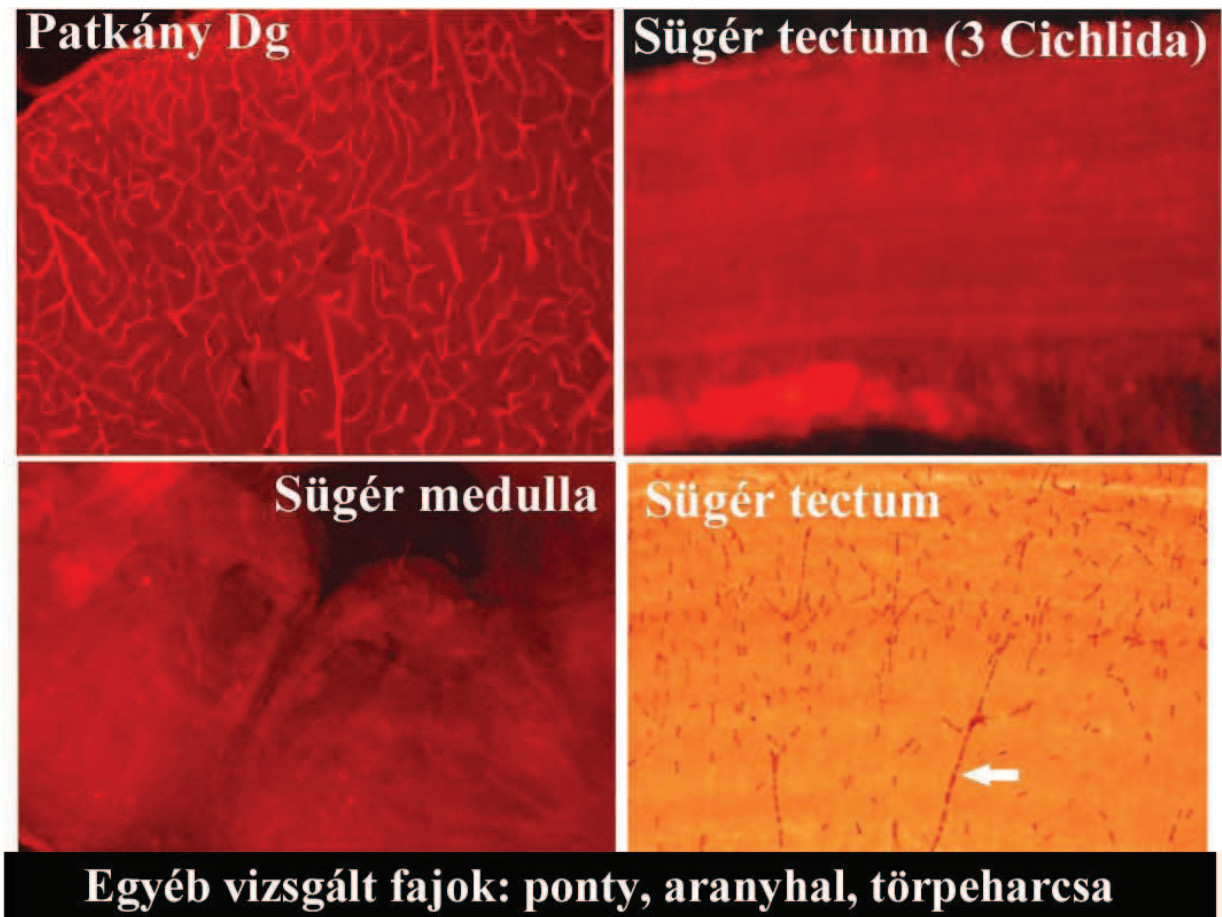
4. Eredmények

4.1. Immunhisztokémia

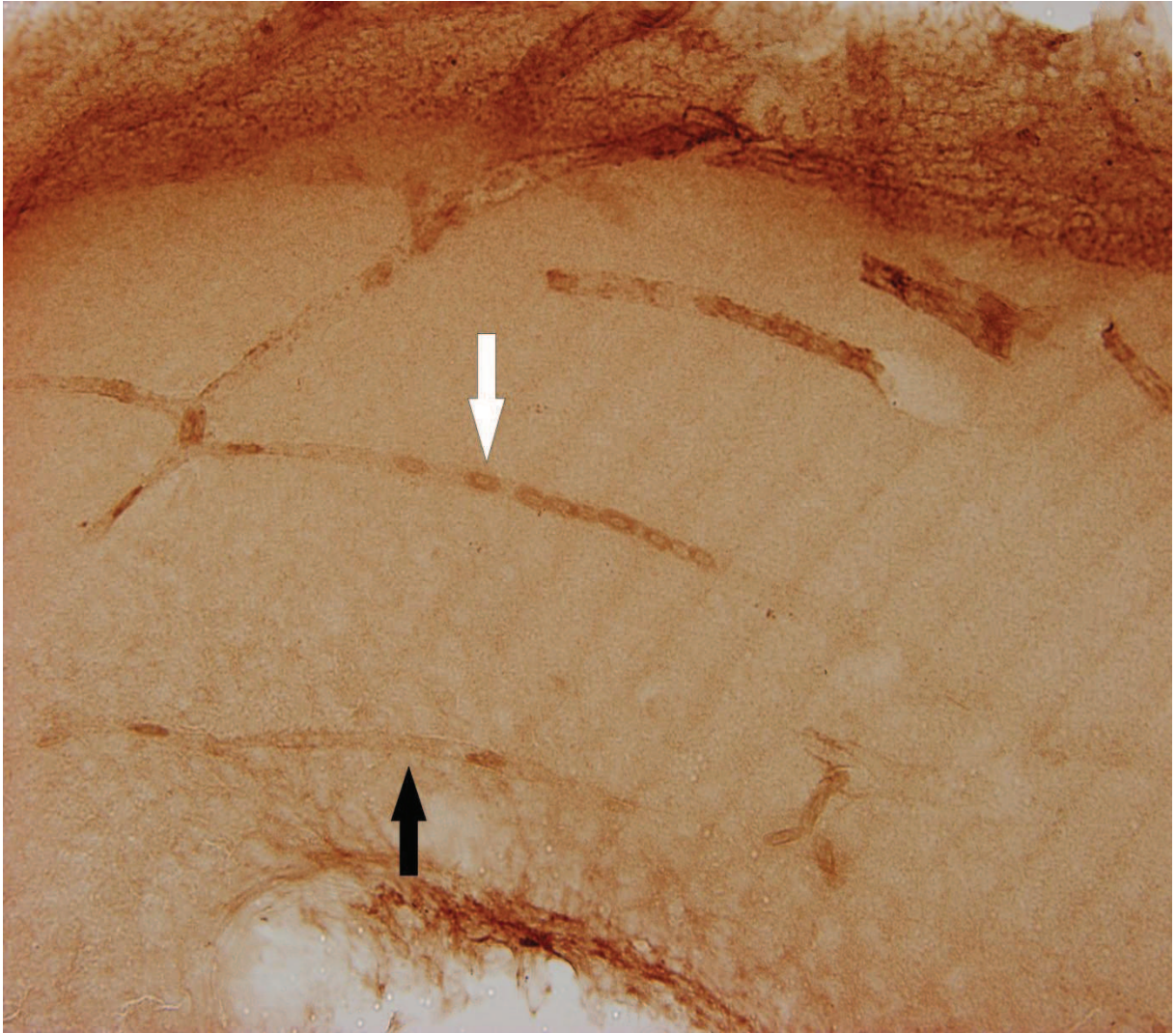
A sugarasúszójukban a β -Dg elleni immunhisztokémia nem mutatott reakciót egyik vizsgált faj egyik agyterületén sem (5. ábra). Ugyanakkor porcos halakban egy korábbi vizsgálat jó reakciót eredményezett [2] (melléklet 7 ábra). A békák szintén negatív eredményeket mutattak (6. ábra), amely meglepő, ha figyelembe vesszük, hogy a farkos kétéltűek esetén pozitív reakciót tapasztaltunk (melléklet 8. ábra). Az összes általunk vizsgált Amniota pozitív immunreakciót jelzett az emlősre kifejlesztett antitesttel. A melléklet 9. ábra a hüllők, míg a 10. ábra a madarakat mutatja be.

