Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar – Természettudományi és Informatikai Kar
Sejtbiológia és Molekuláris Medicina Tanszék

A MIKROGLIA FENOTÍPUS MORFOLÓGIAI, IMMUNCITOKÉMIAI ÉS FUNKCIONÁLIS JELLEMZÉSE SEJTTENYÉSZETEKBEN

Szabó Melinda

PhD Tézisek összefoglalója

Témavezető: Dr. Gulya Károly
tanszékvezető egyetemi tanár

Szeged, 2015

Bevezetés

A mikroglia sejtek a központi idegrendszer (KIR) rezidens immunsejtjei. Tulajdonságaik alapján rokonságot mutatnak más, csontvelői eredetű mieloid sejtpopulációkal. A korai embrionális fejlődés során megjelenő primitív mieloid progenitor sejtekből származó mikrogliák a mononukleáris fagocita rendszerben ontogenetikusan különálló populációt alkotnak. Ezek a sejtek rendkívül plasztikusak, és az elhelyezkedésük, illetve a KIR-ben betöltött szerepüknek megfelelően a különböző stimulusokra többféle morfológiai és funkcionális választ adhatnak. A nyugalmi stádiumban lévő mikroglia ramifikált morfológiát mutat jellegzetes, finoman elágazó nyúlványokkal és viszonylag kis szómával; ezek a sejtek makrofágszerű funkcionális adottságokkal rendelkeznek. Az idegrendszer sérülése, fertőzés vagy gyulladási szignálok hatására a mikroglia aktivált állapotba kerülhet. A károsodás mértékétől függően a ramifikált mikroglia morfológiai, molekuláris és funkcionális változások sorozatán megy keresztül. A károsodás hatására a sejtek nyúlványainak száma fokozatosan csökken, a sejttest mérete megnövekszik, és a szómán több rövid, megvastagodott nyúlvány alakul ki (aktivált mikroglia), amelyek később visszahúzódhatnak (fagocitáló mikroglia). Ezek a folyamatok egybeesnek a mikroglia antigén prezentáló képességének kialakulásával, illetve a citotoxikus és gyulladáskeltő szignalizációs folyamatok megjelenésével.

Származásuk alapján a KIR-ben egyidejűleg kétfajta mikroglia populáció is jelen van. Az egyik csoportot a rezidens mikrogliák alkotják. Ezek a sejtek a mitogén szignáloknak megfelelően és a szövet sérülésének súlyosságától függően osztódva szabályozzák a rezidens mikroglia populáció dinamikáját. Ezekre a sejtekre élettani helyzetben a csontvelői sejtekhez viszonyítva lassú proliferáció a jellemző. Ez a populáció nem rendelkezik a makrofág funkcióhoz szükséges fehérjékkel (pl. a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) I. és II. osztályú fehérjék, γ interferon, citokinek, CD45 antigének), illetve az olyan sejtfelszíni receptorokkal, amelyek az antigén prezentálásban, a fagocitózisban és a citotoxicitás kialakításában fontosak. A kapillárisok közelében elhelyezkedő másik sejtpopulációra a monocita/makrofág eredetre utaló MHC II. osztályú antigének expressziója jellemző. Ez a sejtpopuláció a csontvelői eredetű prekurzorokból folyamatosan pótlódik. A KIR súlyos károsodása esetén a vér-agy gát gyengül, és a csontvelőből származó sejtek belépnek az agyi parenchimába. Ilyen, csontvelőből származó sejtek a mieloid progenitor makrofágok is.

Hasonlóan azokhoz az *in vivo* adatokhoz, amelyek a mikroglia származására, morfológiájára és a mikroglia fenotípus funkcionális fejlődésére vonatkoznak, számos adat áll rendelkezésre az *in vitro* körülények között fenntartott, sejttenyészetekben lévő különböző mikroglia populációkról is. A legtöbb ismeretünk az aktivált mikroglia sejtek *in vitro* körülmények közti stimulálására vonatkozik. Ennek egyik oka az, hogy az aktivált mikroglia számos gyulladáskeltő faktort termel, másik pedig az, hogy a mikroglia számos ágens által kerülhet aktivált állapotba.

