

PHD ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A KALMODULIN GÉNEXRESSZIÓ FUNKCIONÁLIS
VIZSGÁLATA ÉS A HMAX ÉRTÉK SZÁMÍTÁSA
PATKÁNYAGYI RÉGIÓKBAN**

VIZI SÁNDOR

TÉMAVEZETŐ:
DR. GULYA KÁROLY
TANSZÉKVEZETŐ EGYETEMI TANÁR

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATTANI ÉS SEJTBOLÓGIAI TANSZÉK

SZEGED
2000

BEVEZETÉS

Az eukarióta élőlényekre általánosan jellemző sejtszintű kommunikációs forma a Ca^{2+} -jelátvitel. A Ca^{2+} -jelátvitel esetében az információt az intracelluláris szabad Ca^{2+} -koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) tér és időbeli változásai kódolják. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -változások kialakításában alapvető szerepet játszanak azok az ionpumpák, ioncserélők és ioncsatornák, amelyek a transzmembrán Ca^{2+} -grádiensek létrehozásáért, fenntartásáért és megváltoztatásáért felelősek. A transzmembrán Ca^{2+} -grádiensek változásai által kialakított Ca^{2+} -jelek lokális módosításában, és azoknak a fehérjeszintű kölcsönhatások szintjére történő átvitelében (mediálásában) az ún. Ca^{2+} -kötő fehérjék játszik az elsődleges szerepet. A Ca^{2+} -kötő fehérjék közé számos fehérjecsalcád tartozik, amelyek közül a legismertebb az "EF-hand" típusú Ca^{2+} -kötő fehérjéké. A "EF-hand" típusú Ca^{2+} -kötő fehérjéket funkciójuk alapján hagyományosan két csoportra osztják: az ún. "trigger" fehérjékre, amelyek a Ca^{2+} -ok megkötése következtében előbb maguk is konformációváltozáson mennek át, hogy ezután más – gyakran enzimaktivitással rendelkező – fehérjékhez kötődve azok aktivitását módosítsák, és az ún. "puffer" fehérjékre, amelyeknek az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedésének mérséklésén kívül egyéb szerepe nincs, illetve nem ismert. A "trigger" fehérjék közé tartoznak az intracelluláris Ca^{2+} -jelek mediátorai is, amelyek közül az élővilágban a legáltalánosabban előforduló a kalmodulin (CaM).

A CaM 148 aminosavból álló, 17 kDa molekulatömegű, savas jellegű, hőstabil fehérje, amely négy "EF-hand"-doménből épül fel. A CaM valamennyi eukarióta sejtben megtalálható, és olyan alapvető folyamatok irányításában vesz részt, mint a sejtszétválás, a motilitás, a szekréció, továbbá az ioncsatornák és a génexpresszió szabályozása. Különösen fontos feladatot lát el a CaM az ún. ingerlékeny sejt típusokban, amelyekben a Ca^{2+} -jelátvitel kitüntetett szereppel bír mind a lokális, mind a sejtszintű aktivitás szabályozásában, és a két szabályozási szint összekapcsolásában. A CaM-nak az idegsejtekben betöltött funkciója élénk kutatás tárgyát képezi: az ezirányú vizsgálatok a CaM-nak a Ca^{2+} -ok megkötése nyomán bekövetkező konformációváltozásának jellemzésétől a CaM-aktivitás

szabályozásának feltárásán keresztül a CaM szubsztrátjainak azonosításáig terjednek.