A disztrobrevin ellen irányuló kimutatások csak az emlősökben és a madarakban voltak sikeresek, más csoportokban nem találtunk pozitívítást (melléklet 11 ábra). Sajnos az antitest kiöregedett, így a későbbi vizsgálatokban mellőztük a használatát.

Az Aqp-4-et megtaláltuk az Amniotákban, más taxonokban viszont nem volt meggyőző bizonyíték a jelenlétére (melléklet 12 ábra).



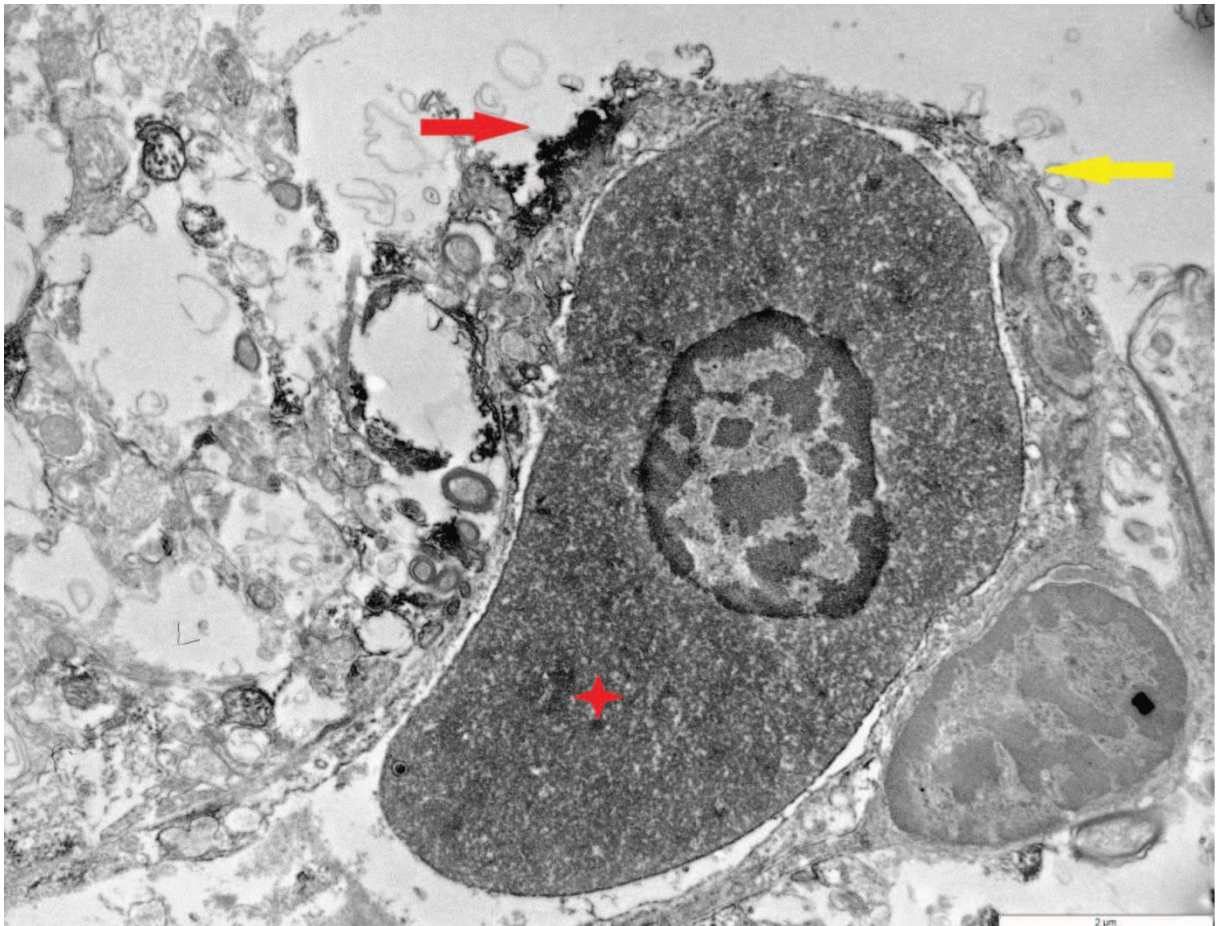
5. ábra: Zebrasávós sügér különböző agyterületeinek disztroglikán (Dg) reaktivitása patkánnyal összehasonlítva. Amíg az utóbbin jól kirajzolódnak az erek, a sügér esetében nem látunk immunreakciót. A jobb alsó kép HRP módszerrel készült; az erek nem kontinuusak (nyíl), mivel nem az érfalon lévő ellenanyag, hanem a vörösvérsejtek endogén peroxidáz enzimei jelölik ki az érpályát, tehát az eredmény negatív.



6. ábra: Kecskebéka Dg telencephalon 200x nagyítással. A gyöngyfüzérbe rendeződött, ovális vörösvérsejtek (fehér nyíl) kirajzolják az érpályát, az érfal csak gyengén jelölt (fekete nyíl).

4.2. Elektronmikroszkópia

A pontyon végzett immunfestés sajnálatos módon nem lett a legszebb, valószínűleg a használt fixáló ozmotikus viszonyai rongálták meg a szövet ultrastruktúráját. Ennek ellenére a kapott mintázat hűen tükrözi a GFAP várt előfordulását, vagyis az ereken oszlopszerűen jelen lévő asztroglia végtalpakat (13 ábra).