A mikrogliák egyes funkciói, mint például a mozgás és a fagocitózis, szoros kapcsolatban állnak a citoszkeletális rendszer változásával, és gyakran összefüggnek az intracelluláris kalcium (Ca^{2+}) változására épülő szignalizációval. A Ca^{2+}-kötő fehérjék (például a Ca^{2+}-érzékelő/receptor/"trigger" proteinek vagy a Ca^{2+} puffer/szállító fehérjék) részt vesznek a sejtben raktározott, kötött Ca^{2+} által kiváltott intracelluláris eseményekben, hozzájárulnak a sejtek alapvető működéséhez, és jelentős szerepük van a sejthomeosztázis szabályozásától a tanulási folyamatokig bezárólag számos intracelluláris jelút aktiválásában. A kalmodulin (CaM) – mint az egyik legfontosabb intracelluláris Ca^{2+}-kötő receptor – biológiai hatását a heterogén célfehérje-populációin keresztül fejti ki. Ezek a célfehérjék sokrétű szabályzási folyamatokban vesznek részt.

Az idegszövet kiemelkedően nagy mennyiségben tartalmaz CaM fehérjét. Noha a CaM fehérje eloszlása az egyes idegsejt-típusokban részleteiben is jól ismert, a gliasejtekben betöltött funkciójáról és lokalizációjáról már jóval kevesebbet tudunk. Az összes gliatípus közül csak a mikroglia tartalmaz jelentős mennyiségben CaM fehérjét. A mikroglia aktivált állapotban viszonylag nagy mennyiségben expresszál CaM fehérjét, aminek a Ca^{2+} szignalizációra épülő szabályzó funkciói számos aspektusból is jól dokumentáltak. A CaM fehérje és a különböző CaM mRNS-ek gyakran célfehérjéikkel együtt ugyanazon citoplazmatikus kompartmentben kolokalizálhatók. A CaM az aktin fehérjével együtt fordul elő például a sejtkéregben, ahol az aktin citoszkeleton rendszer reorganizációját szabályozza a (pato)fiziológiai szignáloknak megfelelően. Az ionizált kalciumkötő adaptor molekula 1 (Iba1) protein egy másik, aktinkötő funkcióval rendelkező intracelluláris Ca^{2+}-kötő fehérje, amelyet a makrofágok és a mikroglia sejtek expresszálnak. Az Iba1-et a nyugvó és aktivált mikroglia fenotípusok kimutatására széleskörűen alkalmazzák.

Mivel a CaM számos célfehérje aktivitását szabályozza, a CaM gátlószerek több folyamatot is befolyásolhatnak. A calmidazolium (CALMID; 1-[bis(4-klorofenil)metil]-3-[2-(2,4-diklorofenil)-2-(2,4-diklorobenziloxi)etil]-1H-imidazol klorid) és a

trifluoperazin (TFP; 10-[3-(4-metilpiperazin-1-il)propil]-2-triflórmetil-10H-fenotiazin dihidroklorid) a sejtben zajló CaM-hoz kapcsolt folyamatok erős inhibitorai. Ezen gátlószerek a CaM fehérjéhez történő kötődésen túl a célfehérjékre is hathatnak, ezáltal néhány, CaM által szabályozott folyamatot közvetlenül is befolyásolhatnak.

Célkitűzések

A KIR-ben élettani körülmények között a rezidens mikroglia túlnyomó többsége nem stimulált, így döntően ramifikált morfológiával rendelkezik. Ellentétben a nagyszámú, *in vivo* rendszerben nyert adattal, amelyek a mikroglia sejtpopulációk növekedési és származási jellemzőit mutatják be, az *in vitro* körülmények között nevelt, nem stimulált (tehát immunológiai szempontból nem provokált) mikroglia fenotípusról csak korlátozott ismerteteink vannak.