A CaM-aktivitás szabályozása több szinten valósul meg: (a) a CaM hírvivő RNS-ek (mRNS-ek) szintézisének, érésének, lokalizációjának és lebontásának szintjén, (b) a CaM fehérje szintézisének, transzportjának és lebontásának szintjén, valamint (c) a CaM fehérje poszttranszlációs módosításának szintjén. A gerincesek CaM génextpressziójának szabályozását illetően meghatározó, hogy a gerinceseknél a CaM vonatkozásában a "több gén – egy fehérje" elv érvényesül. Az egyedüli CaM fehérjével szemben a gerincesekben három működő CaM gént azonosítottak, amelyek a nomenklaturában a CaM I, CaM II, és CaM III elnevezést kapták. A gerincesek genomjában a természetes szelekció körülményei között is fennmaradt három, egyazon fehérjét kódoló, tehát látszólag redundáns CaM gén. Ezt a tényt jól magyarázza az a feltevés, amely szerint az egyes CaM génekhez különböző, a másik két CaM gén által legfeljebb részben pótolható funkció rendelhető. Ezt a hipotézist megerősítik azok a kísérleti adatok, amelyek szerint a gerincesek genomjában működő CaM gének mind transzkriptumaik intracelluláris lokalizációját, mind cisz-szabályzó régióik felépítését, mind expressziós szabályozásukat tekintve különböznek egymástól. Az egyes CaM gének eltérő körülmények között játszott szerepének megértését az gátolja, hogy nem vagy kevéssé ismert(ek) (a) az egyes CaM gének szabályozásáért felelős molekuláris mechanizmusok, (b) az egyes CaM gének expressziós változásai különböző körülmények között, és (c) az egyes CaM-mRNS osztályok mennyiségbeli arányai megváltozásának jelentősége.

Az mRNS molekulák kvantitálása történhet hagyományos *ex vivo* kvantitálási módszerekkel, ám ha a kvantitáláshoz csak kis mennyiségű szöveti minta áll rendelkezésre, akkor előnyt élveznek az olyan szövettani technikák, mint az *in situ* hibridizáció (ISH). A relatív kvantitáláshoz céljából végzett ISH kísérletekben általános a nem-telítési komplementer RNS (cRNS) próbakonzentráció használata. Ugyanakkor a hibridizációs jelölődési értékek nem-telítési cRNS próbakonzentrációnál mérhető változásairól nem igazolt, hogy szövetben végzett hibridizációk esetén is hűven tükrözik a telítési cRNS próbakonzentrációnál mérhető változásokat. A heterogén szövetek egyes régióira jellemző maximális hibridizációs kapacitásoknak (Hmax-oknak, vagyis az mRNS-tartalmakra vonatkozó

becsléseknek) a nem-telítési cRNS próbakonzentrációnál mérhető hibridizációs jelölődésekből történő pontos és egyidejű becslését a megfelelő módszer hiánya akadályozza.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Génspecifikus CaM I, CaM II és CaM III cRNS próbák tervezése és elkészítése.
2. A krónikus etanolkezelés és -megvonás hatására a CaM I, CaM II, és CaM III mRNS-ek regionális mennyiségeiben bekövetkező változások relatív kvantitálása patkányagyban. A CaM gének expressziós szabályozásában mutatkozó különbségek meghatározása.
3. A krónikus etanolkezelésre és az etanolmegvonásra a CaM mRNS-ek szignifikáns mennyiségi változásával válaszoló agyterületek meghatározása és összehasonlítása egy-egy CaM gén esetében, illetve mindhárom CaM gén adatait összevetve. Az etanolkezelésre és -megvonásra reagáló agyterületek által kijelölt funkcionális idegi rendszerek azonosítása, és összevetése az etanol hatására más kísérletekben érzékenynek bizonyult rendszerekkel.
4. A CaM I, CaM II, és CaM III mRNS-eknek a génspecifikus CaM cRNS próbákra vonatkozó, agyterületenkénti disszociációs konstans (Kd) értékének meghatározása és összehasonlítása.
5. Annak igazolása, hogy a ISH jelölődési értékek nem-telítési cRNS próbakonzentrációnál mérhető változásai híven tükrözik a telítési cRNS próbakonzentrációnál mérhető változásokat.
6. A különböző agyterületek Hmax értékeinek – a telítési jel tényleges megmérése nélküli – számítására szolgáló módszer kidolgozása és tesztelése.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok és kezelésük

A kísérletekhez standard körülmények között tartott hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk. A krónikus etanolkezeléshez az állatokat három, egyenként öt állatból álló csoportra osztottuk. Az etanolos és a megvonásos csoport három hétig csak 5,0 % etanolt tartalmazó folyékony tápot fogyasztathatott *ad libitum*, míg a kontroll csoport ezalatt izokalorikus kontroll folyadéktápot kapott. A megvonásos csoport folyékony etanolos tápját az állatok feláldozása előtt 12 órával kontroll folyadéktápra cseréltük. Az állatok átlagos súlya 224 ± 13 g volt a kezelés előtt, és 293 ± 23 g-ra nőtt a harmadik hét végére. Az állatokat a háromhetes kísérleti kezelés után áldoztuk fel. A módszertani kísérletekhez 260 ± 10 g súlyú hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk. Az állatokat éteres altatásban dekapitáltuk, majd az agyakat beágyaztuk és -70 °C-on azonnal megfagyasztottuk. Az agyakból 15 μ m vastag koronasíku kriosztát metszeteket készítettünk.