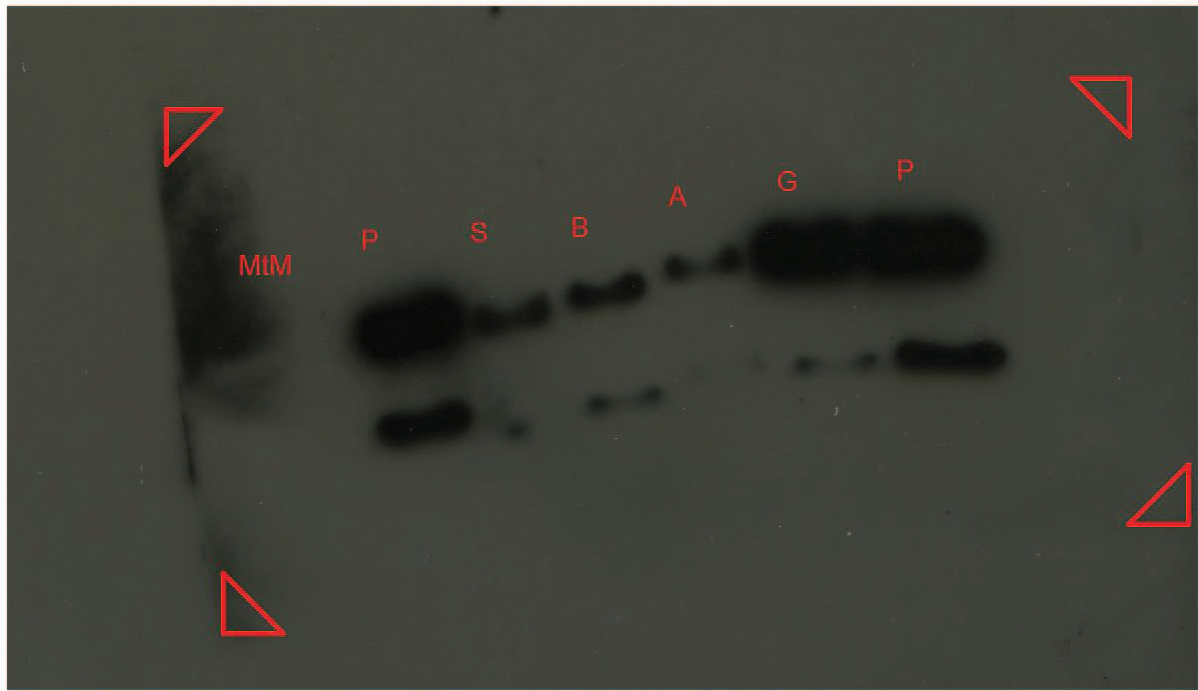


13. ábra: Ponty anti-GFAP elektronmikroszkópos felvétel. Az érfal (sárga nyíl) oldalában jól látható a GFAP-csapadék (piros nyíl). Az ér belsejében egy vörösvérsejt látható (piros csillag).

A teknősökön végzett Dg festés sikeresnek bizonyult és kirajzolta az érfalhoz csatlakozó asztroglia végtalpakban megjelenő DGC-et.

4.3. *Western blot*

A fehérjeszétválasztás során csak a disztroglikán fehérjét vizsgáltuk meg, amint az a metodikában szerepel. Ebben az esetben az eredmény pozitív lett azokban az állatokban is, amelyek negatív eredménnyel szerepeltek az immunhisztokémia során. Az általunk végzett kimutatás tisztán kvalitatív jellegű, azonban a sávok vastagságából megállapítható, hogy az Anamniótákban lényegesen kisebb a Dg expressziója (14. ábra).



14. ábra: Western blot, anti-Dg primer, 140x hígítás, 2 perces előhívással. A molekulatömeg marker nem látható, mivel nem kötött hozzá ellenanyag. A sávok 64 kDa és 36 kDa között találhatóak. Jelölések: MtM: molekulatömeg marker, P: patkány, S: sügér, B: karmosbéka, G: gekkó, a háromszögek a membrán széleit mutatják.

5. Megbeszélés

Elvégeztünk egy összehasonlító vizsgálatot a gerincesek körében a disztroglikán fehérje és az egyes vele kapcsolt fehérjék (disztrobrevin, aqvaporin-4), mint a vér agy gát szempontjából jelentős komponensek, kimutatásával. A legtöbb gerinces osztályból, eltérő taxonómiai háttérrel rendelkező állatokat szereztünk be, így nemcsak az osztályok közötti, de az egyes osztályokon belüli különbségekre is rámutattunk. Vizsgálatunk kiterjedt a halak közül a ponty-, harcsa- és sügérfélékre; a kétéltűek mindkét rendjének két-két családjára (szalamandrafélék és harántfogúgőtefélék a farkos kétéltűekből; pipabékafélék és valódi békafélék a békák rendjéből); a hüllők Lepidosauria kládjának képviselőire: a gekkókra, kaméleonokra és kígyókra; összehasonlítva őket a postagalamb és a vándorpatkány központi idegrendszerében fellelhető mintázatokkal. A vizsgálatokat az állatok agyából készült keresztmetszetek immunhisztokémiai festésével végeztük és a disztroglikán fehérjét western blot által is kimutattuk.

Az immunhisztokémiai vizsgálataink eredményéből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a Dg megtalálható az állkapcsosokban, viszont a sugarasúszójúakban és a békákban nem mutatható ki az emlősre használt ellenanyaggal. Sajnos a vázizmokon végzett immunhisztokémia nem nyújtott egyértelmű eredményt a disztroglikánnal kapcsolatban, noha reakciót megfigyeltünk minden esetben. A kapott eredményt úgy is értékelhetjük, hogy a Dg egy ősi, konzervatív protein, azonban az általunk említett két csoportban eltűnt. Az eset hasonlatos a C-vitamin szintetizálásának elvesztésével emberben és tengerimalacban, amikor más emlősök pedig képesek rá.

Genom adatbázisok és szakirodalom alapján azonban kizárható, hogy a gén hiányozna a sugarasúszójúak génrepertoárjából. A disztroglikán gén nemcsak hogy jelen van, hanem ráadásul több példányban is szerepel a genomban [23, 24]. A szerző szerint a valódi csontos halak genomjában történt egy duplikációs esemény. Lehetséges, hogy az eredeti DAG1 gén pszeudogénné vált a folyamat során, vagy csendesítés alatt áll és a keletkezett másolatai közül az expresszáldodik helyette, amely mutáció következtében elveszítette az emlős ellenanyag által kötött epitopot, akkor megtaláltuk a probléma forrását.

A fenti ellentmondást feloldhatja a maskírozottság problémája, azaz a fehérje szerkezete nem teszi lehetővé, hogy az ellenanyag specifikus helyre bekössön. Mivel a β -disztroglikán a sejtmembránban található, így az epitopot elrejtheti a lipid kettősréteg vagy a sejtfelszínen található glikokalix. A Western blot analízis során tapasztaltak igazolják ezt az állítást, mivel denaturált állapotban lévő fehérjét ugyanazon ellenanyag képes volt érzékelni. Az előzőekből arra a konszenzusra jutottunk, hogy a disztroglikán jelen van az összes általunk vizsgált gerinces központi idegrendszerében, azonban strukturális okok miatt immunhisztokémiával nem, vagy csak részben lehet kimutatni, a sugarasúszójúak és a kétéltűek esetében, értelemszerűen. Nem találtunk irodalmi adatot arról, hogy mi okozhatja a kétéltűeken belüli különbséget. A sugarasúszójúak és a békák esetében megfigyelt negatív eredmények valószínűleg független események.