Annak érdekében, hogy jobban megismerjük az *in vitro* nevelt, nem stimulált mikroglia sejtek tulajdonságait, különböző morfológiai, immuncitokémiai és funkcionális szempontból jellemeztük őket. A vizsgálatok egy részét kvantitatív módszerekkel végeztük el. A patkány embriók előagyából készített primer kortikális kevert tenyészeteket 28 napig (DIV28) tartottunk fenn annak érdekében, hogy figyelemmel kísérjük a mikroglia fenotípus fejlődését. A tenyészetek vizsgálata során megszámoltuk a különböző sejtpopulációk (neuronok, asztrociták, oligondendrociták, mikrogliák) sejtjeinek számát, amelyeket összevetettünk a tenyészetben lévő mikroglia számával, majd a mikroglia sejtek százalékos arányán keresztül jellemeztük a mikroglia sejtpopuláció dinamikáját a vizsgált tenyésztési periódusban. A különböző mikroglia populációkat a transzformációs index (TI) segítségével jellemeztük, majd meghatároztuk néhány, általánosan használt mikroglia markerprotein lokalizációját is. Ismereteink szerint a mi vizsgálataink számoltak be először ilyen részletességgel az embrionális eredetű, nem stimulált, 28 napig fenntartott *in vitro* kevert tenyészetek morfológiai és immuncitokémiai jellemzőiről.

Az aktin citoszkeletonnak a különböző mikroglia funkciókban kiemelkedően fontos szerepe van, hiszen a sejtek migrációja, a fagocitózis vagy egyéb patofiziológiás körülmény hatására gyorsan átrendeződhet. Noha a CaM az aktin citoszkeleton reorganizáció szabályozásának egyik fő komponense, viszonylag kevéssé ismert a fehérje szabályozó szerepe az olyan lényeges mikroglia funkciókban, mint a fagocitózis és a hozzá kapcsolódó dinamikus citoszkeleton átrendeződés. A CaM által befolyásolt

sejtfunkciók jelentősége, illetve a CaM által irányított specifikus mikroglia funkciókra vonatkozó szűkös ismeretek miatt immuncitokémiai és Western blot technikák alkalmazásával megvizsgáltuk a CaM lokalizációját és intracelluláris eloszlását patkány primer kevert előagyi kultúrákból származó tiszta, másodlagos mikroglia populációban. Az általunk kiválasztott CaM gátlószerekről – a CALMID és TFP – már korábban leírták, hogy eltérő módon fejtik ki hatásukat a CaM fehérjén. Megvizsgáltuk tehát, hogy ezek az inhibitorok hogyan befolyásolják a mikroglia sejtek morfológiáját (a sejtek területe, kerülete és TI értéke), illetve a lamellopódiumok, filopódiumok és podoszómák képződését. Kontroll (nem stimulált) és LPS-kezelt (stimulált) mikroglia populációkat hasonlítottunk össze annak érdekében, hogy felmérjük a mikroglia sejtek aktiválásra adott válaszát. Vizsgálatainkban az alábbi célokat tűztük ki:

1) A patkány embrionális előagyi szövetből származó primer kevert tenyészetben (DIV1-DIV28) lévő sejtpopulációk (neuron, asztrocita, oligodendrocita, mikroglia) összetételének meghatározása és a mikroglia proliferáció vizsgálata;
2) A különböző mikroglia populációk kvantitatív morfológiai jellemzése a tenyésztés során (DIV1-DIV28);
3) Általános mikroglia markerek (HLA DP, DQ, DR, Iba1, CD11b/c) lokalizálása, illetve sejtmorfológia szerinti elkülönítése a tenyésztés során (DIV1–DIV28);
4) A tiszta, másodlagos mikroglia tenyészetben (subDIV4) lévő mikroglia CaM immunreaktivitásának lokalizálása és kvantitatív jellemzése;
5) Egyes CaM inhibitorok (CALMID és TFP) hatásának jellemzése morfológiai, citoszkeletális és immuncitokémiai vizsgálatok alapján tiszta, másodlagos mikroglia tenyészetben (subDIV4).