cRNS próbák és in situ hibridizáció

A CaM I, CaM II és CaM III mRNS-ek 3'-nemkódoló régióinak az első poliadenilációs szignálokig terjedő szakaszait választottuk cél-szekvenciáknak. Az ezen szakaszoknak megfelelő genomikus szekvenciákat polimeráz láncreakcióval (PCR) amplifikáltuk. A PCR termékeket pcDNA3 vektorba ligáltuk, majd azonosságukat szekvenálással ellenőriztük. Az antiszensz és a szensz cRNS próbák szintézisét *in vitro* transzkripcióval végeztük. A reakcióban templátként a megfelelően linearizált vektorokat használtuk. A cRNS próbák radioaktív jelöléséhez használt nukleotid [35 S]-UTP α S volt. A cRNS próbákat tisztítottuk, majd meghatároztuk specifikus aktivitásukat.

A koronális patkányagy-metszeteket szobahőn fixáltuk, pufferben mostuk, prehibridizáltuk, dehidráltuk, majd megszáritottuk. A hibridizációhoz metszetenként 50 μ l-nyi, a cRNS próbát ismert koncentrációban tartalmazó hibridizációs oldatot használtunk. A telítési hibridizációs kísérletekhez sorozatmetszeteket, valamint a hibridizációs oldatokból készített felező hígítási

sorokat használtunk. A hibridizációt nedves kamrában, 45 °C-on, 21±1 órán át végeztük. Ezután a metszeteket 50% formamidot tartalmazó pufferben többször mostuk, majd 0,5 M NaCl-ot tartalmazó pufferben RNáz A-val kezeltük. A metszeteket ismét mostuk, majd dehidráltuk és megszáritottuk.

Autoradiográfia, képanalízis, adatfeldolgozás és mikroszkópia

Membrán és agypaszta radioaktív standard skálákat készítettünk a cRNS próbák felező hígításainak felhasználásával. Az agypaszta skálákat a membrán skálákkal, a membrán skálákat pedig az agypaszta skálákkal vagy a hibridizált patkányagy-metszetekkel együtt foszforernyőkre exponáltuk. Kiválasztott metszeteket fotoemulzióval vontunk be, majd ezeket is exponáltuk.

A foszforernyőkön kialakult képeket 600 × 600 dpi képfelbontással rögzítettük. A detektáló rendszer lineáris érzékenységét a radioaktív skálák segítségével igazoltuk. A digitális képek elemzésére az OptiQuant 3.0 szoftvert használtuk. A képeken körülhatároltuk az egyes agyterületeket, majd meghatároztuk azok autoradiográfias jelölődésének erősségét. Az etanolkezelés és -megvonás hatását vizsgáló kísérletben ezt az értéket korrigáltuk a foszforernyő- és a szöveti háttérre, valamint a radioaktivitás csökkenésére. Minden kísérleti állapot minden vizsgált agyterületére vonatkozóan két független mérést végeztünk, így a közölt értékek 8-10 független mérés átlagai (n = 8-10). A kísérleti állapotok mindhárom csoportja esetében az egyes agyterületek jelölődési értékeinek átlagát a megfelelő agyterület kontroll csoportban mért jelölődési értékei átlagának százalékában fejeztük ki.

A módszertani kísérletekben az agyterületek jelölődésének kvantitálására alkalmazott lépések az alábbi egyenletben összegezhetők:

$$RES = (LAB \times AVO) / (LRF \times RDF \times SPA)$$

ahol a RES a cRNS próba ISH kópiaszám/mm² értéket, a LAB a jelölődési erősséget (nettó dlu/mm²), az AVO az Avogadro számot (6,2252 × 10²³ kópiaszám/mol), az LRF a membrán standard skálára vonatkozó, a jelölődési erősség és a radioaktivitás viszonyát leíró faktort [(nettó dlu/mm²)/(cpm/mm²)], az RDF a radioaktív bomlási faktort, és az SPA a cRNS próba specifikus aktivitását (cpm/pmol) jelöli. A szöveti

háttérkorrekciót a cRNS próbák specifikus aktivitásának figyelembevételével végeztük. Végeredményként az agyterület foszforemnyő- és szöveti háttérre korrigált (nettó) RES értékét kaptuk cRNS próba ISH kópiaszám/mm² egységben, amit az agyterület cél-mRNS kópiaszám/mm² értékére vonatkozó becslésnek tekintettünk