A disztrobrevin eredmények alapján azt a következtetést vonhatnánk le, hogy a DGC egyes alkotói nem egyszerre jelennek meg a törzsfejlődés során, valamint szövetspecifikusak. A szakirodalom szerint viszont a Dbr igenis megtalálható az alacsonyabb rendűekben is [19].

Az akvaporin vizsgálatával egyrészt párhuzamosan jelöltük a DGC-et, így annak jelenlétét vagy hiányát bizonyíthatta, másrészt a fehérje OAP-n kívüli megjelenését tüntethette fel. Szakirodalom szerint az OAP elrendeződés megtalálható emlősökben, madarakban és hüllőkben [25], a struktúra viszont hiányzik a valódi csontoshalaktól és a kétéltűektől. Ugyanakkor rájában szintén megfigyelhető hasonló, viszont nem ortogonálisan elrendezett szerkezet [26]. Az eredményeink összhangban vannak a fenti állításokkal. Ahol az OAP nincs jelen, ott Aqp-4-et sem találtunk, viszont az OAP hiánya nem feltétlenül jelenti az Aqp hiányát, hiszen annak csak az M23-mas izoformája képes ilyen elrendeződést kialakítani [27].

A teknősökön végzett EM vizsgálatból azt állapítottuk meg, hogy ugyanúgy, mint az emlősökben, a teknősökben is extraendotheliális a DGC, tehát a disztroglikán gliális eredetű. Az eredmény összhangban van a gerincesek vér-agy gát szerkezetével.

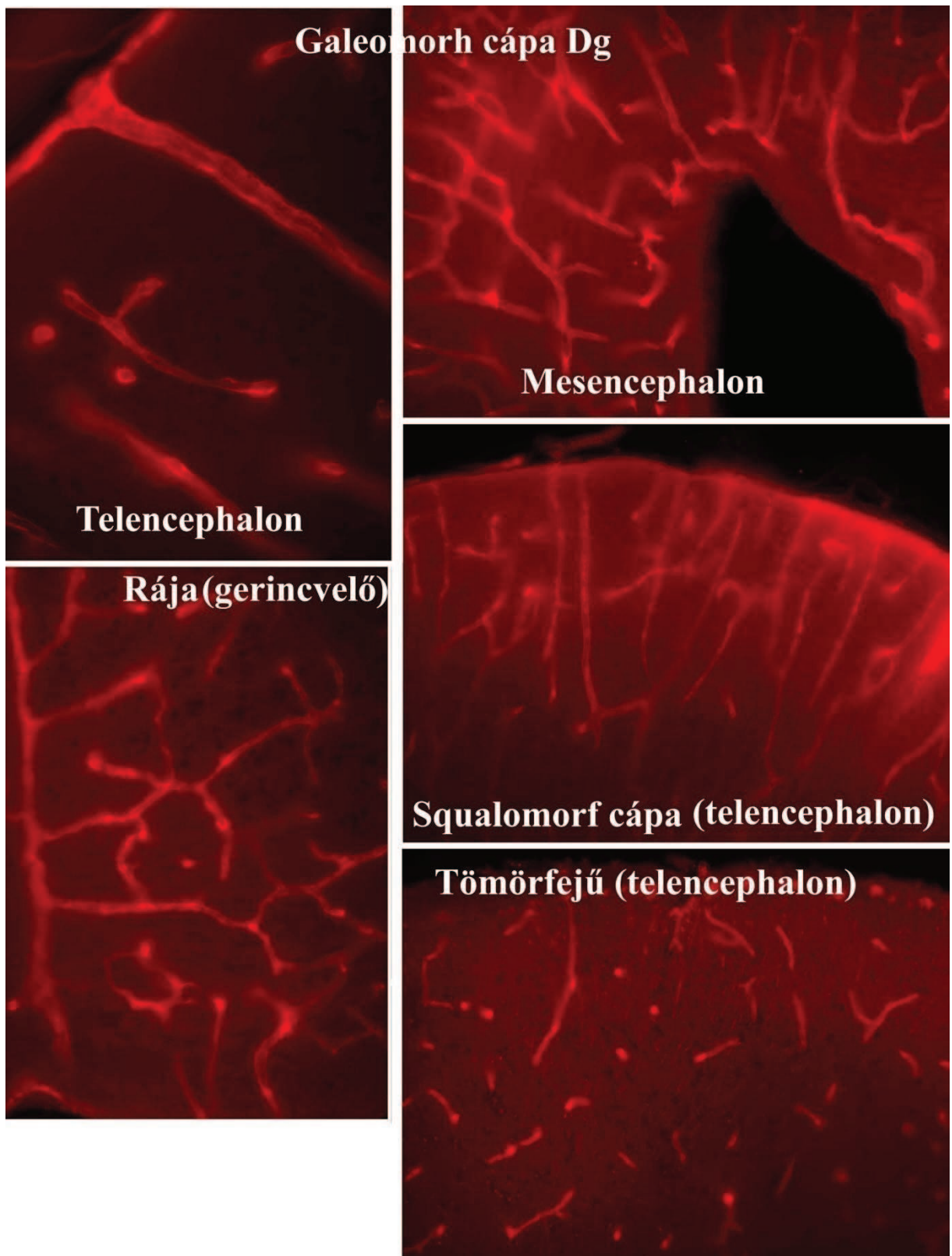
6. Összefoglalás

A gerincesek osztályaiból több reprezentatív faj vizsgálatán keresztül összehasonlítottuk a disztrofin-glikoprotein komplexet (DGC) alkotó fehérjét és a perivaszkuláris glia szerkezetét a GFAP jelölése által. A vizsgálatokat az állatok különböző agyterületeiből készített keresztmetszeteken végeztük immunhisztokémiával, illetve elektronmikroszkópos technikával. A DGC komponensei közül a disztroglikán, a disztrobrevin és az akvaporin-4 került kimutatásra. Az állatokból izommintákat is vettünk és megvizsgáltuk a disztroglikán expresszióját. A disztroglikán a sugarasúszójúakban és a békákban nem volt kimutatható, amely váratlan volt egyes irodalmi DNS adatokkal. Feltételezhetjük, hogy a negatív eredmény az immunhisztokémiai reakcióért felelős epitopok maszkírozottságának következménye. Western blot analízissel kimutattuk a disztroglikán fehérjét minden általunk vizsgált taxonban, tehát elmondhatjuk, hogy a fehérje jelen van, viszont sértetlen szövetben nem ad reakciót az emlős antitestekkel. A disztrobrevin eredményeink szintén ellentmondanak a szakirodalomban írottakkal, de ez feltehetően hiba eredménye. Az akvaporin-4-re vonatkozó eredmények megfelelnek az OAP kimutatásával nyert adatokkal.

