PhD Tézisek

A kalmodulin gének kifejeződésének *in silico*, *in vivo* és *in vitro* vizsgálata a patkány központi idegrendszerében

Körtvély Előd

Témavezető: Dr. Gulya Károly
tanszékvezető egyetemi tanár

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Állattani és Sejtbiológiai Tanszék

Szeged
2004

PH.D. TÉZISEK

A kalmodulin gének kifejeződésének in silico*,* in vivo *és* in vitro *vizsgálata a patkány központi idegrendszerében*

A kalcium (Ca^{2+}) számos biológiai folyamat nélkülözhetetlen résztvevője. Az időben és térben eltérően megjelenő Ca^{2+}-csúcsok által hordozott információt Ca^{2+}-kötő fehérjék alakítják sejtválasszá. Néhány fehérjét közvetlenül szabályoz a Ca^{2+}, de legtöbbjük csak átmenetet képez a Ca^{2+}-szignál és az effektorok között.

A kalmodulin (CaM) a második típusba tartozó, prototipikusnak nevezhető Ca^{2+}-szenzor; erősen konzervált, multifunkciós fehérje. Ez az EF-hand fehérje valamennyi eukarióta sejtben megtalálható. Változatos célfehérjéin keresztül olyan alapvető sejtélettani folyamatokat szabályoz, mint a sejtosztódás, a differenciálódás, a szignáltranszdukció stb. Különösen nagy mennyiségben van jelen a központi idegrendszerben. Noha egyes gliasejtek számottevő mennyiségű CaM-ot tartalmazhatnak, ebben a szövetben a fehérje zömét neuronok szintetizálják, majd különböző intracelluláris raktárakban halmozzák fel.

Gerincesekben több önálló CaM gén is létezik, amelyek azonban ugyanazt a konzervált aminosavsorrendű fehérjét kódolják. Patkányban három valódi CaM gént (CaM I, II és III) azonosítottak, amelyek valamennyien erős neuronális expresszióval rendelkeznek. Alternatív poliadeniláció használatával a három CaM génről legkevesebb nyolc eltérő méretű mRNS íródik át (CaM I: 4,2 kb, 4,1 kb, 1,7 kb, 1.0 kb; CaM II: 1,4 kb; CaM III: 2,3 kb, 1,9 kb, 0,9 kb). Míg a kódoló régió csak a genetikai kód redundanciája által megszabott kereteken belül tér el az egyes transzkriptumok között, addig a mRNS-ek 5'- és 3'-nemkódoló szakaszai alapvetően különböznek egymástól. Ez a három CaM gén kifejeződésének eltérő szabályozására utal.

Az elmúlt évtizedekben jelentős erőfeszítések történtek a CaM gének expressziós mintázatának pontos leírására. Ennek során élettani és kísérletesen módosított körülmények között vizsgálták a CaM gének kifejeződését mind felnőtt, mind újszülött állatokban, illetve *in vitro* rendszerekben is. Ennek során a génexpresszió intenzitásának fejlődési és differenciáltsági állapottól függő változását írták le. A különböző agyterületek CaM mRNS

tartalma például jelentős eltéréseket mutatott az első posztembrionális életnapon (PD1), de a különbségek jelentősen csökkentek az életkor előrehaladtával. A kisagy CaM mRNS tartalma is jellegzetes génkifejeződési változásokat mutatott a korai embrionális életszakaszban. Ezen a területen PD1 életkorban a hibridizációs szignál kizárólag a külső germinális rétegre korlátozódott, amit azonban az újonnan megformálódó Purkinje- és szemcsesejtek sokkal erősebb expressziója követett a PD16 életnap környékén. A 4,1 kb-os CaM transzkriptum szintjének az egyedfejlődés alatti megemelkedését is leírták, miközben az 1,8 kb-os transzkriptum mennyisége állandó volt. A CaM gének hormonokon keresztül történő szabályozását szintén vizsgálták. Neoplasiakban érdekes módon a CaM II gén expressziója bizonyult a legerősebbnek. A spermatogenezis során is meg lehetett figyelni a CaM gének egyedi szabályozását. Ezen vizsgálatok zöme azonban vagy csak minőségi analízist jelentett, vagy csak egy adott CaM génre szűkítette a kísérleteket. Bár a mindenkori CaM fehérje szint precíz térbeli és időbeli szabályozásához minden valószínűség szerint eltérő módon járulnak hozzá a CaM géncsalád látszólag redundáns tagjai, a beavatkozásokat követő, a génexpressziós intenzitásokban megfigyelhető változások háttere még ma sem ismert.