A telítési görbék készítéséhez és a Hmax értékek kiszámításához a GraFit 3.0 szoftvert használtuk. A Hmax értéket a cél-mRNS-ek egyetlen osztálya maximális hibridizációs kapacitásaként definiáltuk (cRNS ISH kópiaszám/mm² egységben) és egyszerű/robusztus súlyozással készített telítési görbékből határoztuk meg a következő egyenlet segítségével:

$$y = (H \times L) / (Kd + L),$$

ahol az y a hibridizált [³⁵S]-cRNS próbát (kötött ligand; ISH kópiaszám/mm² egységben), a H a cRNS próba hibridizálására való kapacitást (Hmax érték, ISH kópiaszám/mm² egységben), a Kd a disszociációs konstansot, és az L a nem-hibridizált [³⁵S]-cRNS próba (a szabad ligand) koncentrációját jelöli. Az agyterületek telítési kísérletekben meghatározott régióspecifikus CaM I, CaM II, és CaM III mRNS-szintjeire vonatkozó becsléseknél n = 3, a nem-telítési hibridizációkból számított hibridizált cRNS próba értékeknél n = 5.

Az adatfeldolgozást, a lineáris regressziót és a statisztikai analízist heteroscedasztikus (a két adatcsoport eltérő varianciáját feltételező), kétmintás Student t-tesztel végeztük. Egy adott agyterület kontroll, etanolos és megvonásos csoportnak megfelelő relatív mRNS-szint értékeit, illetve az agyterület telítéssel és a számítással meghatározott mRNS-szint értékeit akkor tekintettük különbözőnek, ha a p értéke kisebb volt, mint 0,05.

Az emulziós metszeteket előhívás után Leica DM LB fénymikroszkóppal, sötét látótérben vizsgáltuk. A fénymikroszkópos felvételeket Polaroid DMC 1 digitális mikroszkópkamera és Power Macintosh 9500/120 személyi számítógép segítségével készítettük.

EREDMÉNYEK

1. Az CaM I, CaM II, és CaM III géneknek megfelelő mRNS-osztályokra specifikus cRNS próbákat készítettünk.
2. A kontroll, a krónikus etanolkezelést kapott, és az etanolmegvonásban részesült kísérleti csoportoknál a patkányagy 36 területén meghatároztuk a CaM I, a CaM II, és a CaM III mRNS-eknek a megfelelő kontroll értékre normalizált regionális mennyiségeit. A legmarkánsabb expressziós változások mértéke meghaladta az 50%-ot (a CaM I mRNS-szint a nucleus arcuatusban 158 % és 154 % volt a kontrollhoz viszonyítva a krónikus etanolkezelés, illetve -megvonás esetében). A krónikus etanolkezelés és az etanolmegvonás által kiváltott expressziós válaszok iránya egy kiválasztott CaM gént tekintve szinte minden agyterületen azonos volt. Egy kiválasztott CaM gén expressziós szabályozását vizsgálva az következetesen hasonló volt a különböző agyterületeken: az alkalmazott kezelésekre a CaM I és a CaM III mRNS-ek mennyisége nőtt, a CaM II mRNS-eké pedig csökkent csaknem az összes érintett agyi régióban. A három CaM gén expressziós szabályozása az alkalmazott kísérleti körülmények között különbözőnek bizonyult. Vizsgálatunkban a CaM I és CaM II gének élénkebb és eltérő, ugyanakkor a CaM III gén mérsékelt (a háztartási jellegű fehérjék génjeire jellemző szabályozásnak megfelelő) expressziós választ tapasztaltuk. A CaM gének általunk észlelt független szabályozása összhangban van a CaM génexpresszióra vonatkozó hipotézissel.
3. Meghatároztuk a krónikus etanolkezelésre, illetve az etanolmegvonásra a CaM mRNS-ek regionális mennyiségének szignifikáns változásával reagáló agyterületeket. Ezek egy kiválasztott CaM gént vizsgálva részben átfedő halmazokat alkottak, a különböző CaM gének adatait összevetve pedig szinte teljesen különbözőek voltak. Azonosítottuk az érintett agyterületek által kijelölt funkcionális idegi rendszereket. Ezek az idegrendszer érző, motoros és limbikus

rendszerei voltak, amelyek az etanol hatására más kísérletekben érzékenynek bizonyultak.