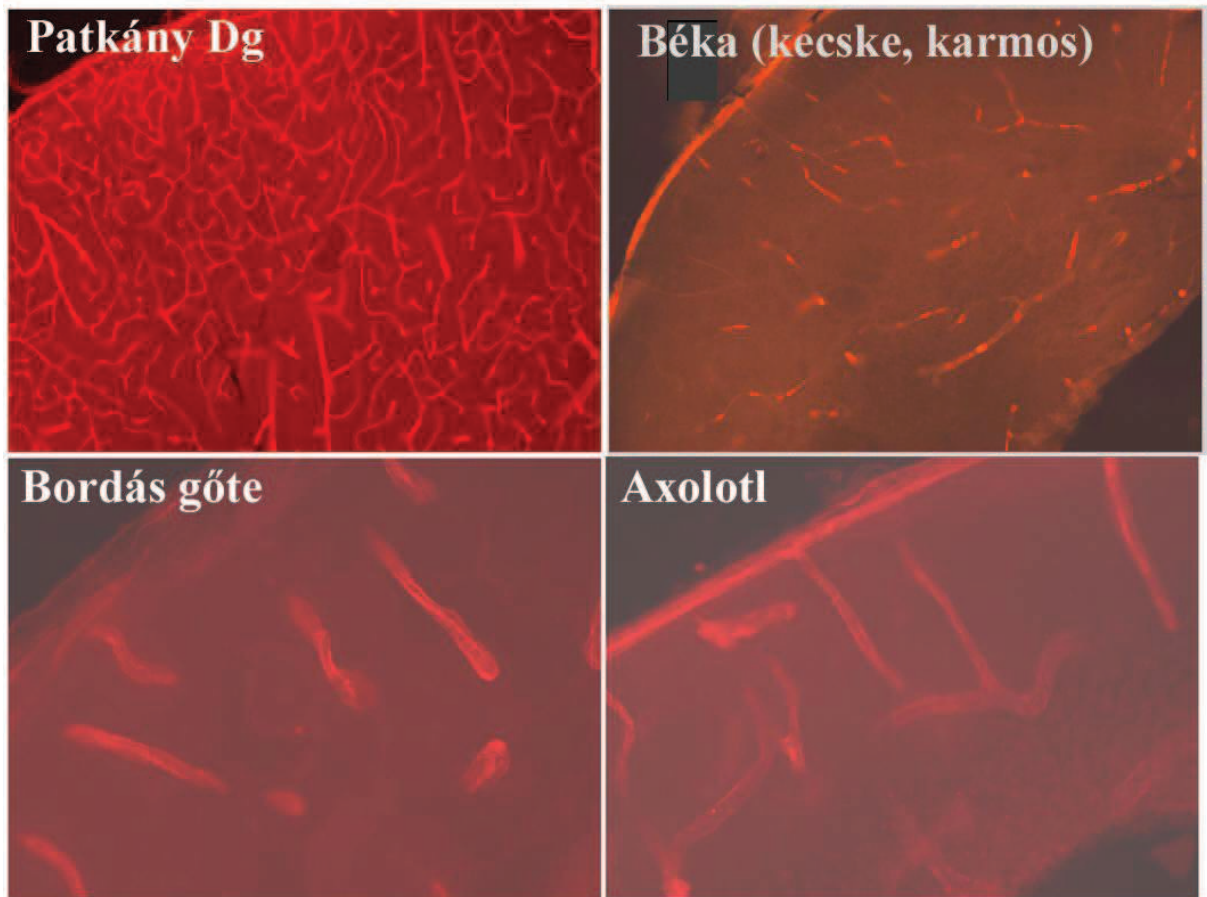
7. Summary

We have performed a comparative observation on the components of the dystrofin glycoprotein complex (DGC) in the central nervous system of several representative species from different vertebrate taxa. We made floating cross sections from the animal's brains and stained them against dystroglycan (Dg), dystrobrevin (Dbr) and aquaporin-4 (Aqp-4) via immunohistochemistry. We also studied the DGC components in muscle tissues and the GFAP distribution in brain to mark the perivascular glia via electronmicroscopy. Our results showed that the Dg is absent in ray-finned fishes and frogs, which contradict with the literature. Further investigation with Western blot showed that Dg is present in those taxa but in a reduced amount. This means the antibody made for mammals is able to react with the piscine Dg in intact tissues, but the protein itself is probably masked. We haven't found dystrobrevin in anamniotes which also contradicts with some data. We did not found Aqp-4 in taxa in which no OAP structure has been described in the literature.

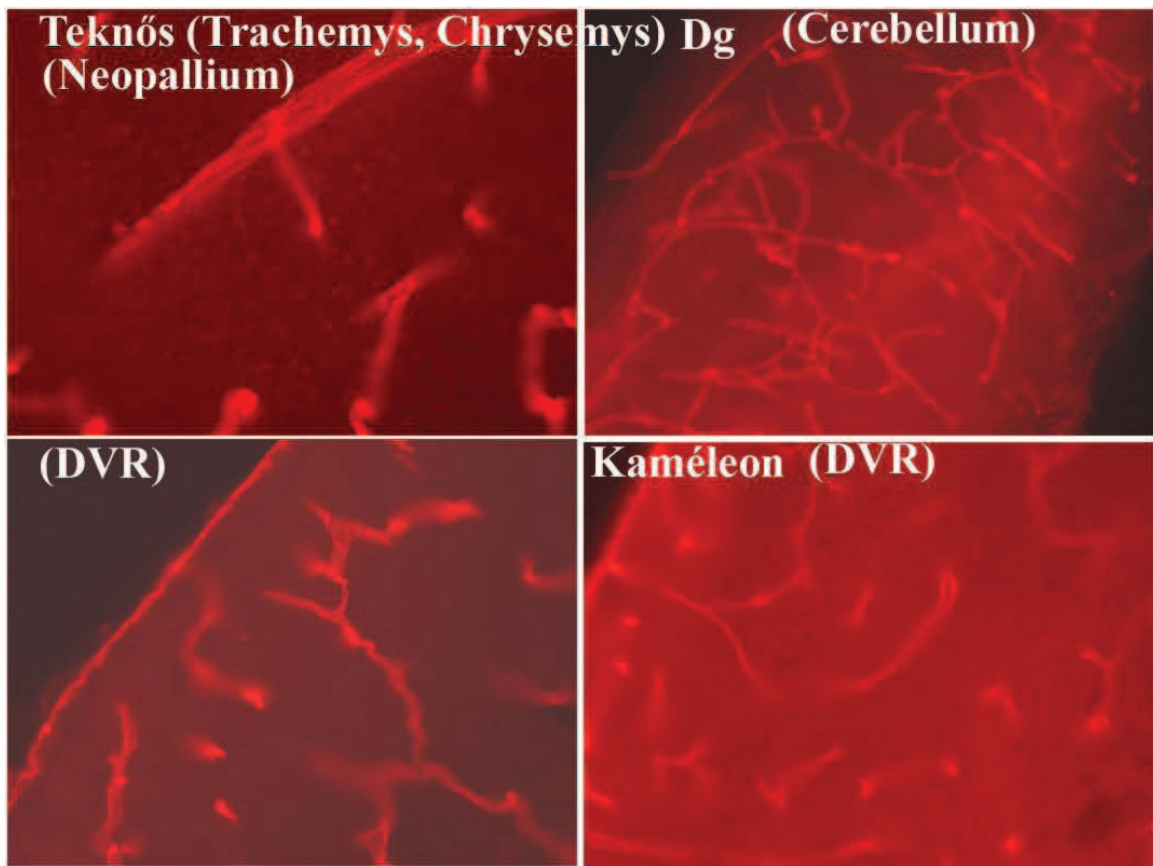
8. Mellékletek



7. ábra: Különféle porcos halak anti- β -disztroglikán immunfluorescens festése. Az érpályák jól kirajzolódnak. Ari Csilla és Kálmán Mihály [2].