A rágcsálók agyában a CaM mRNS jelentős mennyiségben mutatható ki neuronok sejttestében. Ezen túlmenően az is bizonyítást nyert, hogy újszülött patkányokban a CaM I mRNS-ek corticalis és hippocampalis piramissejtek esetében időlegesen kiszállítódnak a dendritikus kompartmentbe is. Egy másik vizsgálat során laboratóriumunk kvantitatív, radioaktív in situ hibridizációs módszert alkalmazva kimutatta, hogy felnőtt patkány agyában a dendritekben gazdag rétegek mRNS tartalma mindhárom CaM gén esetében jóval magasabb, mint az axonokat tartalmazó területeké. Az mRNS koncentrációk következetesen a CaM I gén esetében voltak a legmagasabbak ezekben a régiókban, míg a CaM II gén esetében mértük a legalacsonyabb értékekeket. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CaM mRNS-ek jelentős mennyiségét érinti a dendritikus transzport, génspecifikus módon. Idegsejttenyészeteken végzett vizsgálatok szintén a dendritikus CaM mRNS készlet létezését valószínűsítették. Differenciálódott PC12 sejtek például jelentős mennyiségű CaM I és II mRNS-t tartalmaznak nyúlványaikban, míg a CaM III mRNS-ek csak a sejtmag körül detektálhatók. Az emlős idegsejtekben ismertté vált, dendritekbe irányított mRNS-ek száma folyamatosan nő, és az is bizonyítást nyert, hogy ott megtörténhet transzlációjuk is; ezen a

módon a dendritek mindenkori szükségleteikhez igazíthatják fehérjeszintézisüket.

A CaM multigén család élettani szerepének, valamint az egyedi CaM gének kifejeződését szabályozó mechanizmusok jobb megértésének érdekében különféle vizsgálatokat végeztünk. Kísérleteink célkitűzései az alábbi pontokban foglalhatók össze:

- A CaM I génről átíródó, 4,2 kb hosszúságú mRNS-nek megfelelő cDNS klónozása, a transzkriptum 3'-végét alkotó nukleinsavrészlet meghatározásának céljából.

- A három CaM génhez rendelhető mRNS-ek stabilitásában, intracelluláris elhelyezkedésének meghatározásában, transzlációs hatékonyságában feltételezhetően szerepet játszó cisz-ható nukleinsav részletek számítógépes (in silico) azonosítása.

- A három CaM génről átíródó mRNS-ek in vivo megoszlásának génspecifikus vizsgálata a fejlődő patkányban, a korai posztembrionális élet során. Az ezen időszakra jellemző CaM génexpressziós változások precíz (kvantitatív) nyomonkövetése.

- A CaM gének expressziójának in vitro vizsgálata primér hippocampalis sejttenyészetben, különös tekintettel a mRNS-ek irányított intracelluláris szállítására.

1. *In silico* analízis. Bármilyen génexpresszió-szintű jelenség megértésének előfeltétele az átíródó e gének nukleinsav-sorrendjének megismerése. A CaM gének kifejeződését célzó vizsgálatokban jobbára rágcsálókat használtak, de ezen fajok esetében nem volt ismert az átírt mRNS-ek teljes bázissorendje. Éppen ezért első lépésként 3'-RACE módszer használatával meghatároztuk a patkány CaM I gén cDNS-ének hiányzó darabját. Ezt követően, valamennyi, immár teljes hosszúságú CaM cDNS szekvencia felhasználásával cisz-ható szabályozó elemeket kerestünk különböző adatbázisokban (TransTerm, UTRdb). Noha nem vesznek részt az adott fehérje kódolásában, a nemtranszlálódó régiók az eukarióta mRNS-ek metabolizmusát változatos módon befolyásolhatják, kihatva stabilitásukra, transzlációs hatékonyságukra, citoplazmatikus elhelyezkedésükre és kódoló kapacitásukra is. Jelenleg a legtöbb szabályozó elemet a 3'-nemtranszlálódó régióban azonosították, de az 5'-

nemtranszlálódó régió, sőt a kódoló régió is rendelkezhet ilyen funkcióval.