4. Meghatároztuk a CaM I, CaM II, és CaM III mRNS-re nézve különböző Hmax értékekkel rendelkező vizsgált agyterületek Kd értékeit. A Kd értékek nem különböztek egymástól szignifikánsan a telítéshez elegendő hibridizációs idő alkalmazása esetén.
5. A Kd értékek azonosságából levezettük, hogy a különböző agyterületek hibridizált cRNS próba értékeinek arányai megegyeznek a megfelelő Hmax értékek arányaival bármely kiválasztott cRNS próba koncentrációnál végzett hibridizáció esetén. Ezek szerint az ISH jelölődési értékek nem-telítési cRNS próbakonzentrációnál mérhető változásai híven tükrözik a telítési cRNS próbakonzentrációnál mérhető változásokat. Ez igazolja a relatív kvantifikálás céljából végzett ISH kísérletek jogosságát, és előfeltétele a Hmax értékek hibridizált cRNS értékekből történő számításának.
6. Kidolgoztunk és sikeresen teszteltünk egy módszert a különböző agyterületek Hmax értékeinek a telítési jel tényleges megmérése nélküli számítására. A telítési agyterületek Hmax értékeit a nem-telítési cRNS próba koncentrációnál mért hibridizált cRNS próba értékek függvényében ábrázoló kalibrációs grafikon segítségével pontosan számíthatók voltak az agyterületek Hmax értékei.

ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálatainkban a krónikus etanolkezelés és az etanolmegvonás – mint külső stimulusok – hatását vizsgáltuk a három CaM mRNS-osztály regionális mennyiségeire patkányagyban. Génspecifikus CaM I, CaM II, és CaM III cRNS próbákat készítettünk, és ezekkel meghatároztuk a fenti stimulusokra a CaM mRNS-ek regionális mennyiségének szignifikáns változásával reagáló agyterületeket, valamint az ezek által kijelölt agyi rendszereket. Számos agyterületen a három CaM gén eltérő expressziós szabályozást mutatott. Ugyanakkor egy kiválasztott CaM gént vizsgálva, annak szabályozását következetesen hasonlóan találtuk a különböző agyterületeken. A krónikus etanolkezelés és az etanolmegvonás által kiváltott expressziós válaszok iránya egy kiválasztott CaM gént tekintve szinte minden agyterületen azonos volt. Kísérleti eredményeink egyrészt felhasználhatók az etanol idegrendszeri hatásának jellemzéséhez, másrészt összhangban állnak azzal a hipotézissel, amely eltérő funkciókat rendel a különböző CaM génekhez. Ezen hipotézis igazolása, illetve a gerincesek genomjában előforduló három CaM gén működésének megismerése azonban csak további vizsgálatok útján lehetséges.

Módszertani vizsgálatunkban a patkányági régiók CaM génexpresszióját, mint modellrendszert használva igazoltuk, hogy a CaM mRNS-eknek a megfelelő cRNS-ekre vonatkoztatott K_d értékei nem különböznek egymástól a vizsgált agyterületeken. Ebből levezethető volt az a következtetés, hogy a nem-telítési cRNS próbakoncentrációnál mérhető jelölődési értékek változásai megegyeznek a telítési cRNS próbakoncentrációnál mérhető változásokkal. Ennek alapján kifejlesztettünk egy olyan eljárást, amellyel számíthatók egy heterogén szövet egyes régióira az adott kísérleti keretek között jellemző H_{max} értékek a telítési cRNS próba koncentrációnál mérhető jelölődés ismerete nélkül. Mivel a kvantitálás alapelvei a módszertani határokon túl is érvényesek, a bemutatott eljárás nem csupán különféle nukleinsav próbák, szövetek és detektálási rendszerek alkalmazásával végzett ISH kísérletekben, hanem más szövettani technikák esetén is hasznosnak bizonyulhat.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Vizi S., Palfi A. and Gulya K., Multiple calmodulin genes exhibit systematically differential responses to chronic ethanol treatment and withdrawal in the rat brain, *Mol. Brain Res.*, elfogadva, 2000. *Impakt faktor (1998): 2,475.*
2. Vizi S. and Gulya K., Calculation of Maximal Hybridization Capacity (Hmax) for Quantitative In Situ Hybridization: a Case Study for Multiple Calmodulin mRNAs, *J. Histochem. Cytochem.* 48: 893-904, 2000. *Impakt faktor (1998): 2,536.*
3. Palfi A., Vizi S. and Gulya K., Differential distribution and intracellular targeting of mRNAs corresponding to three calmodulin genes in rat brain: a quantitative in situ hybridization study, *J. Histochem. Cytochem.* 47: 583-600, 1999. *Impakt faktor (1998): 2,536.*