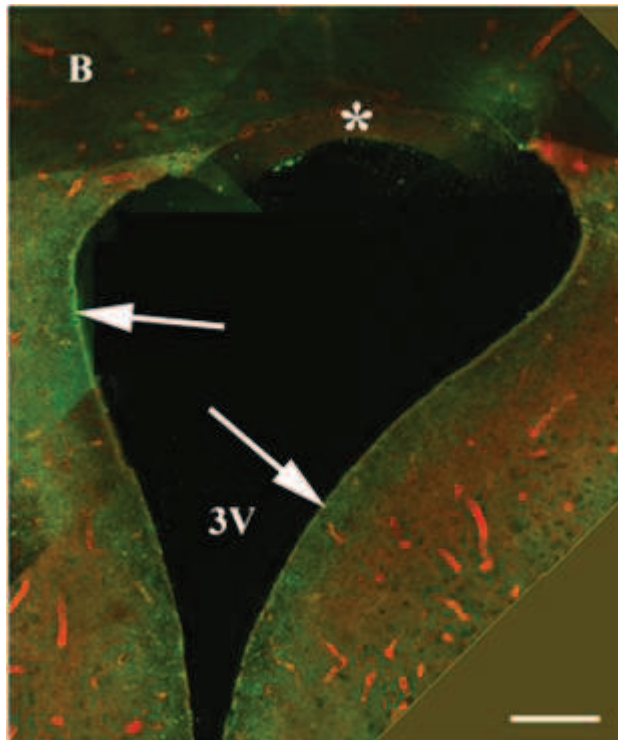


8. ábra: Kételtűek agyának keresztmetszeti szeleteiből készült anti- β -disztroglikán festés, fluoreszcens immunhisztokémiával. Összehasonlításként a bal felső kép patkányból származik.