Anyagok és módszerek

A kísérletek során során szigorúan betartottuk az Európa Tanács 1986. november 24-i, a kísérleti és egyéb tudományos célokra felhasznált állatok védelmére vonatkozó tagállami törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló 86/609/EGK irányelvének [HL L 358., 1986.12.18., 1—28. o.], és az ahhoz kapcsolódó magyar nemzeti és helyi jogi rendelkezések szabályait. A vizsgálatokat a Szegedi Tudományegyetem Intézeti Állatjóléti Bizottsága hagyta jóvá [I-74/II/2009/MÁB].

A mikroglia fenotípus *in vitro* fejlődésének részletes jellemzése érdekében morfológiai, immuncitokémiai és funkcionális jellemzőket vizsgáltunk meg primer kevert és tiszta szekunder mikroglia sejtkultúrákban. Kísérleteink során különböző fluoreszcens

immunhisztokémiai és -citokémiai technikákat, Western blot analízist, illetve funkcionális (fagocitózis) vizsgálatokat végeztünk el. Az alkalmazott vizsgálatok között számos kvantitatív jellegű is volt. Kísérleteinket 1) embrionális (E18) patkány előagyi idegszövetből készített primer kevert neuron/glia tenyészeteken (DIV1-DIV28), illetve 2) primer kevert tenyészetből származó tiszta, másodlagos mikroglia kultúrákon (subDIV4) végeztük. A CaM inhibitorok (CALMID és TFP) hatásait kontroll (nem stimulált) és LPS-kezelt (stimulált) tiszta, szekunder mikroglia tenyészeteken hasonlítottuk össze.

Eredmények

Morfológiai, immuncitokémiai és funkcionális aspektusok alapján különböző mikroglia sejtpopulációk jellemzését végeztük el patkány kevert neuron/glia és tiszta mikroglia tenyészeteiben. A kevert primer kultúra embrionális (E18) előagyból készült. Fluoreszcens immunhisztokémiával kimutattuk, hogy az előagyban lévő, onnan tenyésztésre kivett mikroglia sejtek elsősorban amőboid morfológiával rendelkeztek. A kevert tenyészeteket maximum 28 napig (DIV1–DIV28) tartottuk fenn, a tiszta mikroglia sejteket pedig a kevert primer sejtkultúrákból szubklónoztuk (subDIV4), és legfeljebb 7 napig tenyésztettük (DIV7).

A vizsgált tenyésztési periódus alatt a mikroglia sejtek számának növekedését figyeltük meg; erre a monocita/makrofág/mikroglia sejtspecifikus markerek (HLA DP, DQ, DR, CD11b/c és Iba1) immuncitokémiai és Western blot analíziseinek kvantitatív értékelésekből következtettünk. A fluoreszcens immuncitokémiai és Western blot vizsgálatok nagymértékű mikroglia-sejtszám növekedést mutattak DIV1 és DIV28 között. Az Iba1 immunreaktivitás a Western blot analízis szerint 750-szeresére nőtt, míg az Iba1 immunreaktív sejtek száma 67-szeres növekedést mutatott DIV1 és DIV28 között. A mikrogliák száma a kiszélesztéstől kezdődően (DIV1; 0.5%) folyamatosan emelkedett egészen a vizsgált tenyésztési periódus végéig (DIV28), amikorra a mikroglia sejtek a teljes sejtszám 33.7%-át tették ki.