Kumulatív impakt faktor: 7,547.

Az értekezés témájához kapcsolódó kongresszusi poszterek, előadások

1. Sarnyai, Z., Vizi, S., Palfi, A., Gulya, K., Nestler, E. J., Olivier, B., BDNF and Calmodulin-II mRNA expression in the mouse brain in response to kainic acid treatment, an animal model of glutamate neurotoxicity and temporal lobe epilepsy, poster, *Soc Neurosci Abstr*, 2000
2. Vizi, S. and Gulya, K., A Novel Method in Quantitative In Situ Hybridization: Calculation of the Maximal Hybridization Capacity for Multiple Calmodulin mRNAs, poster, *Seventh Annual Meeting of the Hungarian Neuroscience Society*, Budapest, 2000

3. Gulya, K. and Vizi, S., A Novel Method in Quantitative In Situ Hybridization: Calculation of the Maximal Hybridization Signal (Hmax) for Multiple Calmodulin mRNAs, Soc Neurosci Abstr, Vol 25, Part 1, p 84.12, 1999
4. Pálfi Árpád, Vizi Sándor és Gulya Károly, Calmodulin génexpresszió krónikus dehidrációt követően a patkány agyban, poszter, magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 3. Munkaértekezlete, Sárospatak, 1998
5. Palfi, A., Vizi, S. and Gulya, K., CaM Gene Expression in the Rat Brain, poster, Fifth Annual Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, Debrecen, 1998
6. Gulya, K., Palfi, A. and Vizi, S., Differential Regulation of Calmodulin Gene Expression in the Rat Brain, Soc Neurosci Abstr, Vol 23, Part 1, p 390.11, 1997
7. Gulya Károly, Pálfi Árpád és Vizi Sándor, Calmodulin gének expressziójának összehasonlító vizsgálata patkány agyban, előadás, Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 2. Munkaértekezlete, Lillafüred, 1997
8. Pálfi, Á., Vizi, S. and Gulya, K., Calmodulin Gene Expression in Rat Brain, poszter, Magyar Anatómus Társaság IX. Kongresszusa, Szeged, 1997
9. Pálfi, Á., Leprán, I., Vizi, S., Pataricza, M., Tekulics, P., Papp, Gy., and Gulya, K., Studies on Calmodulin II. Gene Expression in Ischemic Heart and Brain, poster, Joint Meeting of the Hungarian Physiological Society and the Romanian Society of Physiological Sciences, 1996, Fiziologia (Physiology), Vol 6 Nr 2 (10) p 20, 1996
10. Palfi, A., Lepran, I., Vizi, S., Pataricza, M., Tekulics, P., Gulya, K., Studies on Calmodulin II. and Parvalbumin Gene Expressions in Ischemic Brain and Heart, poszter, Third Annual Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, Balatonfüred, 1996, in Neurobiology, Vol 4, p 357, 1996

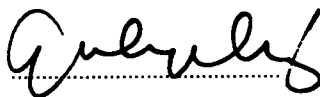
11. Vizi, S., Palfi, A., Gulya, K., Studies on the Gene Expression of Calcium-Binding Proteins in Rat Brain, Third Annual Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, Balatonfüred, 1996, in Neurobiology, Vol 4, p 389, 1996

TÁRSSZERZŐI LEMONDÓ NYILATKOZAT

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

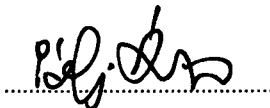
Szeged, 2000. augusztus 17.

Dr. Gulya Károly



.....

Dr. Pálfi Árpád



.....