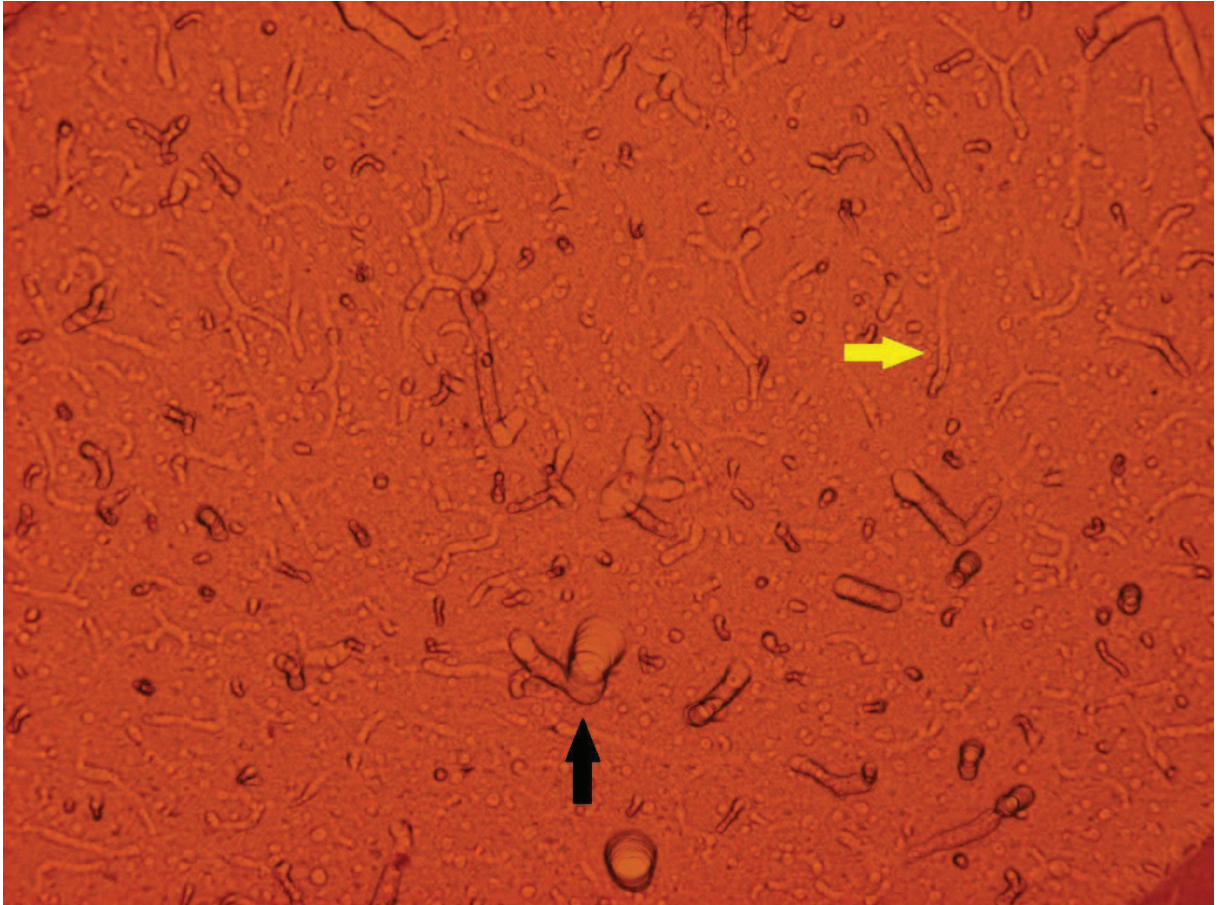


Vizsgálva még: agáma, piton, gekkó

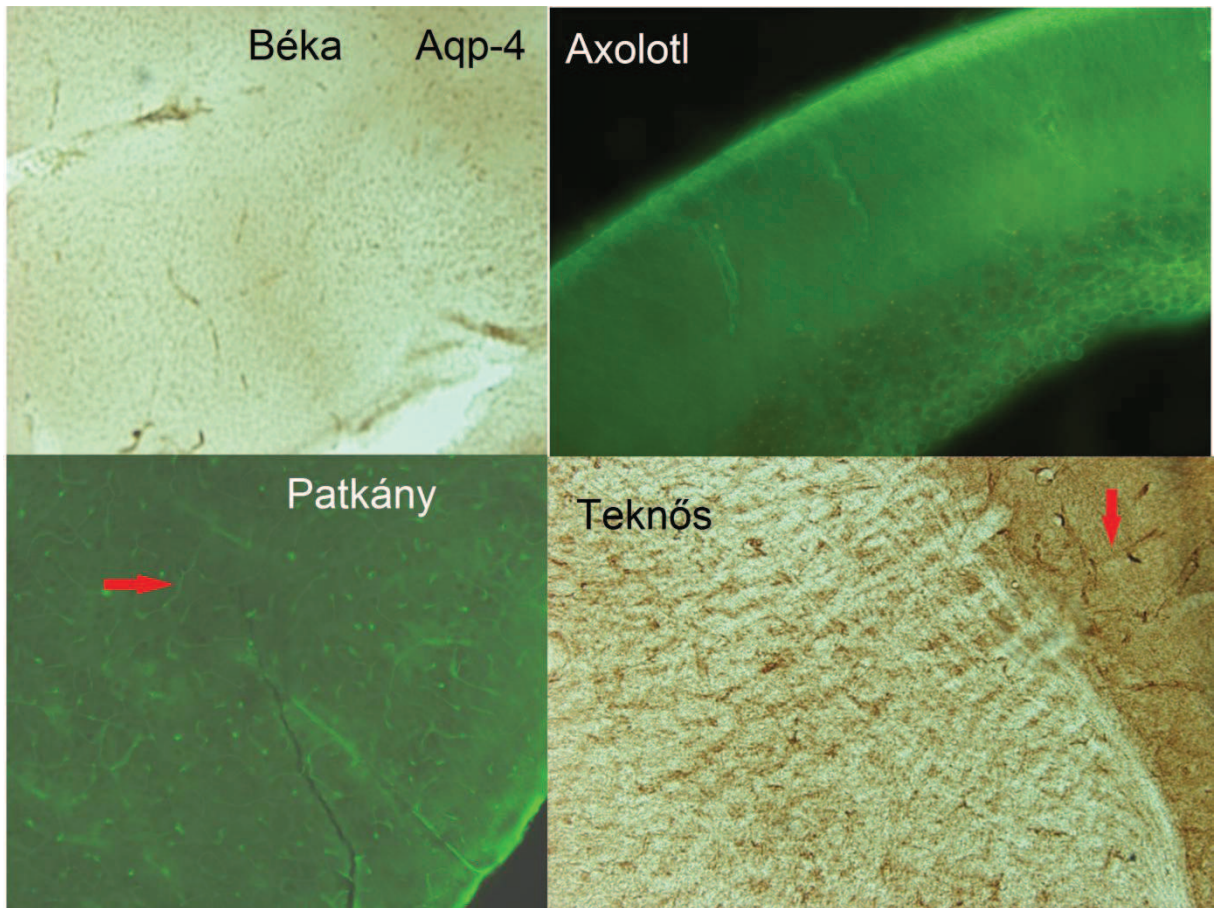
9. ábra: Teknős és kaméleon anti- β -disztroglikán immunhisztokémia, fluorescens módszerrel. Mindkét állatban jól megfigyelhetőek az érhálózatok.



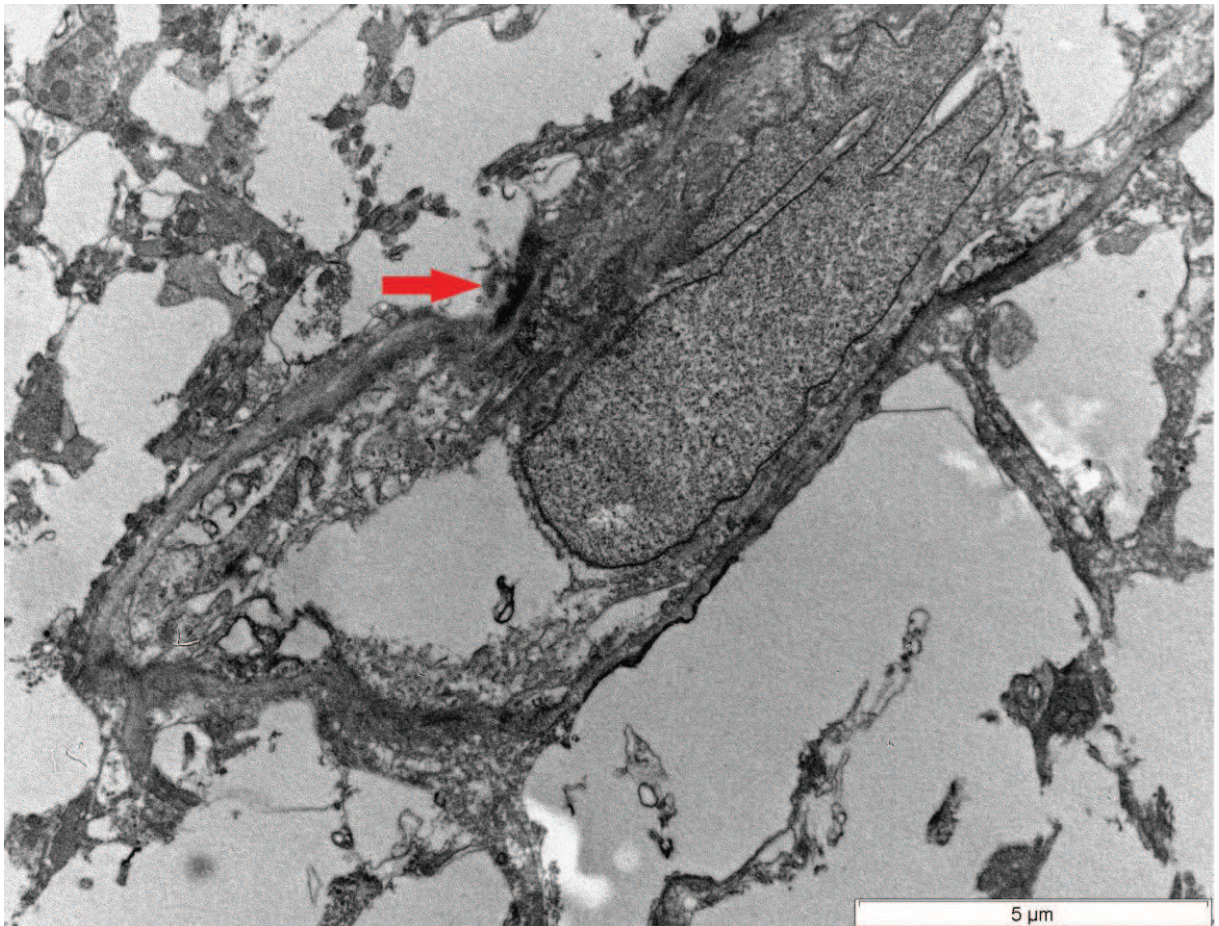
10. ábra: Csirke Dg (piros) és Aqp-4 (zöld) kettős jelölés circumventrikuláris szervben. A harmadik agykamra (3V) falában elhelyezkedő tanyciták nyúlványai (nyilak) Aqp-4 pozitívak, míg a Dg az agyszövet ereit rajzolja ki. A csillag a hipotalamuszt jelzi [25].



11. ábra: Galamb anti-Dbr, HPR alapú immunhiszokémia. A nagyobb átmérőjű ereken kívül (fekete nyíl) a kapillárisok is kirajzolódnak (sárga nyíl).



12. ábra: Anti-Aqp-4 immunfluoreszcens és HRP festés. Láthatóan az Anamnioták nem mutatnak pozitív reakciót, míg az Amnioták esetében kirajzolódnak az érpályák (piros nyilak).