A mikrogliák bináris sziluettek alkalmazásával végzett kvantitatív morfometriai elemzése kimutatta, hogy e sejtek morfológiája a tenyésztés során megváltozik. Az *in vitro* differenciáció korai szakaszában a mikroglia sejtek elsősorban amőboid morfológiával rendelkeztek, míg az idősebb tenyészetekben az amőboid és ramifikált sejteket egyaránt tartalmazó, kevert populáció volt jellemző. Ezt a megfigyelést a TI átlagértékei is megerősítették, ami 1.96-ról (DIV1) 15.17-re emelkedett (DIV28). A tenyésztés során

később megjelenő ramifikált, nyugalomban lévő mikroglia akár 81-es TI értékkel is rendelkezhetett. Kísérleteinkben azokat a mikrogliákat, amelyeknél a TI < 3 volt, amőboid sejteknek tekintettük. A tenyésztési korai stádiumaiban túlsúlyban lévő amőboid, proliferáló mikroglia sejtek alacsony TI értékkel (TI < 3) rendelkeztek, és mindig Ki67 immunpozitivitást mutattak. Ez a típusú mikroglia a tenyészet korától függetlenül végig jelen volt. Az amőboid mikrogliák sejtmagjában megfigyelt Ki67 immunreaktivitás az S/G2 fázisban jól elkülönülő, általában pontszerű mintázatot mutatott, míg az M fázisban lévő mikrogliában a kondenzálódó kromoszómák szélein jelent meg.

A mikroglia funkció tanulmányozása *in vitro* fagocitózis vizsgálattal történt. A fagocitózis az amőboid mikrogliánál volt domináns. A DIV14 tenyészetekben – amikor az amőboid és ramifikált sejtek a kevert mikroglia populációban megközelítőleg azonos számban voltak jelen – a mikrogyöngyöket az amőboid sejtek (alacsony TI érték) jelentősen nagyobb mértékben fagocitálták, miközben a ramifikált sejtek (magasabb TI érték) e tekintetben jóval alacsonyabb aktivitást mutattak. Azok a mikrogliák, amelyeknél TI < 3 volt, sejtenként átlagosan 11.08 ± 8.6 gyöngyöt (n = 39) fagocitáltak, míg azok a mikrogliák, ahol TI > 3 volt, átlagosan 3.16 ± 3.6 gyöngyöt fagocitáltak sejtenként (n = 81); a különbség statisztikailag szignifikáns volt ($p < 0.001$).

A kiválasztott mikroglia-specifikus markereket a különböző mikroglia fenotípusokban az egyes tenyésztési periódusban többszörös immunfluoreszcens jelöléssel lokalizáltuk. Megállapítottuk, hogy amíg a DIV1 és DIV10 között a HLA DP, DQ, DR immunreaktivitás kizárólag az amőboid mikrogliákra (TI < 3) volt jellemző, addig a CD11b/c- és Iba1-pozitív mikroglia sejtek a mérsékelten (TI < 13) és a progresszív módon (TI < 81) ramifikált formákban jelentkeztek. Míg a CD11b/c- és Iba1-immunopozitivitást egyszerre mutató mikroglia sejtek a tenyésztés során folyamatosan jelen voltak, a DIV10-nél idősebb tenyészetben detektálható CD11b/c-pozitív mikrogliák már nem expresszáltak HLA antigéneket.

Fluoreszcens immuncitokémiával és Western blot analízissel kimutattuk, hogy a tenyésztési periódus során a kevert tenyészetekben a CaM fehérje magas koncentrációja figyelhető meg. A fiatal kultúrákban (DIV1-DIV7) a CaM immunreaktivitás nagy része nem a mikrogliában, hanem a neuronokban fordult elő, azonban a tenyészet öregedésével lokalizációja a mikrogliákban vált meghatározóvá. Megállapítottuk, hogy a CaM a kevert és tiszta sejttenyészetekben különböző módon lokalizálódott az amőboid és a ramifikált mikrogliában. A legerősebb CaM immunreaktivitás mindig az amőboid formában volt

megfigyelhető, ahol a perinukleáris régió mutatta a legintenzívebben immunjelet. Az amőboid mikrogliákban a CaM és az Iba1 immunreaktivitás eltérően jelent meg; míg az Iba1 fehérje inkább a sejtkéregben és a lamellipódiumokban volt intenzívebb, a CaM perinukleárisan fordult elő nagyobb mennyiségben. A ramifikált mikrogliákban az Iba1 immunreaktivitás a citoplazmában homogén eloszlást mutatott. A CaM immunreaktivitás ebben a sejtformában a sejtmag körül lényegesen alacsonyabb volt, s a nyúlványokban már csak nyomokban volt észlelhető.

A CaM gátlása hatással volt a sejt morfológiájára és az aktin citoszkeleton reorganizációjára. CALMID5 és CALMID50 hatására növekedett a sejtek területe, kerülete és a TI értéke, míg a TFP kezelés erősen gátolta ezeket a jellemzőket. Amikor a mikroglia sejteket LPS-sel kezeltük, a mikroglia aktiválódótt, s ezzel együtt a területe, kerülete és TI értéke lényegesen megnövekedett. A TFP szignifikánsan csökkentette a sejtfelszín területét és kerületét mind a kontroll, mind az LPS-kezelt sejtek estében. A nem stimulált tenyészetekben az Iba1-immunreaktivitás és a phalloidin-kapcsolt fluoreszcens szignál az amőboid mikrogliák sejtkéregében és a lamellipódiumaiban nagymértékben átfedték egymást. A phalloidin-kapcsolt fluoreszcencia podoszómákra emlékeztető módon, foltszerűen jelentkezett, ami kifejezettebb volt az LPS-sel kezelt sejtekben. A CALMID50 kezelés hatására a phalloidin-kapcsolt fluoreszcens jelölés két jól elkülöníthető koncentrikus gyűrűt tett láthatóvá a citoplazmában, az egyik a sejtkéregben, a másik a perinukleáris régióban frissen szintetizált F-aktinként volt lokalizálható. Ezekben a sejtekben a phalloidin-tartalmú filopódiumok is jól láthatók voltak. Míg az Iba1 immunreaktivitás viszonylag erős maradt a TFP kezelt sejtekben, addig a phalloidin-kapcsolt fluoreszcencia-intenzitás drámaian csökkent, jelezve, hogy a TFP erősen befolyásolta az aktin polimerizációt.

A CaM inhibitorok eltérő módon változtatták meg a CaM intracelluláris lokalizációját, illetve az Iba1 és a CaM proteinek expresszióját. A magas CaM tartalom – a kontroll és az LPS-kezelt sejtekben egyaránt – elsősorban a perinukleáris citoplazmatikus régióban lokalizálódott és jóval kisebb mértékben volt jelen a sejtkéregben. A CALMID50 kezelés hatására nagy mennyiségű CaM fehérje transzlokálódott a lamellipódiumokba, ahol döntően az állábak élén helyezkedett el. TFP10 kezelést követően a CaM immunreaktivitás a citoplazmában lecsökkent és homogén eloszlást mutatott. A CaM antagonisták az Iba1 és CaM proteinek expresszióját is különböző mértékben gátolták. Az Iba1 és CaM fehérjék expressziójának gátlásában a CALMID kevésbé volt hatékony, mint a TFP; mindkét inhibitor dózisfüggő hatást mutatott.

Az eredmények összegzése

A mikroglia populációk dinamikájának *in vitro* vizsgálata – kiegészítve a fenotípus morfológiai és funkcionális karakterizálással – fontos adatokat szolgáltathat, ha különböző *in vivo* kórélettani helyzetek *in vitro* modellezésére van szükség. A mikroglia egészséges és kóros közegben történő viselkedés-változásainak és szerepének megértéséhez fontos lehet a CaM mikroglia funkciókban betöltött szerepének megfejtése, s ebben a különböző CaM specifikus inhibitorok alkalmazásának is lehet szerepe. Főbb megállapításaink az alábbiak voltak:

1) A primer kevert sejtkultúrában a tenyésztési idő előrehaladtával a mikroglia sejtek száma nőtt. Az Iba1 immunreaktivitás a Western analízis szerint 750-szeresére nőtt, míg az Iba1-pozitív sejtek száma 67-szeres növekedést mutatott DIV1 és DIV28 között, miközben a mikroglia száma 0.5%-ról 33.7%-ra nőtt.
2) A primer kevert kultúrákban fejlődő mikroglia a tenyésztési idő függvényében változó morfológiai és funkcionális jellemzőket mutatott; a TI < 3 értékkel rendelkező mikrogliák lényegesen aktívabban fagocitáltak, mint a ramifikált formák (TI > 3).
3) A makrofág/mikroglia markerek a fejlődő tenyészetben különböző mikroglia fenotípusokhoz lokalizálhatók. HLA DP, DQ, DR-pozitív mikroglia kizárólag amőboid és csak a fiatal tenyészetekben van jelen. A tenyésztés során végig megfigyelhető CD11b/c-jelölt sejtek kevésbé ramifikáltak, mint az Iba1-jelölt mikrogliák. DIV10-nél idősebb tenyészetben a CD11b/c-pozitív mikroglia már nem expresszált HLA antigéneket.
4) A CaM a kevert és tiszta sejttenyészetek amőboid és a ramifikált mikrogliáiban különböző módon lokalizálódott. A legerősebb CaM immunreaktivitás az amőboid formában volt jelen, ahol a perinukleáris régió mutatta a legintenzívebben immunjelet.
5) A CaM inhibitorok tiszta mikroglia kultúrában a sejtek számos morfológiai és funkcionális jellemzőjét befolyásolták. Kimutattuk, hogy a CALMID és TFP eltérően fejti ki hatását a CaM és az Iba1 fehérjék intracelluláris eloszlására és expressziójára, illetve az aktin citoszkeleton reorganizációjára mind a sejttestben, mind a nyúlványokban.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Gulya Károlynak, az SZTE ÁOK-TTIK Sejtbiológia és Molekuláris Medicina Tanszék vezetőjének irányítását és értékes segítségét. Hálásan vagyok munkatársaimnak Dulka Karolinának, Ambrus Zsuzsának és Daranyi Olgának a kísérleteimhez nyújtott segítségükért. Munkámat az Európai Kohéziós Alapok forrásaiból a Nemzeti Fejlesztési Minisztérium finanszírozta [TÁMOP-4.2.1.B-09/1/KONV-2010-0005 és TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0052]. Ajánlom ezt a munkát a családomnak támogatásukért és szeretetükért.

A tézishez kapcsolódó tudományos publikációk:

1) Szabo M, Gulya K (2013) Development of the microglial phenotype in culture. *Neuroscience* 241:280-295. (IF: 3.327)

2) Szabo M, Dulka K, Gulya K (2016) Calmodulin inhibition regulates morphological and functional changes related to the actin cytoskeleton in microglial cell cultures. *Brain Research Bulletin* 120:41-57. (IF: 2.718 – legfrissebb adat 2014-re van)

A tézishez kapcsolódó poszterek:

1) Szabo M, Gulya K (2009) Glial cell population dynamics in vitro. *Euroglia 2009. 9th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease Paris, France, 2009. Glia 57:S29-30.*

2) Gulya K, Szabo M (2011) Development of the microglial phenotype *in vitro. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, 2011. D085.*

3) Gulya K, Szabo M (2012) Calmodulin in cultured microglial cells. *8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, Spain, 2012. A46-430 vol. 7, p. 025.17.*

4) Szabó M, Gulya K (2012) Development of the microglial phenotype in embryonic rat forebrain cultures. *IBRO International Workshop, Szeged, Hungary 2012. Ideggyógy Sz 2012 65(S1):63.*

5) Dulka K, Szabo M, Gulya K (2015) Calmodulin inhibition affects proliferation and cell viability in unchallenged and LPS-challenged pure microglial cultures. *XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Bilbao, Spain, 2015. Glia 63:E95.*