Jellemeztük a CaM transzkriptumok poliadenilációs szignálhasználatát is. Eredményeink azt mutatják, hogy a CaM gének gyakran használnak a szokásostól eltérő szignált. A szövetspecifikus poliadeniláció az egyik lehetséges magyarázata annak, hogy a CaM transzkriptumok egymáshoz viszonyított mennyisége szövetről szövetre más. A másik lehetőség, hogy e transzkriptumok eltérő, szövetspecifikus fél-életidővel rendelkeznek. A CaM I 4,2 kb-os transzkriptumának 3'-nemtranszlálódó régiójában azonosított 13 ARE ez utóbbi lehetőséget támasztja alá. Ezen kívül, egyes ARE-kről igazolták, hogy részt vesznek a mRNS-ek célzott transzportjában; utóbbi jelenséget saját *in vivo* és *in vitro* kísérleteinkben is megfigyeltük (ld. alább). A patkány CaM transzkriptumok, akárcsak humán megfelelőik, számos CPE-t is tartalmaznak, amelyekről ismert, hogy kihatnak a dendritikus transzlációs hatékonyságra, ezáltal a szinaptikus plaszticitásra is. A CPE által megvalósított transzlációs kontroll a poli(A) farok meglététől függ, de létezik ettől független szabályozás is. Utóbbira példa a CaM I és III gének transzkriptumaiban fellelhető DICE; ennek jelenlétekor az ide kötődő transz-ható faktorok akadályozzák meg a fehérjeszintézist. A CaM mRNS-ek azok közé a transzkriptumok közé tartoznak, amelyek szelektíven elszállítód(hat)nak a sejt egy adott mikrodomainjébe. A lokalizációs szignálokhoz ("irányítószámok") szintén transz-ható fehérjék kötődnek, így hozva létre a citoszkeleton mentén szállítható transzport komplexet. Mostanáig csak kevés olyan lokalizációs szignált azonosítottak, amelyek a dendritekbe irányítják az adott mRNS-t. A 4,2 kb-os és az 1,7 kb-os transzkriptum is tartalmazza azt a 70 nukleotid hosszúságú elemet, amelyhez nagyon hasonlót írtak le a β-aktin és az angiotenzin II receptor mRNS-e esetében. Ráadásul a megfelelő humán CaM transzkriptumok ebben a 70 nukleotidnyi szakaszban 91%-os homológiát mutatnak a patkánnyal. Noha szerepét még nem bizonyították, ez az elem valószínűleg szerepet játszik a CaM I mRNS-ek dendritekbe juttatásában. Ugyanakkor, ahogy arról még lesz szó, a másik két CaM génhez tartozó mRNS-ek is alanyai a dendritekbe irányuló transzportnak. Mivel az összes CaM transzkriptumot tekintve a kódoló régió az egyedüli konzervált részlet, szerepe a célzott transzportban előre megjósolható. Ennek értelmében a 70 nukleotid hosszúságú szakasz kizárólag felnőtt életkorban működik, miközben a fejlődő agyban más mechanizmusok biztosítják a transzkriptum szállítását.

2. *In vivo* analízis. Annak kiderítésére, hogy a fejlődő patkány agyban különböző-e a CaM gének expressziója 15 agyterületet átfogó kvantitatív *in situ* hibridizációt végeztünk 6 eltérő életkorban a 19. embrionális életnap (E19) és a 20. posztembrionális életnap (PD20) között, génspecifikus, [^{35}S]cRNS próbákat használva. Laboratóriumunkban egy hasonló, összehasonlító vizsgálat során a felnőtt agy 70 területén végeztünk hasonló méréseket, amelyek a három CaM gén eltérő expresszióját igazolták. Gyakorlati megfontolások alapján a fenti 70 területből 15-öt választottunk ki jelen munkánkhoz, amely az első átfogó összehasonlító leírása a CaM transzkripció ontogenezisének a fejlődő patkányagyban.

Vizsgálatainkban a CaM gének széleskörű és differenciált működését tapasztaltuk. A különböző agyterületek sejtjeinek fejlődési állapotra jellemző transzkripciója nyilvánvaló szerepet játszik a megfigyelt expressziós profilok kialakításában. Emellett a fejlődő agy sejtszámában végbemenő nagymértékű átalakulások, átrendeződések önmagukban is jelentős szerepet játszanak a mRNS szintek meghatározásában.