13. ábra: Tegzes Dg elektronmikroszkópos felvétel. A piros nyíl a kicsapódott Dg-ellenanyag komplexet jelöli.

HuVetA - SZIA

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név:

Elérhetőség (e-mail cím):.....

A feltöltendő mű címe:.....

.....

A mű megjelenési adatai:.....

Az átadott fájlok száma:

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA és a SZIA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédtett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA és a SZIA egynél több (csak a HuVetA és a SZIA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy a átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

engedélyezi, hogy a HuVetA-ban/SZIA-ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,

a Szent István Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,

a SZIE Állatorvos-tudományi Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,

csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

* Jelen nyilatkozat az 5/2011. számú, *A Szent István Egyetemen folytatott tudományos publikációs tevékenységgel kapcsolatos adatbázis kialakításáról és alkalmazásáról* című rektori utasításhoz kapcsolódik, illetve annak alapján készült.

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA/SZIA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban/SZIA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 201... évhónap

aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetA Magyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgálta, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*

- az *Állatorvos-tudományi Kar* és az *együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése* révén az *intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése*;
- a *szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése*,
- a *nyílt hozzáférés támogatása*.

A **SZIA Szent István Archívum** a *Szent István Egyetemen keletkezett tudományos dolgozatok tára*.

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Prof. Dr. Kálmán Mihály kijelentem, hogy Sebők Olivér „A disztrofin-glikoprotein komplex komponenseinek vizsgálata gerinces taxonok központi idegrendszerében” c. szakdolgozatának tartalmát ismerem, az abban foglaltakkal egyetértek, és a dolgozatot benyújtásra, illetve védeésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2014. május 05.

Prof. Dr. Kálmán Mihály
Egyetemi tanár
Semmelweis Egyetem;
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

9. Irodalomjegyzék

- [1] Helmut Kettenmann, Bruce R. Ransom: Neuroglia, Second Edition. Oxford: Oxford University Press, 2005. 601.
- [2] Ari Csilla és Kálmán Mihály ECCN6 (European Conference on Comparative Neurobiology), 2010, Valencia, Spanyolország.
- [3] Janvier, Philippe. 1997. Gnathostomata. Jawed Vertebrates. Version 01 January 1997. <http://tolweb.org/Gnathostomata/14843/1997.01.01> in Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- [4] Johnson, G. David and E. O. Wiley. 2007. Acanthomorpha. Version 09 January 2007. <http://tolweb.org/Acanthomorpha/15088/2007.01.09> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- [5] Lundberg, John G. 2006. Teleostei. Version 18 August 2006. <http://tolweb.org/Teleostei/15054/2006.08.18> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- [6] Laurin, Michel. 2011. Terrestrial Vertebrates. Stegocephalians: Tetrapods and other digit-bearing vertebrates. Version 21 April 2011. http://tolweb.org/Terrestrial_Vertebrates/14952/2011.04.21 in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- [7] Hugall AF, Foster R, Lee MS. 2007. Calibration choice, rate smoothing, and the pattern of tetrapod diversification according to the long nuclear gene RAG-1. *Syst Biol.* 56(4):543-63.
- [8] Rieppel O, deBraga M. 1996. Turtles as diapsid reptiles. *Nature* 384:453–454.
- [9] Laurin, Michel and Jacques A. Gauthier. 2011. Diapsida. Lizards, Sphenodon, crocodylians, birds, and their extinct relatives. Version 20 April 2011. <http://tolweb.org/Diapsida/14866/2011.04.20> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- [10] Huszti Zsuzsa, Kálmán Mihály: Glia. Budapest: Akadémia Kiadó, 2008. 552.

- [11] Röhlich Pál: Szövettan. Budapest: Semmelweis Kiadó, 2006. 532.
- [12] Agre P, King LS, Yasui M. Aquaporin water channels from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol.* 542:3-16, 2002.
- [13] Amiry-Moghaddam, Ottersen OPé. The molecular basis of water transport in the brain. *Nature Rev Neurosci* 4:991-1001, 2003.
- [14] Engel A, Fujiyoshi Y, Agre P. The importance of aquaporin water channel protein structures. *J EMBO* 19:800-806, 2000.
- [15] Nielsen S et al. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 17:1771-180, 1997.
- [16] Elkjaer M-L et al. Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen and brain. *Biochem Biophys Res Comm* 276:1118-1128, 2000.
- [17] Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol.* 40:648-677, 1969.
- [18] Wolburg, H. Orthogonal arrays of intramembranosus particles: a review with special reference to astrocytes. *J Hirnforsch.* 36:239-258, 1995.
- [19] Hong Jin, Sipin Tan, et al. The dystrotelin, dystrophin and dystrobrevin superfamily: new paralogues and old isoforms. *BMC Genomics* 8: 19, 2007.
- [20] Sweeney HL, Barton ER. The dystrophin-associated glycoprotein complex: What parts can you do without? *PNAS*, 97:13464-13466, 2000.
- [21] Zaccaria et al. *Mechanisms of Angiogenesis.* 1995.
- [22] Genri Kawahara et al. Drug screening in a zebrafish model of Duchenne muscular dystrophy. *PNAS* 108:5331-5336, 2011.
- [23] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/286829>
- [24] John S. Taylor et al. Genome Duplication, a Trait Shared by 22,000 Species of Ray-Finned Fish. *Genome Res.* 13:382-390, 2003.

[25] Goren, O., Adorján, I., Kálmán, M. Heterogeneous occurrence of aquaporin-4 in the circumventricular organs in rat and chicken. *Anat. Embryol* 211:155-172, 2006.

[26] Gotow T, Hashimoto PH. Plasma membrane organization of astrocytes in elasmobranch with special reference to the brain barrier system. *J Neurocytol.* 13:727-742, 1984.

[27] Furman C et al. Aquaporin-4 square array assembly: Opposing actions of M' and M23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13609-13614, 2003.

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kálmán Mihálynak, amiért segítőkészséggel és türelemmel fordult felém, hogy építő jellegű kritikával támogatott a szaldoglozat írása során és elindított a tudományos pályán.

Köszönet Őz Andreának, Pócsai Károlynak és Dr. Adorján Istvánnak a laborban való segítségükért. Köszönet Bakó Máriának az izomminták feldolgozásáért és Horváthné Oszwald Erzsébetnek az elektronmikroszkópos vizsgálat során nyújtott segítségéért.

Külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Halasy Katalinnak a konzulensi munkájáért és a témabeszámoló kritikáért; valamint Dr. Jancsik Veronikának a Western blot vizsgálatok alatt nyújtott segítségéért. További köszönet a SZIE ÁOTK dolgozóinak, akik részt vettek a munkafolyamat valamely szakaszában: Keszőcze Anikó, Gloszeth Gréta, Kulcsárné Petrilla Janka.

Köszönöm Deák Szilviának, Könczöl Katalinnak és Kerti Juditnak, hogy a műtétek során tanúsított érdeklődésükkel és az altatószerek bemérésével segítették munkámat. Köszönöm Lőrincz Dávidnak a hullók beszerzését és a közös munka során a kellemes társaságért.