A vizsgált időszakban a CaM mRNS-ek szintje jellegzetes módon változott, ezalapján három csoportot különítettünk el. Míg egy adott agyterületen belül a három CaM gén hasonló expressziós profilt mutatott, az eltérő agyterületek expressziós profiljai jelentős mértékben különböztek egymástól. A régión belüli hasonló expressziós profilok ellenére a szignálerősség gyakran génenként különböző volt. A legtöbb területen (pl. a CaM III a piriform kéregben) a szignálértékek PD10 körüli maximummal rendelkeztek, és az expressziós profil nagyjából szimmetrikus volt (I. típus). Más területeken (pl. a CaM II a cerebralis cortexben) a legkorábbi vizsgált életkorban mértük a legmagasabb jelet, ami folyamatosan csökkent a későbbi életkorokban (II. típus). A III. típusba azokat az agyterületeket soroltuk, amelyekben a szignálértékek nem mutatták a fenti szabályszerűségek egyikét sem (pl. a CaM III a hippothalamusban). Valamennyi CaM gén esetében magas szignálértékeket mértünk a kis- és nagyagykéreg, valamint a hippocampus molekuláris rétegében, ami ezen mRNS-ek dendritikus feldúsulására utal. Ezeken a területeken a legmagasabb szignálértékkel a CaM II gén rendelkezett PD1 életkorban, majd a CaM III, végül a CaM I következett. Míg azonban a CaM II és III mRNS-ek szintje meredeken zuhant az életkor előrehaladtával, addig a CaM I szintje viszonylag magas szinten megőrződött egészen PD20-ig.

Annak ellenére, hogy a CaM gének expressziója intenzíven kutatott terület,

ontogenezisükkel korábban csak néhány tanulmány foglalkozott. Ezek a munkák embrionális és újszülött rágcsálók agyában vizsgálták a CaM fehérje eloszlását. Eredményeiket összehasonlítva a sajátjainkkal megállapítható, hogy számos területen a CaM gének transzkripciója időben jelentősen megelőzi transzlációjukat.Ugyanakkor, mivel valamennyi különböző CaM mRNS-ről azonos CaM fehérje szintetizálódik, a génspecifikus transzlációs kontroll vizsgálata technikailag nehezen közelíthető meg. Módszertani eltérésekből adódóan (pl. a próbák specifitása, a kvantitatív számítások elvégzése) a korábbi eredmények interpretálása, összevetése saját, jóval pontosabb eredményeinkkel, számos nehézségbe ütközik. Mindemellett saját eredményeink is azt mutatják, hogy a CaM-ot legerősebben kifejező agyterületek (a piriform kéreg és a hippocampus) PD10 körüli expressziós csúccsal rendelkeznek. Nagyjából a korábban leírtaknak megfelelő CaM génexpressziós változásokat detektáltunk a thalamusban és a striatumban, noha az utóbbi területen a három CaM génre vetítve jelentős eltéréseket tapasztaltunk. A kisagyban PD1 és PD32 között a génexpresszió megnövekedését írták le. Saját eredményeink ugyanakkor a kisagyi CaM génexpresszió sokkal komplexebb szabályozására utalnak, a szignálintenzitások gyakori, gyors megváltozásával. Ez a terület patkányban a születést követően jelentős fejlődésen megy át, ami magyarázhatja a génexpresszióban megjelenő fluktuációt.

Különösen fontos lenne annak vizsgálata, hogy van-e összefüggés a CaM és legfontosabb célfehérjéit kódoló gének expressziójában tapasztalható változások között. A kalmodulin-kötő fehérjék (CaM-BP) ontogenezisét szintén vizsgálták korábban. Eszerint a CaM-BP-k a hippocampusban jelennek meg legkorábban (PD5 körül), majd a nagyagykéreg és a striatum következik. Legkésőbb a cerebellumban mutatható ki a CaM-BP-k jelenléte (PD9). Ezen túlmenően a fejlődő cerebellum CaM-BP expressziós profilja eltért más területekétől, azaz más CaM-BP-k fordultak elő meghatározó mennyiségben a cerebellumban, és mások az agy többi részén. A hippocampusban és a nagyagykéregben PD5 és PD10 között mértük a legmagasabb CaM expressziót, így ezeken a területeken együtt jelenik meg a CaM és legfontosabb célfehérjéi. A kisagy egészére vonatkoztatott, látszólag szabálytalan CaM expressziós profilok hátterében a CaM-BP-k egyedi, erre a területre jellemző használata állhat. Ezek mellett az egyik legfontosabb CaM célfehérjéről, a több alegységből felépülő Ca^{2+}/CaM-függő protein kináz II-ről is ismert, hogy alegységeinek

expressziója a fejlődés alatt eltérően szabályozott.

A jelen vizsgálat legfontosabb eredményei: 1) Egy adott agyterületen a három CaM gén hasonló expressziós profilt mutat. 2) A sejttestekben gazdag területek PD10 körül érik el expressziós maximumukat, amikor a legintenzívebb szinaptogenezis zajlik. A cerebellumban tapasztalt későbbi expresszió is alátámasztja ennek fontosságát. 3)A három CaM gén látszólag hasonló expressziós profiljában kvantitatív analízissel jelentős különbségek detektálhatók. Ennek élettani jelentősége azonban nem ismert. 4) A fejlődő molekuláris rétegek valamennyi CaM génre vonatkoztatva jelentős mRNS tartalma a dendritikus transzportjukra utal, aminek az intenzitása az életkor előrehaladtával csökken.

2. *In vitro* analízis. A CaM számos élettani folyamatban kap kulcsszerepet. Neuronokban a CaM fehérje többek között az osztódást, a differenciálódást, a szinapszisok kialakulását, a neurotranszmitterek felszabadulását és a mikrotubuláris funkciókat szabályozza. Bonyolult mechanizmusok alakítják az adott pillanatban elérhető intracelluláris CaM készletek szintjét, minden valószínűség szerint lokális, de novo fehérjeszintézis révén, amelyet a CaM mRNS-ek helyszínre szállítása előz meg. Ugyanakkor a központi idegrendszerben csak kevés közvetlen bizonyítékkal rendelkezünk a dendritikus CaM mRNS-ek létére vonatkozóan. Noha színes in situ hibridizációs módszerekkel sikerült posztnatális patkányok piramis- és Purkinje-sejtjeinek apikális dendritjeiben CaM I transzkriptumokat kimutatni, minden más vizsgálat perifériás neuronokban és/vagy radiokatív in situ hibridizációs módszerekkel történt. Ez utóbbi módszer eredendően alkalmatlan a közvetlen intracelluláris lokalizálásra.

Saját vizsgálatainkban CaM gén-specifikus, nemradiokatív in situ hibridizációt és citokémiát végeztünk primer patkány hippocampalis kultúrákon. Ezt a rendszert a következő szempontok alapján választottuk: 1) szemben sok immmortalizált sejtvonallal, a központi idegrendszer neuronjainak legjobb megközelítését jelenti, 2) ezen sejtek számos in vivo képességét megőrzik (dendritekkel és axonnal rendelkeznek, szinapszisokat formálnak stb.), 3) egyrétegű elhelyezkedésük szubcelluláris feloldást tesz lehetővé, 4) noha a tenyésztés körülményei neuronokra optimalizált, gliasejteket és egyéb sejttípusokat is tartalmaz a tenyészet, 5) a hippocampalis sejtekről in vivo bizonyított, hogy dendritikus CaM I mRNS készlettel rendelkeznek.

A tenyésztett sejtek többsége intenzíven kifejezte mindhárom CaM gént. Mind a korábbi, mind a jelen eredmények arra utalnak, hogy a CaM-ot intenzíven expresszáló sejtek neuronok, míg a gliasejtek expresszióját szinte alig lehetett kimutatni. Valamennyi mRNS, függetlenül attól, hogy melyik CaM génről íródott át, jelentős mennyiségben fordult elő a dendritekben. Ez az első közvetlen bizonyíték arra, hogy a CaM II és III mRNS-ek is rendelkeznek a dendritbe jutás képességével a központi idegrendszer neuronjaiban. A dendritikus mRNS mennyisége egyforma volt mindhárom CaM gén esetében. Vizsgálatainkban a CaM mRNS-ek a dendritekben gyakran pontszerű jelölődést mutattak, ami összhangban áll azzal a korábbi megfigyeléssel, hogy a mRNS-ek szemcsék formájában szállítódnak.

A fenti adatok némiképp ellentmondanak a PC12 sejteken végzett vizsgálatok eredményeinek, ugyanis az utóbbi esetben a CaM I és II transzkriptumokat a sejttestben és a nyúlványokban is kimutatták, míg a CaM III mRNS-ek előfordulása a sejttestre korlátozódott. Ugyanakkor a PC12 sejtek perifériás idegsejtekből származnak, amelyek elég messze állnak a központi idegrendszer sejtjeitől; ez magyarázhatja az eltérést.

Kettős jelölést alkalmazó kísérleteink ezen túlmenően azt is bizonyították, hogy a tenyésztett sejtek három diszkrét kategóriát formálnak: 1) CaM mRNS-pozitív neuronok, 2) S100-immunpozitív gliasejtek, és 3) mindkét markerre negatív sejtek.

A CaM géncsalád szerepének átfogó megértéséig még sok feladatot kell megoldani. Ehhez a kérdéshez a következő pontokban összefoglalt eredményekkel járultunk hozzá:

a) Klónoztuk a 4,2 kb-os CaM I transzkriptum 3'-végének a génbankokból hiányzó szakaszát, majd meghatároztuk nukleinsav-sorrendjét. Ezt az információt mi magunk is használtuk *in silico* vizsgálatainkban.

b) A CaM mRNS-ekben azonosított számos cisz-ható szabályozóelem arra utal, hogy az egyedi transzkriptumok egyedi intracelluláris szerepkörrel rendelkeznek. A vizsgált elemek a következő csoportokba sorolhatók: 1) nukleáris poliadenilációt irányító szignálok, 2) citoplazmatikus poliadenilációt érintő elemek, 3) lokalizációs szignálok, 4) a

stabilitást befolyásoló faktorok és 5) transzlációt szabályozó elemek. A 2. és a 3. csoportba is beletartozó CPE-k egységesen megtalálhatók valamennyi, 1,0 kb-nál hosszabb CaM transzkriptumban. Ez lehet a magyarázata annak, hogy valamennyi CaM gén rendelkezik a dendritekbe irányított transzkriptummal. Ugyanakkor a citoplazmatikus poliadeniláció előfeltétele lehet egy poli(A) farokkal nem rendelkező mRNS transzlációjának. Ezen a módon tehát meggátolható a szállítás alatt álló transzkriptum riboszómákhoz kötődése. A 4. kategóriába tartozó elemek feltűnő, CaM génenként különböző megoszlása alapján feltételezhető, hogy a CaM I mRNS-ek rövid, míg a CaM III mRNS-ek hosszú fél-életidővel rendelkeznek.

c) Az ontogenezis alatti CaM expresszió változásának kvantitatív nyomonkövetése génspecifikus különbségeket tárt fel. A legszembetűnőbb eltéréseket az elsősorban dendriteket tartalmazó molekuláris rétegekben tapasztaltuk. A nagyagykéreg 1. rétegében például a CaM II gén expressziója nyolcadrészére csökkent PD1 és PD20 között. A CaM III esetében négyszeres, a CaM I esetében pedig mindössze 1,7-szeres csökkenés tapasztalható.

d) In vitro kísérleteink bizonyították, hogy tenyésztett hippocampalis neuronokban a dendritikus elhelyezkedés a CaM transzkriptumok általános tulajdonsága. A neuronokban erős dendritikus jelölődést találtunk függetlenül attól, hogy a próba melyik CaM génre specifikus. Emellett kimutattuk, hogy a CaM mRNS-ek szemcséket formálnak a nyúlványokban, ami minden valószínűség szerint megfeleltethető a mások által leírt transzport egységeknek. Kettős jelölést alkalmazó kísérleteink azt mutatták, hogy az S100 gliális markerfehérje vonatkozásában immunpozitív és a CaM-ot erősen kifejező sejtek (neuronok) halmaza egymást kölcsönösen kizárja. Mindezek mellett egy harmadik sejtpopuláció is körülhatárolható, amelyekben nem mutatható ki sem az S100 fehérje, sem a CaM mRNS-ek.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott nyilatkozom, hogy a Jelölt téziseit ismerem, a tézisekben és a követelményekben foglalt tudományos eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, és azokat ilyen célra a jövőben sem fogom felhasználni.

A Jelölt mint társszerző az alábbi közlemény elkészítéséhez döntő mértékben járult hozzá:

1) Kortvely, Gulya (2004) Life Sciences 74, 1065-1070.

A Jelölt mint társszerző az alábbi közlemény elkészítéséhez jelentős mértékben járult hozzá:

1) Kortvely, Palfi, Bakota, Gulya (2002) Neuroscience 114, 301-316.

2) Palfi, Korvely, Fekete, Kovacs, Varszegi, Gulya (2002) Life Sciences 70, 2829-2855.

3) Kortvely, Varszegi, Palfi, Gulya (2003) J. Histochem. Cytochem. 51, 541-544.

A Jelölt mint társszerző az alábbi közlemény elkészítéséhez kisebb mértékben járult hozzá:

1) Szigeti, Kovacs, Kortvely, Gulya (2003) Acta Biol. Szeged 47, 1-6.

Szeged, 2004. november 3.

Dr. Gulya Károly

.....

UNIVERSITAS SCIENTIARUM SZEGEDIENSIS

VERITAS VIRTUS LIBERTAS

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM