

Kalmodulin génexpresszió a központi idegrendszer alacsony
kópiaszámú kalmodulin mRNS tartalmú területein

Kovács Beatrix

Témavezető: dr. Gulya Károly

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Állattani és Sejtbiológiai Tanszék

2003

Tartalomjegyzék

	Oldal
Rövidítések jegyzéke	2
Összefoglalás	4
Bevezetés, irodalmi előzmények	6
In situ hibridizáció	6
A CaM és célfehérjei, szerepük a neuronális szignalizációban	7
A CaM gének és expressziójuk a központi idegrendszerben	9
CaM génexpresszió a gliasejtekben	11
CaM génexpresszió a retinában	12
Célkitűzések	14
Anyagok és módszerek	15
Kísérleti állatok és szöveti előkészítés	15
cRNS próbák	15
Radioaktív in situ hibridizáció	17
Nemradioaktív (színes) in situ hibridizáció	17
Képanalízis	18
Eredmények	20
In situ hibridizációs módszerek összehasonlítása az alacsony	
CaM mRNS tartalmú gerincvelői fehérállományban	20
CaM mRNS tartalmú sejtek lokalizálása a gerincvelőben	20
A CaM génexpresszió feltérképezése a felnőtt retinában	28
Megbeszélés	31
Összegzés	38
Felhasznált irodalom	40
A disszertáció anyagát alkotó saját közlemények	52
Köszönetnyilvánítás	53
A disszertáció magyar nyelvű összefoglalója	54
A disszertáció angol nyelvű összefoglalója	58
A saját közlemények másolatai	62

Rövidítések jegyzéke

bp	bázispár
BCIP	5-bromo-4-kloro-3-indoil-foszfát
Ca^{2+}	kalcium
CaM	kalmodulin
$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$	kalciumkötött kalmodulin
CaM I, II, III	kalmodulin gének
CaM-KI, II, III, IV	kalmodulin kináz I, II, III és IV enzimek
cGMP	ciklikus guanil monofoszfát
cpm	detektált radioaktív bomlások száma másodpercenként
cRNS	komplementer ribonukleinsav
dc	dorzális oszlop
DIG	digoxigenin
GCL	ganglionsejt réteg
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezinukleotid 5'-foszfát
DTT	ditiotreitol
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
INL	belső nukleáris réteg
IO	fotoreceptor belső és külső szegmensek
IPL	belső plexiform réteg
ISH	in situ hibridizáció
kDa	kilodalton
lc	laterális oszlop
LTD	hosszú távú depresszió
LTP	hosszú hatású potenciáció
μg	mikrogramm
MgCl_2	magnézium-klorid
mg	milligramm
mRNS	hírvivő ribonukleinsav
NaCl	nátrium-klorid

NBT	nitrokék-tetrazolium
ONL	külső nukleáris réteg
OPL	külső plexiform réteg
PCR	polimeráz láncreakció
pmol	pikomol
RPE	retinális pigment epitélium
SDS	nátrium-laurilszulfát
SSC	nátrium-citrát és nátrium-klorid elegye
SSPE	nátrium-klorid, nátrium-foszfát és dinátrium-EDTA elegye
TRIS	tris-hidroximetil-aminometán
tRNS	transzfer ribonukleinsav
vc	ventrális oszlop

Összefoglalás

A kalmodulin (CaM) fehérje rendkívül összetett szerepet játszik a sejtek citoplazmikus folyamatainak szabályozásában és – az idegsejtek szignalizációs folyamataiban betöltött fontos szerepe miatt – az idegrendszer egészének működésében. Míg az idegszövetben általában közepes vagy nagy koncentrációban van jelen a CaM fehérje, egyes központi idegrendszeri területek (gerincvelő, retina) az átlagosnál jóval alacsonyabb mennyiségben tartalmazzák, sőt a három CaM gén transzkriptumainak mennyisége is kisebb. A gerincvelő és a retina különböző neuron- és gliasejttípusaiban történő CaM génexpresszió jellemzőiről – a bennük található viszonylag kis mennyiségű CaM mRNS tartalom miatt – kevés információval rendelkezünk. Vizsgálataink első szakaszában ezért egy olyan, enyhén alkalikus pH-t alkalmazó, digoxigenin (DIG)-jelölt ribopróbákat felhasználó in situ hibridizációs eljárást fejlesztettünk ki, amelynek alkalmazása lehetővé tette a szövetben alacsony kópiaszámban jelenlévő mRNS tartalom kimutatását. Módszerünket a CaM gének mRNS populációinak detektálásával teszteltük két olyan központi idegrendszeri régióban, amelyekben a CaM mRNS-ek szokatlanul alacsony koncentrációban vannak jelen: a gerincvelőben és a retinában. A CaM mRNS-ek lokalizálását a gerincvelőben alacsony koncentrációjuk mellett a szövet igen magas lipidtartalma is nehezíti; módszerünket itt is sikerrel alkalmaztuk.

A gerincvelőben morfológiájuk alapján két kalmodulint expresszáló sejttípust detektáltunk. A közepes méretű, asztrocita típusú sejtek, amelyek zömmel a gerincvelő dorzális oszlopában helyezkednek el, differenciált CaM génexpressziót mutattak: ezekben a sejtekben a CaM I mRNS tartalom volt a legnagyobb, ezt követte a CaM III, majd a CaM II mRNS populációk mennyisége. Az oligodendrociták CaM génexpressziója – a dorzális és a laterális oszlopokban egyaránt – kevésbé különbözött egymástól, bár a CaM I mRNS kissé erősebb jelölődést mutatott. A kapott eredmények azt mutatják, hogy 1) a CaM génexpresszió a gerincvelőben gazdagabb és sokkal összetettebb, mint azt korábban a hagyományos radioaktív in situ hibridizációs technikákkal sejteni lehetett, 2) érzékeny módszert használva több CaM mRNS-t tartalmazó sejttípus mutatható ki, így a gliasejtek is, annak ellenére, hogy ezek a sejtek lipidgazdag környezetben helyezkednek el, és e sejtek CaM mRNS tartalma más sejtekénél jóval alacsonyabb.

A neurális retina alacsony lipidtartalmú idegszövet, amelyben a korábbi, viszonylag alacsony szenzitivitású in situ hibridizációs módszerek nem mutattak ki CaM expresszáló

sejteket, annak ellenére, hogy immuncitokémiai módszerekkel a CaM protein jelenlétét számosan bizonyították. Érzékeny in situ hibridizációs módszerünkkel kimutattuk a különböző CaM mRNS populációk jelenlétét a felnőtt patkány retinában, s megállapítottuk, hogy az egyes CaM gének expressziója közel azonos. Ez a megfigyelés azért érdemel figyelmet, mert tudomásunk szerint így a retina az egyetlen olyan központi idegrendszeri terület, amelyben a CaM génexpresszió nem differenciált. Noha az egyes CaM gének rétegspecifikus megoszlása nagyon hasonló, a CaM génexpresszió az egyes rétegek között jelentősen változik. A legerősebb jelölődés a ganglionsejtek rétegében és a belső nukleáris rétegben (itt a belső szublamina) volt. Közepes erősségű szignál intenzitások voltak megfigyelhetők a külső és a belső plexiform rétegekben, a külső határoló hártya közelében és a retinális pigment epitéliumban. Nagyon alacsony jel volt jellemző a külső nukleáris és a fotoreceptor belső szegmens rétegekre. Nem volt detektálható specifikus jel a fotoreceptor külső szegmensében.

Összefoglalva, szenzitív in situ hibridizációs módszerünk alkalmas volt a központi idegrendszer két területén – a gerincvelő fehérállományában és a retinában, egy magas és egy alacsony lipidtartalmú területen – az alacsony koncentrációban jelenlévő CaM mRNS populációk kimutatására. Eredményeink várhatóan hozzájárulnak a CaM fehérje, illetve a CaM génexpresszió funkcionális jelentőségének megértéséhez ezekben a régiókban.

Bevezetés, irodalmi előzmények

In situ hibridizáció

Az elmúlt negyedszázadban a nukleinsav-duplexképződésen alapuló hibridizációs módszerek egyre inkább elterjedtek nem csupán a biomedikális alap- és alkalmazott kutatásokban, de a klinikai gyakorlatban is. A radioaktív nukleotidokkal vagy más módon (kromofór, antitest stb.) jelölt ribo- vagy dezoxiribopróbáknak a szöveti (vagy szövetből kivont) nukleinsav-tartalommal történő hibridizációja a sejt saját vagy exogén eredetű nukleinsav-populációit detektálja nagy érzékenységgel és sejtszintű vagy intracelluláris lokalizációval (Durrant és mtsai, 1995; Palfi és mtsai, 1998; Roberts-Lewis és mtsai, 1990; Senatorov és Trudeau, 1997). Míg az oligonukleotid próbák specifikusak és könnyen szintetizálhatók, használatuk leginkább a szövetben nagy mennyiségben jelenlévő mRNS tartalom detektálására alkalmas (például virális transzkriptumok) paraffinba ágyazott metszetekben, vagy közepes mennyiségben jelenlévő mRNS-ek kimutatására fagyasztott vagy utófixált metszetekben. A ribopróbák nagyfokú specificitásuk, a célszekvenciák széles koncentrációtartományában való felhasználhatóságuk és könnyű kvantitálhatóságuk miatt az utóbbi években szinte teljesen kiszorították a gyakorlatból az oligopróbákat (Vizi és mtsai, 2001).

A szöveti mRNS tartalom ribopróbákkal történő lokalizációját számos tényező befolyásolhatja. Így a gerincvelő fehérállományában például a szövet magas lipidtartalma és/vagy a nagy mennyiségben jelenlévő mielinizált struktúrák nehezíthetik a próba penetrációját és a szöveti mRNS populációk detektálását, de a nagyon alacsony mRNS tartalom vagy a próba számára nem megfelelő konformációban levő szöveti mRNS is nehezítheti a hibridizációt. Bár a próba penetrációjának javítására kidolgozott módszerek – a szövet lipidtartalmának csökkentése (Hrabovszky és Petersen, 2002), a szövet részleges enzimatisz emésztése (Relf és mtsai, 2002) vagy a szövet hőkezelése (Eastwood és Harrison, 1999; Mitchell és mtsai, 2001) – általánosan elterjedtek, nem minden szövetben vagy protokoll esetében használhatók (Lan és mtsai, 1996; Norton és mtsai, 1994; Oliver és mtsai, 1999). A fentiekhez hasonlóan az elmúlt években számos módszert dolgoztak ki a szövetben alacsony koncentrációban jelenlévő mRNS tartalom detektálására is, így például a tiramid szignál amplifikáció (Bobrow és mtsai, 1991, 1992; Yang és mtsai, 1999; Zaidi és mtsai, 2000), a szöveti mRNS tartalom hozzáférhetővé tételét elősegítő mikrohullámú melegítésen (Mitchell és mtsai, 2001),

autoklávozáson (Eastwood és Harrison, 1999), vagy az alkalikus pH tartományban végzett fixáláson (Basyuk és mtsai, 2000) alapuló technikákat. Munkánk során olyan, nagy szenzitivitású in situ hibridizációs módszert kívántunk kifejleszteni, amelyik alkalmas az alacsony koncentrációjú CaM mRNS populációk detektálására mind lipidszegény (retina), mind lipidgazdag (gerincvelő fehérállománya) központi idegrendszeri területen.

A CaM és célfehérjéi, szerepük a neuronális szignalizációban

A CaM fehérje egy sokfunkciós intracelluláris kalcium (Ca^{2+})-receptor protein, amely minden eukarióta sejttypusban megtalálható, és részt vesz számos, a sejt életében alapvető folyamat szabályozásában (Clapham, 1995; Means és mtsai, 1982). Működési helyét tekintve intracelluláris receptor (Cheung, 1980; Ghosh és Greenberg, 1995; Hoskins és mtsai, 1986; Means és mtsai, 1991), bár újabb vizsgálatok extracelluláris funkciót is kapcsolnak hozzá (Crocker és mtsai, 1988; Goberdhan és mtsai, 1993; MacNeil és mtsai, 1988; Remgard és mtsai, 1995). Fontosságára jellemző, hogy egy átlagos állati sejtben a teljes fehérjetartalom 1%-át is kiteheti. A CaM kis méretű, a gerincesekben 148 aminosavból álló fehérje (Watterson és mtsai, 1980), molekulatömege 16.7 kDa. A protein két doménből áll, amelyek mindegyikén 2-2 Ca^{2+} -kötőhely található (Lin és mtsai, 1974). A Ca^{2+} megkötése okozza azt a konformációváltozást, amely a különböző célmolekulákkal történő interakciókhoz szükséges. A fehérje különösen nagy mennyiségben van jelen az idegszövetben, ahol főként a neuronok perikarionjában (Berry és Brown, 1995; Caceres és mtsai, 1983; Ikeshima és mtsai, 1993; Palfi és mtsai, 1999; Seto-Oshima és mtsai, 1983, 1984, 1987; Sola és mtsai, 1996; Zhou és mtsai, 1985), sejtmagjában (Bachs és mtsai, 1992, 1994) és dendritjeiben fordul elő (Berry és Brown, 1996), ez utóbbiban gyakran jellegzetes granuláris eloszlásban (Kortvely és mtsai, 2003).

Bár a CaM talán egyik legfontosabb, többnyire célfehérjéin át érvényre juttatott szerepe a neurotranszmitterek szintézisében (DeLorenzo, 1982; Fujisawa és mtsai, 1984; Griffith és Schulman, 1988; Kuhn és Lovenberg, 1982) és felszabadításában van (DeLorenzo, 1980; DeLorenzo és mtsai, 1979; Nichols és mtsai, 1990), a fehérje emellett több neuronális funkció szabályozásáért felelős, így például elősegíti az idegsejtek nyúlványainak növekedését, részt vesz az LTP és az LTD kialakításában, valamint szabályozza a mikrotubulusok összeépülését és szétbomlását is (Toutenhoofd és Strehler, 2000). A CaM fehérje szerepe alapvető a sejt Ca^{2+} -homeosztázisának fenntartásában és a különböző Ca^{2+} -áramok kialakításában (Lisman, 1994; Malenka és mtsai, 1989; Nicoll és

mtsai, 1988). A $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ komplex enzimaktivitással nem rendelkezik, ismert viszont több mint húsz olyan enzim, amely általa aktiválódik. Ilyenek a ciklikus (3',5')-nukleotid foszfodiészterázok (Kakiuchi és Yamazaki, 1970; Kakiuchi és mtsai, 1975), az adenilil-ciklázok (Brostrom és mtsai, 1975), a nitrit oxid szintázok (Oh, 1995) és a protein kinázok (Kennedy, 1989; Kennedy és Greengard, 1981). A $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ egyik legfontosabb célenzime azonban a széles szubsztrátspektrummal rendelkező CaM kináz II (Kennedy, 1989; Ouimet és mtsai, 1984), amelyik legnagyobb mennyiségben a posztzinaptikus denzitásban fordul elő (Kelly és mtsai, 1984; Kennedy és mtsai, 1983), ahol a lokális fehérjetartalom 25-50%-át is kiteheti (Miller és Kennedy, 1985). E fehérje szubsztrátjai között szerepelnek Ca^{2+} -csatornák, Ca^{2+} -ATPázok, glutamát receptorok (Kitamura és mtsai, 1993; McGlade-McCulloh és mtsai, 1993), a tubulin, a MAP2 (Kuhn és Lovenberg, 1982) és különböző transzkripciósfaktorok (Schulman és Hyman, 1999). A CaM-KII a posztzinaptikus szignalizáció kulcsfaktora, egyben a memória és tanulás elemi folyamatainak egyik központi eleme (Lisman, 1994). Az idegrendszerben a CaM másik legfontosabb célfehérjéje az egyetlen ismert CaM-aktivált protein foszfatáz, a kalcineurin (Manalan és mtsai, 1984; Price és Mumby, 1999). Közvetlen szubsztrátjainak száma nagyon alacsony, de ezeken keresztül közvetve számos olyan célfehérje defoszforilálásában vesz részt, mint amilyenek az L-típusú Ca^{2+} -csatornák (Armstrong, 1989), a pre- és posztzinaptikus ligandfüggő ioncsatornák (Lieberman és Mody, 1994; Swope és mtsai, 1999; Tong és mtsai, 1995; Victor és mtsai, 1995), illetve befolyásolja az LTP (Lu és mtsai, 1996; Wang és Stelzer, 1994), valamint az LTD (Mulkey és mtsai, 1994) kialakulását is.

A kalmodulin egyéb CaM kinázokon keresztül a sejtmagban zajló folyamatokat is befolyásolja: transzkripciósfaktorok és különböző RNS-kötő fehérjék közvetítésével (Agell és mtsai, 1998; Means és mtsai, 1991; Vendrell és mtsai, 1991) fontos szerepet játszik a sejtciklus (Lu és Means, 1993), a sejtosztódás és a génexpresszió szabályozásában (Corneliussen és mtsai, 1994; Dash és mtsai, 1991; Enslen és Soderling, 1994; Kapiloff és mtsai, 1991; Lerea és McNamara, 1993; Matthews és mtsai, 1994; Rasmussen és mtsai, 1989; Sheng és mtsai, 1991), és így közvetve hatással van a neuronok differenciálódására és az ezzel kapcsolatos nyúlványnövekedésre is (Liu és Storm, 1990).

A CaM-célfehérje kölcsönhatások sejtszintű szabályozását számos mechanizmus biztosítja. A sejt mikrodomének formájában használja a kalmodulint, melyek összetett

szabályozási események összehangolt működései eredményeképpen jönnek létre; ilyenek a gyorsan lecsengő, múltó Ca^{2+} -szignálok, a CaM reverzibilis tárolása (membránhoz vagy tároló fehérjékhez való kötődéssel), a katalitikus domén elfedése (foszforilációval), a CaM készleteinek átrendezése különböző intracelluláris helyekre, a de novo CaM szintézis, vagy a célmolekulák elérhetőségének szabályozása (Palfi és mtsai, 2002).

A CaM gének és expressziójuk a központi idegrendszerben

Patkányban 3 működő és 4 nem működő, úgynevezett pszeudogén ismert (Nojima, 1989; Nojima és mtsai, 1987; Nojima és Sokabe, 1986; Sherbany és mtsai, 1987). A három különböző CaM gén (CaM I, II, III) alternatív poliadenilációval legalább hét különböző mRNS-t kódol (Gannon és McEwen, 1994; Ikeshima és mtsai, 1993; Nojima, 1989; Palfi és mtsai, 2002). A három CaM gén kódoló régiója nukleotid szinten ugyan különbözik egymástól, ezek a különbségek azonban aminosav szinten nem nyilvánulnak meg, és a fehérje aminosavsorrendje mindhárom gén esetében azonos. A CaM I transzkriptumai 4.0, 1.7 és 0.8 kb, a CaM II egyetlen transzkriptuma 1.4 kb, a CaM III transzkriptumai pedig 2.3, 1.9 és 0.9 kb hosszúságúak.

A kódoló régiókat határoló 5'-, illetve 3'-nemtranszlálódó régiók szekvenciái azonban nem konzerválódtak, és ebben a tekintetben az egyes CaM gének között jelentős különbségek vannak. Ezekben a szekvenciákban számos szabályozó elemet sikerült feltérképezni, amelyek különböző kombinációkban és különböző számban találhatók meg az egyes transzkriptumokban (bővebben lásd Palfi és mtsai, 2002). Ezek a rövid szekvenciák a felelősei annak, hogy a három CaM gén jellegzetes, egyéni szabályozás alatt áll: nemcsak eltérő mennyiségben expresszálódnak az egyedfejlődés során vagy a különböző szövetekben, de transzkriptumaik különböző mennyisége található meg az egyes sejtkompartmentekben is. A CaM génexpresszió szabályozásában a 3'-nemtranszlálódó régió feltételezett elemei mellett valószínűleg az 5'-régió elemei is részt vesznek (Decker és Parker, 1995; Gao, 1998; Toutenhoofd és mtsai, 1998a, b). Mind a CaM I, mind a CaM III gén tartalmaz poliadenilációs helyeket (Ni és mtsai, 1992; Palfi és mtsai, 2002; Senterre-Lesenfants és mtsai, 1995; Sherbany és mtsai, 1987), amelyek közül némelyik nem fordul elő általánosan, jelenléte csak pár egyéb génben ismert (Beaudoing és mtsai, 2000; Tsai és mtsai, 1991; Tsui és mtsai, 1996).

A három rokon gén kódolt fehérjéjének tökéletes egyezése csak arra utalhat, hogy evolúciós igény volt egy átlagosnál precízebb, nem a fehérje szintjén megvalósuló

szabályozásra (Palfi és mtsai, 2002), s ez a CaM protein fontosságát figyelembe véve, érthető is. Egyrészt mint háztartási fehérjének, állandó, magas szinten kell expresszálnia, másrészt a kalmodulin egymással sokszor éppen ellentétes sejtválaszokat idéz elő, húsznál is több célenzimet működtetve egyazon sejtben; azért, hogy ez kivitelezhető legyen, a sejtnek maximalizálnia kell a szabályozási pontok számát, beiktatva és erősen támaszkodva a génexpresszió szintjén történő szabályozásra is.

A fejlődő (Cimino és mtsai, 1990; Kortvely és mtsai, 2002; MacManus és mtsai, 1989) és felnőtt patkány központi idegrendszerében (Palfi és mtsai, 1999, 2002; Sola és mtsai, 1996) a CaM széleskörű expressziója figyelhető meg. Laboratóriumunk elvégezte a felnőtt patkány agyára jellemző CaM génexpresszió részletes vizsgálatát (Palfi és mtsai, 1999). Jelentős CaM génexpresszió figyelhető meg a kérgi és hippocampális piramis sejtekben, a hipotalamusz magnocelluláris neuroszekréciós sejtjeiben, a Purkinje sejtekben, a kisagyi mélymagvak neuronjaiban, a gerincvelő mellső szarvának motoneuronjaiban, a szaglógumó mitrális sejtjeiben, valamint összességében a kéreg, a középagy, a bazális magvak és a gerincvelő minden nagyobb neuronjában (Palfi és mtsai, 1999). A három CaM gén expressziója jóval alacsonyabb a kis méretű interneuronokban, és gyakran kimutathatatlan a legtöbb gliasejtben. A különböző CaM génekről átíródó mRNS-ek mennyisége jóval kisebb azokon a területeken, ahol kevés az idegsejttest: ilyen terület a hippocampus molekuláris rétege, illetve a nagyagy- és kisagykéreg molekuláris rétegei, és egészen minimális például a corpus callosum területén. Jellegzetesen alacsony CaM mRNS koncentrációk figyelhetők meg a gerincvelő fehérállományában és a retinában is: ezeken az agyterületeken a CaM mRNS tartalom konvencionális in situ hibridizációs technikákkal nem vagy alig detektálható.

Laboratóriumunk korábbi kutatásai nemcsak a CaM mRNS-ek széleskörű és differenciált eloszlását igazolták a patkány agyban normál (élettani) feltételek mellett, de vizsgálták a CaM génexpresszió jellegzetességeit bizonyos kísérleti körülmények között (Palfi és mtsai, 1999, 2001, 2002; Palfi és Gulya, 1999; Vizi és mtsai, 2000), az ontogenetikus fejlődés során (Kortvely és mtsai, 2002), illetve in vitro rendszerekben is (Palfi és mtsai, 2000, Kortvely és mtsai, 2002).

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai újabb adatokat szolgáltatottak arra vonatkozóan is, hogy a CaM mRNS-ek nemcsak régió- és idegsejttípus-specifikus eloszlást mutatnak a felnőtt patkány agyában, hanem az idegsejtek különböző intracelluláris kompartmentjeibe is eltérő mennyiségű CaM mRNS szállítódik (Palfi és mtsai, 1999). Primer hippocampális

neuronális kultúrában végzett vizsgálataink szerint a CaM mRNS tartalom granulumok formájában transzportálódik a dendritekben (Kortvely és mtsai, 2002), hasonlóan más, szintén dendritikus transzporttal szállítódó ribonukleinsavhoz (Eberwine és mtsai, 2001; Gao, 1998; Gardiol, 1999; Kislauskis és mtsai, 1994; Knowles és mtsai, 1996; Martone és mtsai, 1996; Mohr, 1999; Mori és mtsai, 2000; Racca és mtsai, 1997; Rao és Steward, 1991, 1993; Steward, 1995; Steward és Worley, 2001; Tian és mtsai, 1999). A neuronok különböző intracelluláris kompartmentjeibe irányított transzporttal szállított mRNS-ek a lokális fehérjeszintézisben vehetnek részt (Palfi és mtsai, 2002; Tian és mtsai, 1999). Mivel a dendritek rendelkeznek a fehérjeszintetizáló apparátus minden komponensével (Eberwine és mtsai, 2001; Steward, 1995; Steward és Levy, 1982), a dendritekben megtalálható CaM mRNS populációk a dendritműködéssel kapcsolatos fehérjék lokális szabályozásához szükséges CaM proteinek – igény szerinti – de novo szintézisével járulhatnak hozzá a szinaptikus működés fenntartásához.

CaM génexpresszió a gliasejtekben

A közelmúltban számos, gliában expresszáldó transzkriptumot izoláltak (Ainger és mtsai, 1993; Barbarese és mtsai, 1995; Brophy és mtsai, 1993; Landry és mtsai, 1994; Medrano és mtsai, 2001; Sarthy és mtsai, 1989). Mivel a központi idegrendszerben a kalmodulint expresszáló sejtek zöme idegsejt (Matsuoka és mtsai, 1992; Ni és mtsai, 1992; Seto-Ohsima és mtsai, 1983), e fehérjét a gliális funkciókkal kapcsolatban ezidáig csak ritkán említették (Sola és mtsai, 1999). A CaM jelenlétére és a fehérje szerepére a különböző gliatípusokban – a mikrogliától eltekintve (Casal és mtsai, 2001; Solá és mtsai, 1997) – pusztán felületes utalások engednek következtetni. Caceres és mtsai (1983) például a hippocampális asztrocitákban mutatták ki a CaM immunoreaktivitást, Scolding és mtsai (1992) pedig a CaM-nak az oligodendrociták sérüléseiben és javításában történő szerepét igazolták. A CaM jelenléte a gliasejtekben érthető, hiszen számos, a gliasejtekre is jellemző, CaM által szabályozott sejtfunkció létezik. Így például a gliasejtek különböző stimulusokra intracelluláris Ca^{2+} -tartalmuk megemelésével válaszolnak, és a Ca^{2+} -beáramlást a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák néhány típusa, a receptor-kapcsolt Ca^{2+} -csatornák, egy Ca^{2+} -pumpa és a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kicserélő pumpa szabályozza (Verkhratsky és mtsai, 1998). Míg a gliasejtekben a CaM szint általában alacsony, ismertek bizonyos patofiziológiás, illetve kísérleti körülmények, amelyekben a protein mennyisége megnövekszik (Gebicke-Haerter és mtsai, 1996). Káinsavval kezelt egér

hippocampusában például a kezelésre érzékeny mikroglia-sejtek nagy mennyiségű CaM proteint tartalmaztak, ami egyrészt igazolja, hogy a citoszolikus Ca^{2+} -koncentráció emelkedés megváltoztathatja a gliasejt funkcióit, illetve génexpressziós mintázatát, másrészt viszont felhívja a figyelmet arra, hogy a gliális kalcium homeosztázisában történt változások részt vehetnek bizonyos patofiziológiai folyamatok kialakításában is (Solá és mtsai, 1997).

Az a megfigyelés, hogy ezekben a sejtekben a CaM mRNS élettani körülmények között is valóban jelen van kimutatható mennyiségben, két dolog miatt nem volt nyilvánvaló: 1) a gliasejtekben a CaM génexpresszió általában alacsony, 2) a jelenlegi in situ hibridizációs módszerek az alacsony szöveti mRNS szint kimutatására nem eléggé érzékenyek, különösen ott, ahol magas a szövet lipidtartalma (például a gerincvelő fehérállományában), vagy esetleg más, a próba penetrációját nehezítő faktor (például jelentős mennyiségű kötőszövet) van jelen.

CaM génexpresszió a retinában

Bár a kalmodulin fehérje jelenlétét a gerinces retinában biokémiai (Kohnken és mtsai, 1981; Nagao és mtsai, 1987) és immunhisztokémiai módszerekkel egyaránt bizonyították, a retina egyes rétegei nagyon eltérő mennyiségben tartalmaznak immunhisztokémiai módszerekkel kimutatható CaM fehérjét (Pochet és mtsai, 1991; Seto-Oshima és mtsai, 1987). Változó mennyiségű CaM immunoreaktivitás figyelhető meg a felnőtt patkány retinájának ganglion, amakrin, horizontális és bipoláris sejtjeiben, valamint a ganglion és amakrin sejtekből eredő rostokban a belső plexiform rétegben (Pochet és mtsai, 1991). Radioimmunoesszé-alapú vizsgálatok szerint a pálcikasejtek nagyon alacsony CaM tartalommal rendelkeznek a gerincesekben (Kohnken és mtsai, 1981; Nagao és mtsai, 1987), míg immuncitológiai vizsgálatok azt bizonyították, hogy a CaM fehérje hiányzik a rágcsálók fotoreceptor sejtjeiből (Pochet és mtsai, 1991) és csak kis mennyiségben van jelen a macska fotoreceptoráiban (Wakakura és Yamamoto, 1987). Különös, hogy nem áll rendelkezésünkre olyan in situ hibridizációs vizsgálat, amely a CaM mRNS populációk megoszlására vagy ezen gének szabályozására utalna. Mivel a CaM olyan kulcsfontosságú fehérje, amely számos, a szignalizációs folyamatokban résztvevő célfehérjét szabályoz (Palfi és mtsai, 2002; Toutenhoofd és Strehler, 2000), meglepő, hogy szerepe nem világos a vizuális szignalizációs folyamatokban, különösen annak fényében, hogy milyen sok adat áll rendelkezésre a többi Ca^{2+} -kötő fehérjére (Polans és

mtsai, 1996), vagy számos CaM-függő proteinre vonatkozóan, így például a Ca^{2+} /CaM-függő adenilil-cikláz (Willardson és mtsai, 1996), a cGMP-kapuzott kationcsatorna (Chen és mtsai, 1994), a Ca^{2+} /CaM függő protein kináz I (Tsumura és mtsai, 1999), II (Liu és mtsai, 2000) és IV (Sakagami és Kondo, 1996), illetve a G-protein kapcsolt receptor kinázok (Chuang és mtsai, 1996) esetében.

A Ca^{2+} -kötő fehérjék hagyományos in situ hibridizációs módszerekkel nyert adatai irodalmának áttekintése során arra a megállapításra jutottunk, hogy a retina CaM génexpressziójára vonatkozó adatok hiánya elsősorban a szövet alacsony mRNS tartalmára, illetve a leggyakrabban használt in situ hibridizációs módszerek viszonylagos érzéketlenségére vezethető vissza. A CaM génexpresszió felnőtt retinában történő vizsgálatát ezért az általunk kifejlesztett nagy érzékenységű in situ hibridizációs módszerrel végeztük el, amelynek során a DIG-jelölt, a különböző CaM génekre specifikus ribopróbáinkat alacsony pH (pH 8.0) tartományban hibridizáltuk paraffinba ágyazott metszeteken.

Célkitűzések

Vizsgálataink célja egyrészt az volt, hogy kidolgozzunk egy, az alacsony kópiaszámú CaM mRNS populációk detektálására is alkalmas in situ hibridizációs módszert, másrészt, hogy a központi idegrendszer CaM mRNS-ben szegény régióiban (gerincvelő, retina) nagy térbeli feloldású, színes in situ hibridizációs módszerrel lokalizáljuk ezen gének eltérő mRNS populációit. Célkitűzéseink az alábbiak voltak:

- 1) A rendelkezésre álló és széleskörűen használt in situ hibridizációs módszereket érzékenységük alapján összehasonlítsuk egy alacsony CaM mRNS tartalmú, de magas lipidtartalmú szövetben;
- 2) Optimalizáljuk az általunk kifejlesztett, enyhén alkalikus pH tartományban (pH 8.0) végzett hibridizációt felhasználó módszerünket az alacsony CaM mRNS tartalom detektálására;
- 3) Ezzel a módszerrel lokalizáljuk és elkülönítjük a három CaM génről átíródott mRNS-ek populációit a felnőtt patkány lumbáris gerincvelő fehérállományban;
- 4) Módszerünkkel demonstráljuk a különböző CaM gének transzkriptumainak jelenlétét a felnőtt patkány retinájában.

Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok és szöveti előkészítés

Az állatkísérletek mind az Európai Közösség (86/609/EEC), mind a Magyar Köztársaság (XXVIII/1998 és 243/1998) által hozott, a laboratóriumi állatok védelmére és kísérleti felhasználására vonatkozó jogszabályainak megfelelően zajlottak a Szegedi Tudományegyetem állatkísérleteket ellenőrző bizottsága engedélyének (I-74-16/2002. MÁB) beszerzése után. Felnőtt (200-220 g-os) hím Sprague-Dawley patkányokat standard állatházi körülmények között tartottunk. Az állatokat dekapitáltuk és szemüket, illetve lumbáris gerincvelőjüket a szöveti mRNS degradációjának megakadályozása miatt a lehető leggyorsabban kiemeltük.

A kriosztátos metszetek készítésekor a szöveteket Cryomatrixba (Shandon Scientific, Pittsburgh, PA, USA) ágyazva azonnal -70°C -ra lefagyasztottuk. A beágyazott szövetből kriosztáttal koronasíkjú, $15\ \mu\text{m}$ vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk, amelyeket 3-aminopropil-trietoxi-szilánnal bevont steril tárgylemezekre vettük fel. A pormentes helyen tárgylemezre szárított metszeteket a további felhasználásig (rendszerint 4-6 napig) -70°C -on tároltuk.

A paraffinos metszetek készítésekor a kivett szemek szaruhártyáját, lencsét, illetve üvegtestjét eltávolítottuk és a szemgolyók megmaradt, kaudális felét 4%-os pufferezt formalinban (pH 7.4) 4 órán keresztül 4°C -on fixáltuk. Egyéjszakás 0.1 M-os steril foszfát pufferezt sóoldatban (pH 7.4) történő mosás után a szemkelyhek víztartalmát felszálló alkoholsor segítségével kivontuk, a szöveteket abszolút alkoholból xilolba vittük át, majd alacsony olvadáspontú paraffinba (Sigma, St. Louis, MO, USA) ágyaztuk be. A beágyazott szövetből mikrotómmal horizontális síkjú, $7\ \mu\text{m}$ vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk, ezeket langyos, steril víz felületén kiterítettük, steril körülmények között szilánózott tárgylemezekre húztuk, végül 50°C -on egy éjszakán át a tárgylemezekre szárítottuk. A tárgylemezeket a további felhasználásig (rendszerint 1-3 napig) szobahőmérsékleten, pormentes dobozban tároltuk. Közvetlenül az *in situ* hibridizációs felhasználás előtt a metszeteket többször váltott xilolban deparaffináltuk, majd leszálló alkoholsorban rehidráltuk.

cRNS próbák

A [^{35}S]-jelölt cRNS próbák készítése Palfi és mtsai (1998) módszere alapján történt. A

CaM I, II, III mRNS-ek 3' nemtranszlálódó régióinak genomikus szekvenciáit polimeráz láncreakcióval (PCR) amplifikáltuk. A szekvenciák összehasonlítását a BLASTN 2.0.6. program segítségével végeztük el (Zhang és mtsai, 1997). A PCR-t EcoR1 és BamH1 restriktív enzim hasítóhelyekkel kiegészített primerekkel végeztük. A patkány genomikus szekvenciáknak megfelelő primer szekvenciák a következők voltak: a CaM I esetében 5'-AGACCTACTTTCAACTACT, ami megfelel a 6. exon 30-48 bp szekvenciájának, és 5'-TGTAAGAACTCATGTAGGGG, ami megfelel a 6. exon 236-255 bp szekvenciájának (Nojima és Sokabe, 1987) a CaM II esetében, 5'-ATTAGGACTCCATTCCTCC, ami megfelel az 5. exon 1929-1947 bp szekvenciájának, és 5'-CACAAGTCCACACTTCAACAGC, ami megfelel az 5. exon 2138-2159 bp szekvenciájának (Nojima, 1989); és a CaM III esetében 5'-ATGATGACTGCGAAGTGAAG, ami megfelel a 6. exon 7058-7077 bp szekvenciájának, és 5'-CAGGAGGAAGGAGAAAGAGC, ami megfelel a 6. exon 7228-7247 bp szekvenciájának (Nojima, 1989).

A PCR reakciókat az MJ Research (Watertown, MA, USA) PTC-100-as típusú készüléken végeztük el. A standard PCR reakció (1.5 mM MgCl₂, 30 mM dNTP keverék, 400 ng genomikus DNS és 20 pmol alsó és felső primer) tipikusan 35 ciklusból állt (denaturálás: 94 °C, 40 mp; "annealing": 55 °C, 30 mp és "extenzió": 72 °C, 30 mp) (Palfi és mtsai, 1998). A PCR termékeket pcDNA3 vektorba szubklónoztuk (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), majd szekvenáltuk (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Az antiszensz (a mRNS-sel komplementer) és szensz (a mRNS-sel azonos) cRNS próbákat a linearizált és tisztított vektorokról in vitro RNS szintézissel készítettük. A komplementer, antiszensz próbák hossza 225 bp (CaM I), 231 bp (CaM II) és 157 bp (CaM III) volt. A radioaktív jelölés céljából [³⁵S]UTP[S-t (1100 mCi/nmol; Izotóp Intézet, Budapest) építettünk a cRNS próbákba. Az in vitro transzkripcióhoz a Riboprobe System-T7 és a Riboprobe System-SP6 rendszereket a gyártó cég leírása szerint használtuk (Promega, Madison, WI, USA). A jelölt próbákat a nem beépült radioaktív nukleotidoktól Sephadex G-50 oszlopon (Pharmacia Biotech, Uppsala, Svédország) gélszűréssel választottuk el; a radioaktív próbák specifikus aktivitása 3.5-6.5x10⁸ cpm/mg között volt.

A digoxigenin (DIG)-jelölt, az egyes CaM génekre specifikus cRNS próbák készítéséhez tisztított és linearizált vektorokról in vitro transzkripcióval DIG RNS jelölő kitet használva antiszensz és szensz cRNS-t szintetizáltunk (Kovacs és Gulya, 2001, 2002,

2003) a gyártó cég protokollja szerint (Boehringer Mannheim, Mannheim, Németország). A nonspecifikus jel detektálására az antiszensz próbával megegyező koncentrációjú szensz próbát használtunk.

Radioaktív in situ hibridizáció

A patkány gerincvelő koronasíki kriosztát metszeteit szobahőmérsékleten 5 percig 4% formaldehidet tartalmazó 2 x SSC oldatban (0.3 M NaCl és 0.03 M Na-citrát, pH 7.0) fixáltuk, 2 x 1 percig 2 x SSC-ben mostuk, majd 0.1 M trietanolamint tartalmazó, 0.25%-os ecetsavanhidrid oldatban szobahőmérsékleten 5 percig prehibridizáltuk (Palfi és mtsai, 1999, Vizi és mtsai, 2000). A mintákat dehidráltuk, levegőn megszárítottuk, majd 50 ml hibridizációs oldatban (50% formamid, 6 x SSPE, 0.9 M NaCl, 60 mM Na₂HPO₄ és 6 mM EDTA, pH 7.4, 5 x Denhardt-féle reagens, 10% dextrán szulfát, 0.1% SDS, 100 mM DTT, 100 µg/ml hering spermium DNS és 100 µg/ml élesztő tRNS) 2.5x10⁵ cpm cRNS próbát adtunk hozzájuk. A mintákat parafilm fedőlemezekkel láttuk el, majd párasított dobozokban 50 °C-on 20 órán keresztül a fenti hibridizációs oldatban hibridizáltuk.

A poszthibridizáció során a mintákat 2 x SSC/50% formamid oldatban szobahőmérsékleten 5 percig, majd kétszer 2 x SSC/50% formamid oldatban 50 °C-on 10 percig, végül 2 x SSC-ben szobahőmérsékleten 5 percig mostuk. A metszeteket ezután 1 x TE (0.01 M Tris és 0.001 M EDTA, pH 8.0) pufferben, 0.5 M NaCl és 16 µg/ml RNáz A (Promega) jelenlétében 37 °C-on 30 percig inkubáltuk, majd kétszer 2 x SSC/50% formamid oldatban 50 °C-on 10 percig és 2 x SSC oldatban 50 °C-on 10 percig mostuk, végül a mintákat dehidráltuk és levegőn megszárítottuk. Ezt követően a hibridizált szöveteket ³²P-sugárzásra érzékenyített Hypercoat emulzióval (Amersham, Arlington Heights, IL, USA) vontuk be és 4 °C-on 10-30 napig exponáltuk. Az emulzióval bevont mintákat az expozíció végén 19 °C-on rendre 3.5 és 5 percig Kodak D19 hívóban (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) hívtuk, majd szintén 19 °C-on 10 percig Kodak fixálóban fixáltuk.

Nemradioaktív (színes) in situ hibridizáció

A paraffinba ágyazott metszeteket rehidráció után a kriosztátos metszetekkel megegyező módon kezeltük. A metszeteket az előbbieken leírt módon fixáltuk és prehibridizáltuk. Az alacsony mRNS populációk kimutatására elvégzett, a hibridizáció érzékenyebbé tételét célzó kísérleteinkben a metszeteket három protokoll szerint kezeltük. Az első protokoll

esetében a metszeteket a fixálás előtt 0.01 M Na-citrátos oldatban mikrohullámmal 5 + 4 + 4 percig (megszakításokkal, a felforrás megakadályozására) melegítettük, majd a prehibridizáció (lásd korábban) után 1.0% tritont tartalmazó 2 x SSC oldatban 3 percig mostuk. A második protokoll szerint a mikrohullámú melegítés után a metszeteket 5 percig kloroformmal mostuk, fixáltuk, majd a prehibridizáció után 0.1% triton X-100/2 x SSC oldatban 3 percig kezeltük. A metszeteket az első és második protokollban pH 7.4-re vagy a harmadik protokollban – ahol sem mikrohullámot, sem tritont nem alkalmaztunk – pH 8.0-ra állított hibridizációs oldatban hibridizáltuk. A hibridizációs oldat mintegy 200 ng/ml DIG-jelölt cRNS próbát tartalmazott. A metszeteket parafilmmel fedtük le és párasított dobozokban 55 °C-on, 24 órán keresztül inkubáltuk (Kovacs és Gulya, 2001, 2002).

A poszthibridizáció után (lásd fent) a metszeteket B1 pufferben (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) 5 percig mostuk, majd a reakciót hőinaktivált B1-ben oldott birkaszérummal blokkoltuk két órán át. Ezután a metszeteket anti-DIG-alkalikus foszfatáz konjugátummal inkubáltuk B1 pufferben oldott 5% birkaszérummal 4 °C-on 24 órán át. A metszeteket B1 pufferrel 3x5 percig, majd B2 pufferrel 10 percig (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) mostuk, majd 340 µg/ml NBT (nitro blue tetrazolium) és 180 µg/ml BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indoil-foszfát) tartalmú B2 pufferrel fedtük le őket sötétben, 24 órára. A színreakciót úgy állítottuk le, hogy a metszeteket szobahőmérsékletű 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) és 1 mM EDTA tartalmú oldatba merítettük 5 percre. A metszeteket rövid idejű szárítás után glicerín/zselatin keverékével lefedtük.

Képanalízis

A hibridizált retina metszeteket Leica DM LB fénymikroszkóppal (Leica Mikroskopie und Systeme GmbH; Wetzlar, Germany), áteső fényben vizsgáltuk. A képeket Power Macintosh (Apple Computer, Cupertino, CA, USA) számítógéphez kapcsolt Polaroid DMC I digitális mikroszkóp kamerával (Polaroid, Cambridge, MA, USA) 1600 x 1200 képpontos feloldásban és 8 szürke színárnyalatban készítettük el. A reprezentatív, hibridizált metszetekről készült képeket a NIH Image 1.59 (W. Rasband; NIH, NIMH, Bethesda, MD, USA) számítógépes képanalizáló programmal elemeztük.

A számításokhoz mindhárom CaM gén esetében legalább 3 állatból preparált 6 szemből készített metszeteket használtunk fel. A retina rétegeinek mindegyikéből, minden metszeten legalább 3 mérést végeztünk el. Az egyes régiókat a képernyőn körülrajzoltuk,

és a területek szignál intenzitásait megmértük (szürke színértékek: 0 a legvilágosabb, 255 a legsötétebb). A specifikus hibridizációs jel szürke színárnyalati értékét úgy kaptuk, hogy az antiszensz próbával hibridizált metszetek megfelelő régiói szürke színárnyalatainak átlagából levontuk a szensz próbával hibridizált metszetek azonos régiói szürke színárnyalatainak átlagát. Az egyes retinális rétegek vizualizálása érdekében néhány metszetet toluidinkékkkel vagy safraninnal festettünk felül. A képeket Photoshop 6.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) számítógépes képszerkesztő programmal jelöltük fel. A szignifikancia analízist Student-féle kétmintás t -próbával végeztük el.

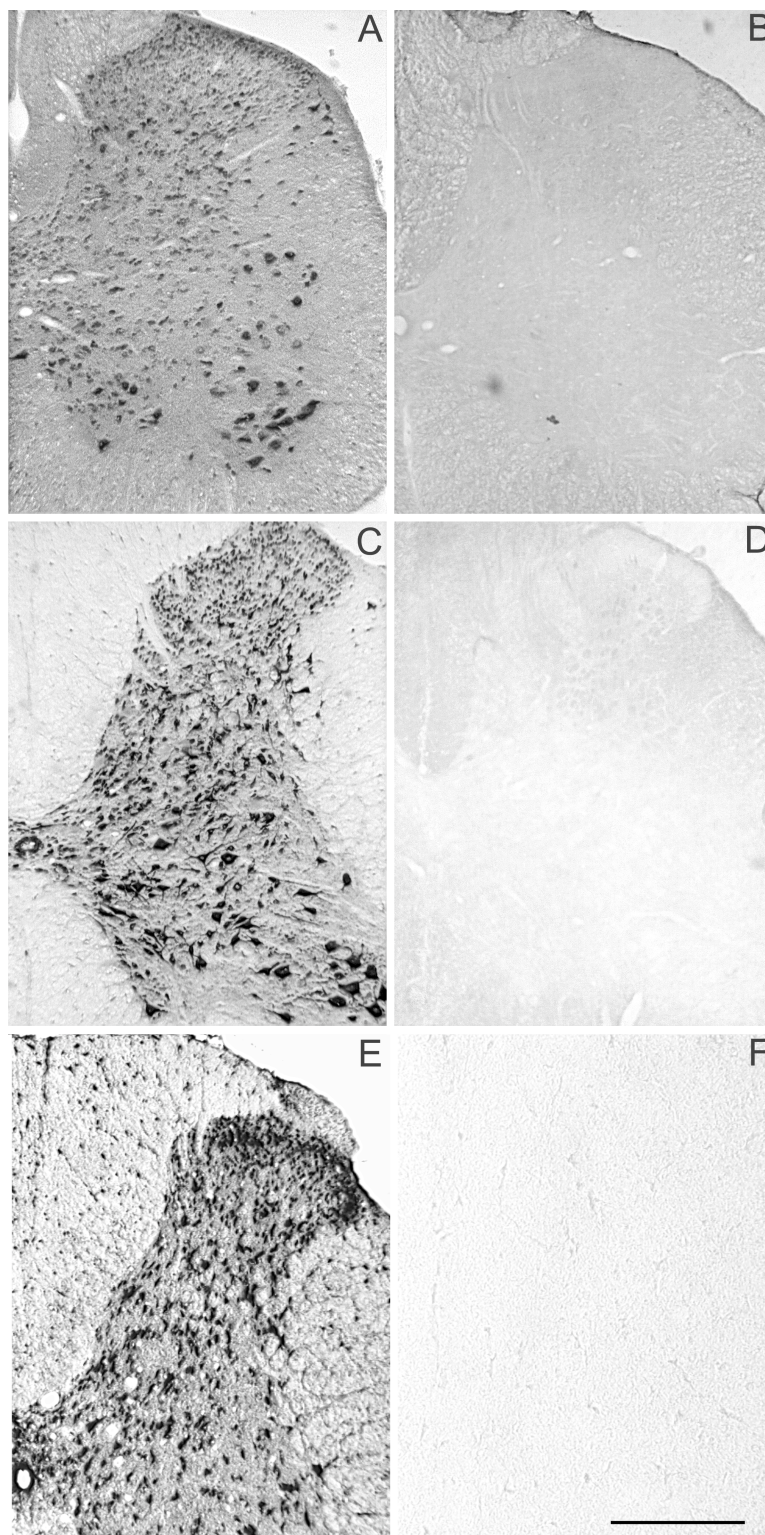
Eredmények

In situ hibridizációs módszerek összehasonlítása az alacsony CaM mRNS tartalmú gerincvelői fehérállományban

Az in situ hibridizáció érzékenyebbé tétele érdekében elvégzett kísérleteinkben a CaM I gén transzkriptumaira specifikus DIG-jelölt ribopróbákat használtunk. A mikrohullámú besugárzással kapcsolt tritonos kezelések közül a kisebb triton X-100 koncentráció (0.1%) és a kloroform kezelés bizonyult hatásosabbnak (második protokoll). Ennél a koncentrációnál a gerincvelői metszeteken detektálható háttér jóval alacsonyabb volt, mint az 1.0% tritontartalmú oldat esetében (1., 2. ábrák, A-F). Bár mindkét alkalmazott tritonkoncentráció alkalmas volt a gerincvelő mellső szarvában lévő motoneuronok CaM expressziójának kimutatására, a jelölt interneuronok száma a kisebb tritonkoncentrációnál volt magasabb (1. ábra, C, D). A tritonos kezelés és a mikrohullámú melegítés általunk vizsgált kombinációi a gerincvelő fehérállományában nem mutattak ki jelölt sejteket. Az enyhén alkalikus pH mellett elvégzett in situ hibridizáció (pH 8.0) eredményezte a legalacsonyabb háttér mellett a legtöbb jelölt sejt detektálását (1., 2. ábrák, E, F): a gerincvelő szürkeállományában mindenütt jól láthatók a CaM mRNS-t tartalmazó sejtek. Az alkalikus pH mellett elvégzett in situ hibridizáció a fehérállományban általában (1. ábra, E), a dorzális oszlopban pedig különösen nagyszámú, kisebb-nagyobb jelölt sejtet mutatott ki (2. ábra, E). E módszer rendelkezett a legjobb szöveti megtartással is, így további vizsgálatainkban az enyhén alkalikus pH-ra állított (pH 8.0) hibridizációs oldattal végeztük kísérleteinket. Módszerünkkel mind a magas lipidtartalmú (gerincvelő fehérállománya), mind az alacsony lipidtartalmú (retina) szövetekben sikeresen lokalizáltuk a különböző CaM gének transzkriptumait.

CaM mRNS tartalmú sejtek lokalizálása a gerincvelőben

Neutrális pH-n a génspecifikus ribopróbák egyetlen olyan sejtet sem detektáltak a lumbális gerincvelő fehérállományában, amely CaM II mRNS-t expresszált volna. Csak a szürkeállományban volt erős jelölődés: a motoneuronok a ventrális szarvban, illetve az interneuronok a dorzális szarvban tartalmaznak számottevő mennyiségű CaM II-specifikus mRNS-t (3. ábra).

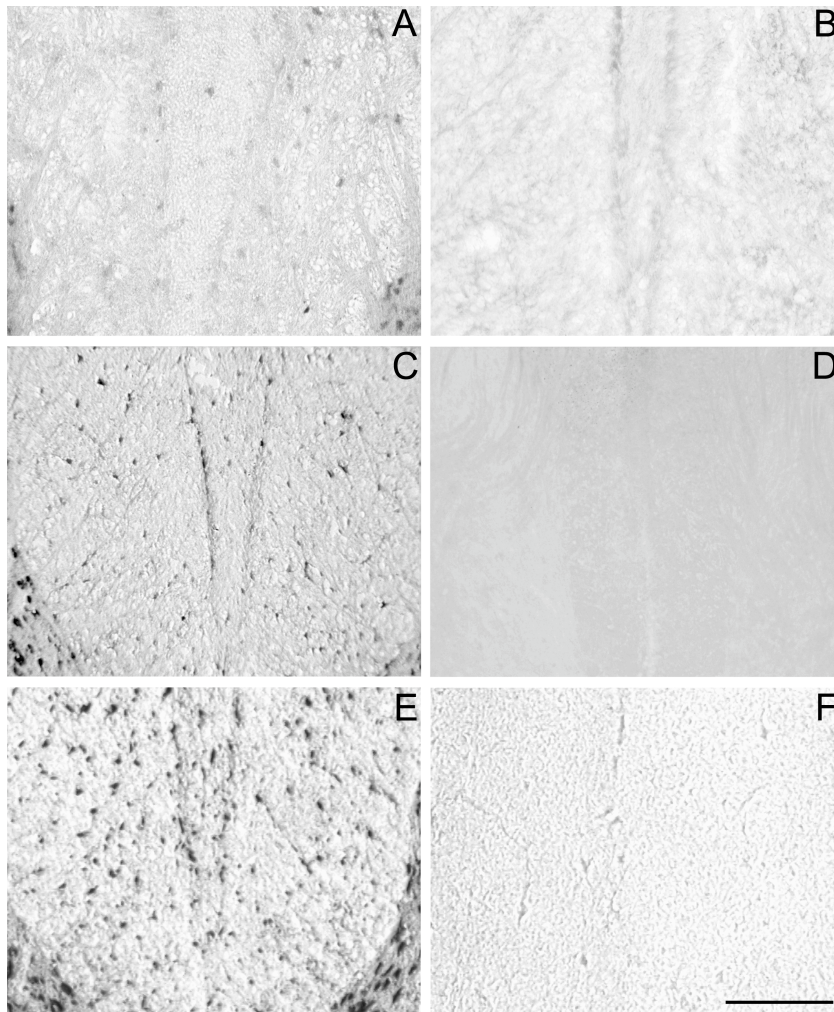


1. ábra. DIG-jelölt CaM II-specifikus antiszensz (A, C, E) és szensz (B, D, F) ribopróbák hibridizációja felnőtt patkány gerincvelő lumbális szakaszának kriosztát metszetein. A szövet a prehibridizáció során a következő kezeléseket kapta (a részletes protokollt lásd az Anyagok és módszerek fejezetben): 1) a fixálás előtt 5 + 4 + 4 perces mikrohullámú kezelés, majd a fixálást követően 3 perces 0.1% tritonos kezelés (A, B); 2) a fixálás előtt 5 + 4 + 4 perces mikrohullámú kezelés, majd 5 perces kloroformos kezelés, a fixálást követően pedig 3 perces 0.1% tritonos

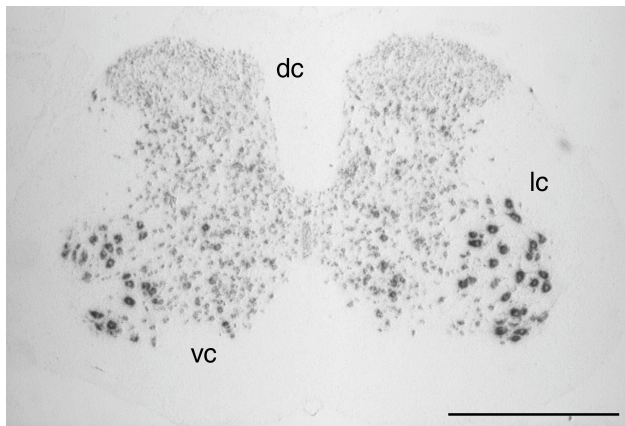
Abban az esetben azonban, amikor a DIG-jelölt ribopróbát tartalmazó, enyhén alkalikus pH-jú hibridizációs oldatban (pH 8.0) végeztük el a hibridizációt, a különböző CaM mRNS populációkat expresszáló sejtek a lumbális gerincvelő egész fehérállományában láthatóvá váltak. Jól demonstrálja ezt a 4. ábra, ahol az A panelen neutrális, míg a B panelen enyhén alkalikus pH (8.0) mellett detektáltuk a citoplazmatikus CaM II mRNS populációkat (4. ábra, A, B). A neutrális pH alkalmazásakor a szürkeállomány sejteiben jól láthatók a CaM II mRNS-t expresszáló motoneuronok és interneuronok, de a fehérállományban CaM II pozitív sejtek nem figyelhetők meg. Enyhén alkalikus pH mellett mind a szürkeállományban, mind a fehérállományban jól láthatók a CaM II expressziót mutató sejtek; a fehérállomány egyes CaM II pozitív sejtjeit nyilak mutatják (4., 5. ábrák). Érdekes, hogy az enyhén alkalikus pH mellett végzett hibridizáció a szürkeállomány neuropiljában is jelentősebb mennyiségű CaM II mRNS-t detektál (4. ábra, B).

A fénymikroszkópos in situ hibridizációs vizsgálatok alapján két sejtípust lehetett megkülönböztetni, amelyeknek CaM expressziója egymástól különbözött. Az első típus főleg a fehérállomány dorzális oszlopában volt jelen, s jellegzetes differenciált CaM génexpressziót mutatott. Itt közepes méretű, szómaméretükben és nyúlványaik morfológiájában az asztrocitához hasonló sejtek szómái jelölődtek erősen (6. ábra), miközben e sejtek környezetének, a neuropilnak a jelölődése is figyelemre méltó volt. A dorzális oszlopban a CaM I mRNS tartalom volt a legnagyobb (6. ábra, A), ezt követte a CaM III (6. ábra, C), majd a CaM II mRNS tartalom mennyisége (6. ábra, B). Míg a CaM I és CaM III mRNS tartalom élesen kijelölte a sejteket, néha fő nyúlványaikkal együtt, a CaM II mRNS csak a sejttestben volt jelen (6. ábra, B).

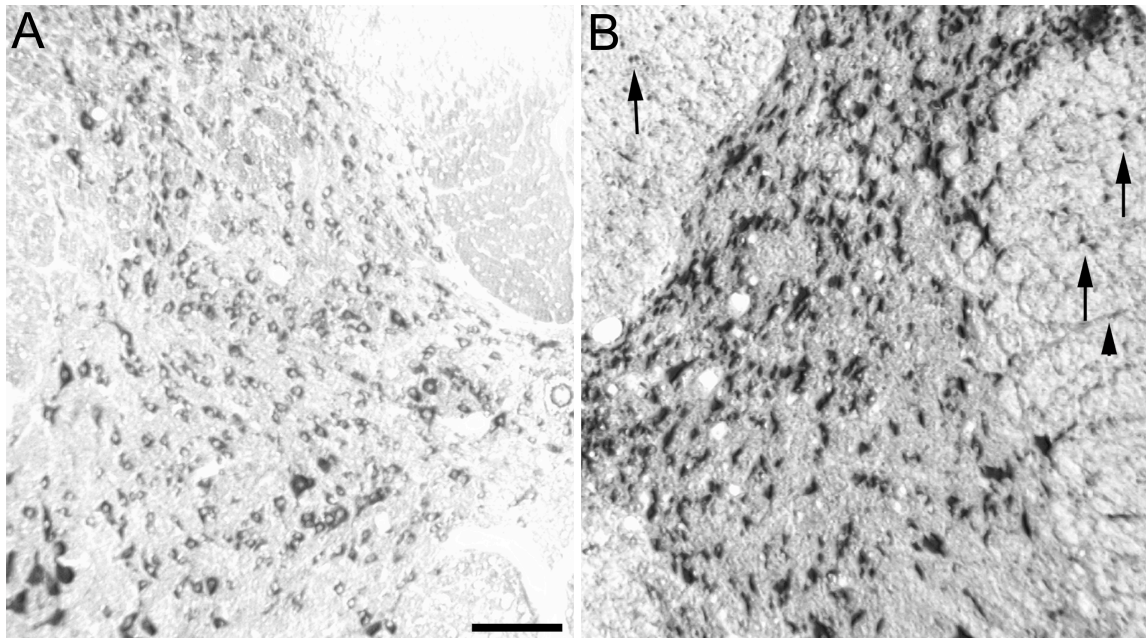
kezelés (C, D); 3) alkalikus pH mellett (pH 8.0) elvégzett in situ hibridizáció (E, F). Megfigyelhető, hogy az 1) kezelési protokoll magas háttérrel eredményezett mind a szürke-, mind a fehérállományban, s CaM expresszáló sejtek csak a szürkeállományban vizualizálhatók (A). A neuropil diffúz, sejtselektív háttérrel nem rendelhető erős háttérjelet mutat. A szensz próbával történt hibridizáció (B) magas háttérrel eredményezett. A 2) kezelési protokoll jobb szöveti megtartást és alacsonyabb háttérrel adott, a szürkeállomány sejtjei – esetenként nyúlványaikkal – erősen jelzettek (C). A gerincvelő fehérállományában nem láthatók jelölt sejtek. A 3) kezelési protokoll jó szöveti megtartás mellett nagyon alacsony háttérrel eredményezett (E), ahol a szensz próbával történt hibridizáció (F) háttérjelet alig adott. E protokollal a szürkeállomány jelölt sejtjei részleteiben is jól vizualizálhatók. Az erősen jelzett motoneuronok a mellső, a kevésbé intenzíven jelzett interneuronok az intermedier és a hátsó szarvban jól látszanak. A fehérállományban nagyszámú CaM expresszáló sejt figyelhető meg. Skála: 500 μ m.



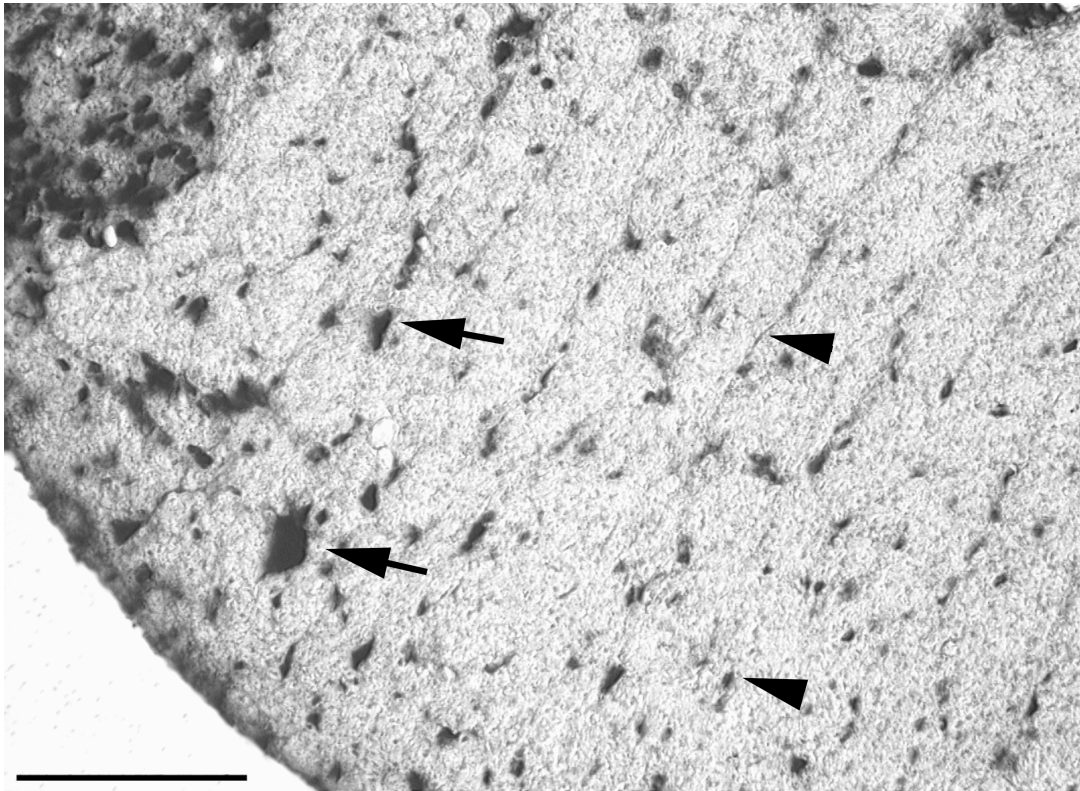
2. ábra. DIG-jelölt CaM II-specifikus antiszensz (A, C, E) és szensz (B, D, F) ribopróbák hibridizációja felnőtt patkány gerincvelő lumbáris szakaszának kriosztát metszetein. A képek a dorzális oszlop területéről készültek. A szövet a prehibridizáció során a következő kezeléseket kapta (részletesen lásd az Anyagok és módszerek fejezetben): 1) a fixálás előtt 5 + 2x4 perces mikrohullámú kezelés, majd a fixálást követően 3 perces 0.1% tritonos kezelés (A, B); 2) a fixálás előtt 5 + 2x4 perces mikrohullámú kezelés, majd 5 perces kloroformos kezelés, a fixálást követően pedig 3 perces 0.1% tritonos kezelés (C, D); 3) alkalikus pH mellett (pH 8.0) elvégzett in situ hibridizáció (E, F). A szensz próbák mindhárom kezelési protokoll során alacsony háttérjelet adtak (B, D, F). Az 1) kezelési protokoll a fehérállományban alig mutatott ki CaM expresszáló sejteket (A), a jelölődés itt a szensz próbához volt hasonló (B). Megfigyelhető, hogy a fehérállomány dorzális oszlopában a 3) kezelési protokoll eredményezte a legtöbb CaM expresszáló sejt megjelenését (E). A jelölt sejtek, esetenként nyúlványaikkal, jól vizualizálhatók. Az A, C és E képek alsó sarkaiban a szürkeállomány egy részlete látható. Skála: 200 μ m.



3. ábra. [³⁵S]-jelölt CaM II mRNS-re specifikus antiszensz ribopróba in situ hibridizációja a patkány gerincvelő lumbális szakaszából készült kriosztát metszeten. A metszeteket fotoemulzióval lefedtük, majd 10-30 napos (tipikusan 19-21 napos) expozíció után előhívtuk. A szürkeállomány CaM II mRNS-t expresszáló sejtjei jól megfigyelhetők: nagyszámú, erősen jelölődött motoneuron van a mellső szarv területén; a kissé gyengébben jelölődött interneuronok is jól láthatók. A fehérállományban jelölt sejtek nem láthatók. dc: dorzális oszlop, lc: laterális oszlop, vc: ventrális oszlop. Skála: 1 mm.

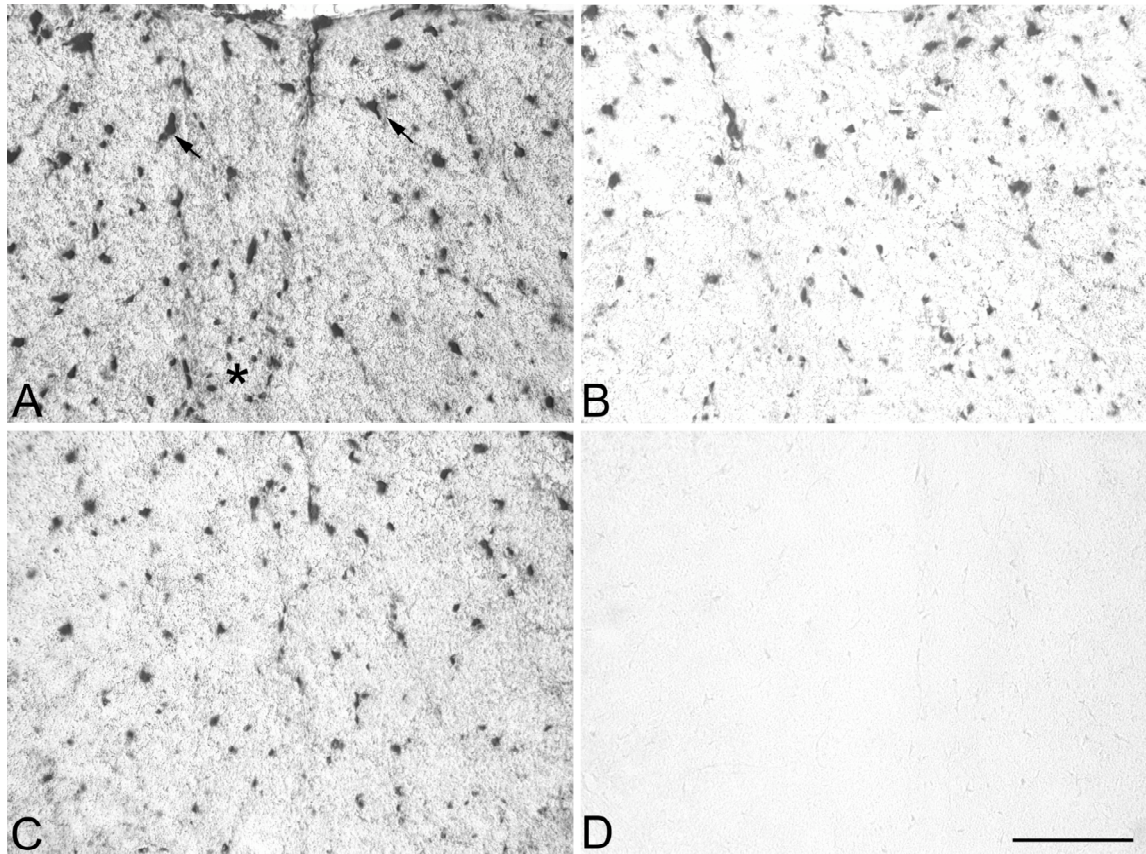


4. ábra. DIG-jelölt CaM I-specifikus antiszensz ribopróbák hibridizációja felnőtt patkány gerincvelő lumbális szakaszának kriosztát metszetein neutrális pH (pH 7.4) és enyhén alkalikus pH (pH 8.0) mellett. Jól látható, hogy neutrális pH mellett csak a szürkeállomány CaM expresszáló sejtjei jelölődnek, a fehérállományban jelölt sejtek nem láthatók (A). Enyhén alkalikus pH (pH 8.0) mellett végzett hibridizáció (B) a szürkeállomány jelölt sejtjei mellett a fehérállományban is nagyszámú, kis- és közepes méretű CaM I mRNS-t expresszáló sejt jelenlétét mutatja ki. A nyilak a fehérállományban mindenütt megfigyelhető kisméretű sejtek számaira mutatnak, a nyílhegy pedig az 50-100 μ m távolságra futó nyúlványok egyikét jelzi. Alkalikus pH mellett végzett in situ hibridizáció esetében a neuropil erősebb festődése is szembeötlő. Skála: 200 μ m.



5. ábra. DIG-jelölt CaM I-specifikus antiszensz ribopróba hibridizációja felnőtt patkány gerincvelő lumbális szakaszának kriosztát metszetén enyhén alkalikus pH-ra (pH 8.0) beállított hibridizációs oldatot használva. CaM I mRNS-t expresszáló sejtek nagy száma figyelhető meg a felnőtt patkány gerincvelő lumbális szakasza fehérállományának laterális oszlopában. A közepes méretű, asztrocitákra emlékeztető sejtek (nyilak), valamint a kisebb méretű, oligodendrocita-szerű sejtek (alsó nyílhegy) nagy számban jelölődnek. A képen néhány nagyobb glianyúlvány is jól megfigyelhető (felső nyílhegy). Skála: 100 μ m.

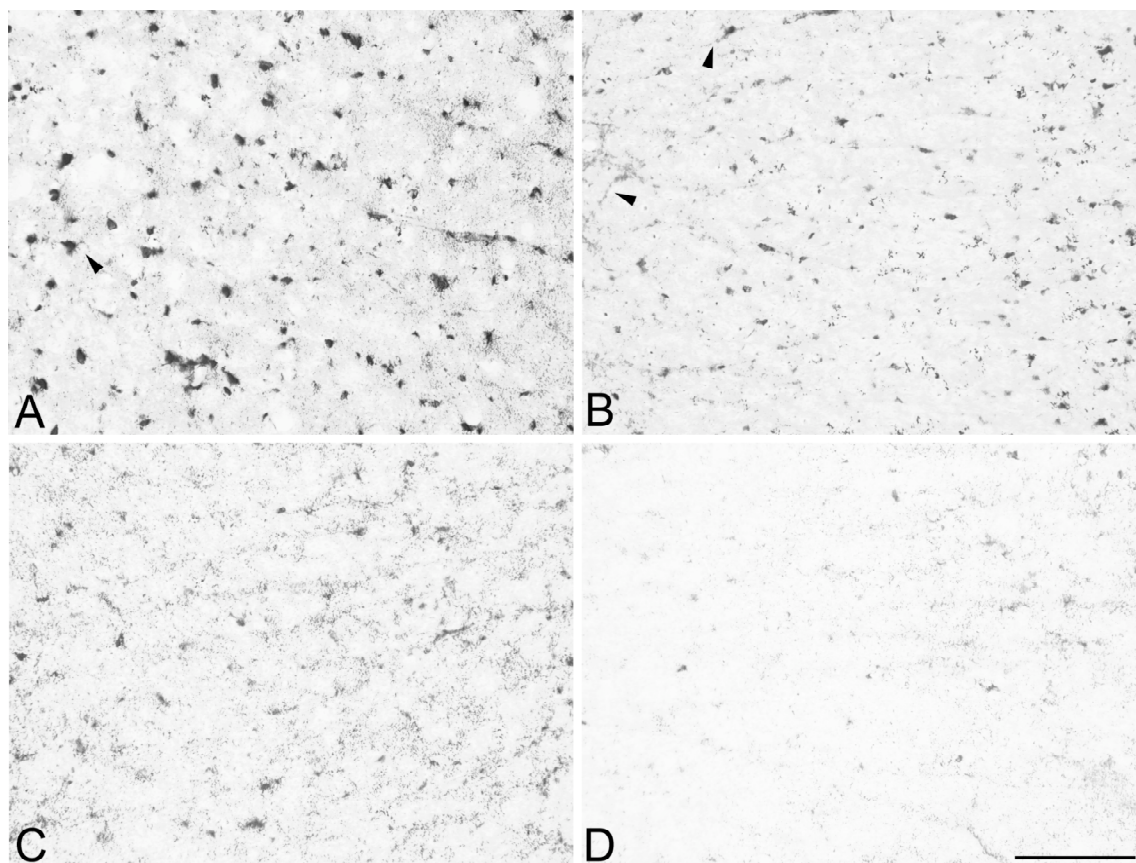
Kisebb, kerekded sejtek, valószínűleg oligodendrociták, a fehérállomány egész területén láthatók, ezek alkotják a sejtek másik típusát: tipikusan 10-20 μ m, esetenként 50-100 μ m hosszú, radiálisan futó nyúlányaik is előtűnnek. Ezen sejtípus szintén expresszál CaM mRNS-t (7. ábra, A, B, C): a CaM II és CaM III géneknek kissé alacsonyabb a kifejeződése (7. ábra, B, C), mint a CaM I génnek (7. ábra A). A DIG-jelölt szensz ribopróbák jelölődése a háttérrel volt összevethető (7. ábra D). A CaM I és CaM III génspecifikus próbákra jól láthatóan jelölődött a motoneuronok axonjai körül az oligodendrociták nyúlányai által képzett mielinhüvely is (8. ábra, A, B). A gerincvelő fehérállományában megfigyelhető CaM génexpressziót a laboratóriumunk munkatársai által a közelmúltban megjelentetett összefoglalóban is közöltük (Palfi és mtsai, 2002; 2832. oldal és 2. kép).



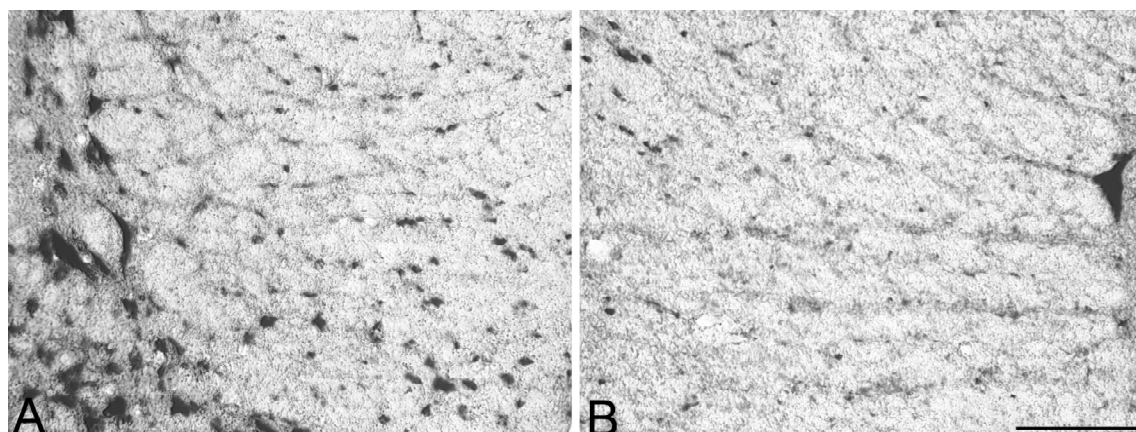
6. ábra. In situ hibridizációs hisztokémia DIG-jelölt CaM I, CaM II és CaM III-ra specifikus ribopróbákkal a felnőtt patkány lumbális gerincvelő fehérállományának dorsális oszlopában enyhén alkalikus pH mellett. A) A CaM I mRNS erősen expresszálódik a közepes méretű asztrocita típusú sejtekben (nyilak) és sokkal kevésbé az oligodendrocita típusú sejtekben (a csillag körül). Az asztrociták nagyobb nyúlványainak némelyike szintén látható. Az ezeket a sejteket körülvevő neuropil a CaM I-et nagy bőségben tartalmazza. B) A CaM II mRNS mérsékeltén expresszálódik a dorsális oszlopban, ahol ezen sejteknek csak a szómája jelölt és a neuropil csaknem mentes a CaM II mRNS-től. C) Mérsékelt CaM III expresszió figyelhető meg a szómákban a dorsális oszlopban. Bár a jel eloszlása a CaM I-éhez hasonló, a jelölt sejtek nyúlványai nem láthatóak és a neuropil is világosabb mint az A) esetben. D) A CaM II-specifikus szensz próba nem jelöli a sejtes elemeket, a jelölődés mértéke összevethető a háttérrel. Skála: 100 μ m.

Következő oldalon, felső kép:

7. ábra. In situ hibridizációs hisztokémia a DIG-jelölt CaM I, II és III génekre specifikus ribopróbákkal a lumbális gerincvelő fehérállományának laterális funiculussában enyhén lúgos pH mellett. A CaM I génexpresszió viszonylag magas (A), míg a CaM II (B) és CaM III (C) génexpresszió mérsékelt vagy alacsony. Kis sejttestek, valószínűleg oligodendrociták szómái és néha kevés, 10-20 μ m-es nyúlvány (nyíl az A, B képen) látható szerte a laterális funiculusbán (D). A CaM III szensz jelölődés alacsony a fehérállományban. Skála: 100 μ m.



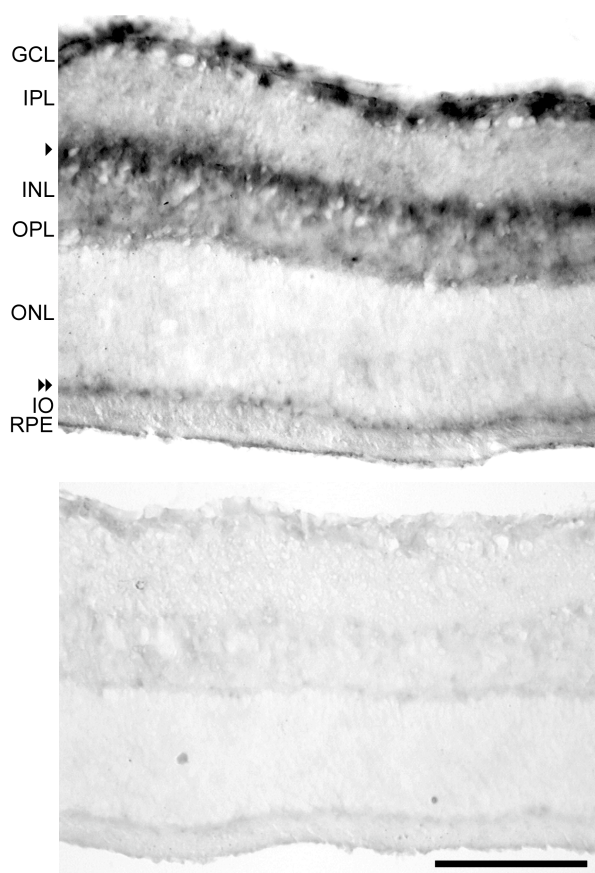
7. ábra.



8. ábra. In situ hibridizációs hisztokémia DIG-jelölt, CaM I (A) és CaM III (B) génekre specifikus ribopróbákkal a gerincvelő laterális oszlopában, enyhén alkalikus pH (8.0) mellett. A fehérállományban számos gliasejt, zömükben oligodendrocita szómája látható (A). A mellső szarvi motoneuronok axonjainak mielinhüvelye (amelyet az oligodendrociták formálnak) kihangsúlyozott, gyakran hosszan nyomon követhető (B). Skála: 100 μ m.

A CaM génexpresszió feltérképezése a felnőtt retinában

Neutrális pH-n történő hibridizációval a retinában specifikusan jelölt CaM mRNS tartalmú sejtes elem nem volt detektálható. Ha azonban a hibridizációs oldat pH-ját enyhén lúgossá (pH 8.0) tettük, a retina bizonyos rétegeiben nagy erősségű CaM jelölődés volt megfigyelhető. A retinális CaM mRNS-ek jellegzetes eloszlása a 9. ábrán látható, amelyet a CaM II példáján illusztrálunk. A központi idegrendszer számos területétől eltérően a retinában mindhárom CaM gén egyformán alacsony szinten expresszáldott és azonos rétegbeli eloszlást mutatott (1. táblázat).



9. ábra. A CaM génexpresszió jellegzetes megoszlása a felnőtt patkány retinájában a CaM II génre specifikus, DIG-jelölt ribopróbák reprezentatív jelölési mintázata alapján. A DIG-jelölt antiszensz (A) és szensz (B) CaM II génre specifikus cRNS próbákat paraffinba ágyazott metszetekre hibridizáltuk. A legerősebb hibridizációs szignált a ganglionsejtek rétegében, a belső nukleáris rétegben és annak legbelső szublamínájában (▶) figyeltük meg. Közepesen erős hibridizációs szignál volt látható a külső és belső plexiform rétegben, a külső határolómembrán körüli zónában (▶▶) és a pigment epitéliumban. Alacsony jelölődés volt jellemző a külső nukleáris rétegre és a fotoreceptorok belső szegmenseiből álló rétegre. GCL: ganglionsejtek rétege, IPL: belső plexiform réteg, INL: belső nukleáris réteg, OPL: külső plexiform réteg, ONL: külső nukleáris réteg, IO: a fotoreceptorok külső és belső szegmensei, RPE: retina pigment epitélium, ▶ : a belső nukleáris réteg belső szublamínája, ▶▶ : külső határolómembrán. Skála: 100 μ m.

1. táblázat. A CaM mRNS populációk megoszlása a patkány retina különböző rétegeiben (szemikvantitatív analízis)

	CaM I			CaM II			CaM III		
	Analizált terület (μm²)		Specifikus szűrkeszín érték	Analizált terület (μm²)		Specifikus szűrkeszín érték	Analizált terület (μm²)		Specifikus szűrkeszín érték
	AS	S		AS	S		AS	S	
Ganglion sejt réteg	6635	5264	44.63 ± 2.79	5970	5540	41.23 ± 1.99	6549	6065	46.43 ± 2.34
Belső plexiform réteg	15903	15792	17.67 ± 1.61	17029	15765	16.01 ± 1.87	15567	16090	18.18 ± 0.94
Belső nukleáris réteg, teljes	16791	15044	42.51 ± 0.46	16501	15554	38.39 ± 1.09	15600	16590	43.21 ± 2.32
Belső szublamina, belső nukleáris réteg	6036	5559	56.06 ± 0.50	6542	5760	53.13 ± 1.98	5987	5398	57.87 ± 1.78
Külső plexiform réteg	4941	5771	29.59 ± 1.27	5482	6712	28.27 ± 1.33	4573	4980	30.99 ± 1.07
Külső nukleáris réteg	26902	23766	2.11 ± 0.22	24562	24345	1.97 ± 0.50	22983	24507	2.44 ± 0.32
Külső határoló-membrán	3616	3158	20.87 ± 2.93	3440	2997	20.54 ± 1.11	3450	3429	21.55 ± 1.65
Fotoreceptor belső szegmens réteg	3620	3423	3.91 ± 1.93	3562	3398	3.98 ± 0.91	3892	3983	3.99 ± 1.56
Fotoreceptor külső szegmens réteg	2890	3810	N.D.	1560	1342	N.D.	2821	2760	N.D.
Retinális pigment epithelium réteg	2393	3183	13.60 ± 0.97	2306	3187	11.76 ± 1.32	1980	2275	14.13 ± 1.03

1. táblázat. Az egyes CaM gének expressziójának megfeleltetett szürkeszín-értékek a felnőtt patkány retinájának egyes rétegeiben (szemikvantitatív analízis). Az értékeket a NIH Image 1.59 számítógépes képanalizáló program felhasználásával származtattuk. A vizsgálni kívánt retinális rétegeket a képernyőn körülhatároltuk, majd a specifikus szürkeszín-értékeket a szensz értékeknek az antiszensz értékekből való levonásával képeztük. A nemspecifikus (szensz) értékek 37 és 42 közé estek minden réteg esetében; 0: legvilágosabb, 255: legsötétebb érték). Egy-egy réteg átlagosan analizált területét μm^2 -ben adtuk meg. A külső határolómembrán körüli sötétebb zónát (a 9. ábrán: ►) egyben analizáltuk, noha e terület valószínűleg a fotoreceptorok mind a belső, mind a külső szegmenséből, illetve a külső határolómembrán területéről is tartalmaz szöveti elemeket. A specifikus szürkeszín-értékeket legalább 3 független hibridizációs kísérletből számoltuk $\pm$ S.D. Az egyes CaM gének expressziója között nem volt szignifikáns eltérés. AS: antiszensz, S: szensz próbával végzett hibridizáció, ND: nem detektálható.

A ganglionsejt réteg mindegyik CaM gén esetében hasomlóan nagy mennyiségben tartalmazott mRNS-eket. A jel zöme a ganglionsejtek perinukleáris régiójában volt megfigyelhető, bár az őket körülvevő neuropilnak is volt egy bizonyos fokú, diffúz jelölődése. Hasonlóan nagy mennyiségű CaM mRNS volt jelen a belső nukleáris rétegben, ahol a horizontális, bipoláris, amakrin és Müller sejtek helyezkednek el. A belső nukleáris rétegen belül annak belső szublamínájában volt a legerősebb a jelölődés (9. ábra, A; 1. táblázat), ahova többnyire az amakrin sejtek sejttestjei lokalizálhatók. A felnőtt patkány retinában ez a szublamina tartalmazza a CaM mRNS-ek legnagyobb mennyiségeit, mind a három CaM génre nézve. A jelölődés itt is főként a perikarionokra volt jellemző, míg a belső nukleáris réteg többi részén a jel diffúz, nem körülhatárolható volt, sejttestek csak ritkán voltak detektálhatók. Közepes erősségű, homogén eloszlású szignál volt megfigyelhető a többnyire neuropilból álló külső és belső plexiform rétegekben. A neuropil összetevői a belső plexiform réteg esetében a bipoláris és amakrin sejtek axonjai, a ganglion sejtek dendritjei, illetve a Müller sejtek elsődleges nyúlványai, míg a külső plexiform réteg csapok és pálcikák axonjaiból, horizontális és bipoláris sejtek dendritjeiből, valamint ugyancsak a Müller sejtek primer nyúlványaiból áll. Szintén közepes jelölődés jellemezte a retina pigment epitéliumát és az ún. külső határolómembrán környékét is, valószínűsíthetően azért, mert ezen utóbbi területen a Müller sejtek és a fotoreceptorok nyúlványai alkotnak kontaktust. Jellemzően nagyon gyenge jelölődést mutatott a csapok és pálcikák sejtmagjait tartalmazó külső nukleáris réteg, mindhárom CaM gén esetében. Érdekes, hogy a fotoreceptorok belső szegmensének rétege hasonló módon rendkívül gyenge jelet adott, a külső szegmensek rétegében pedig specifikus jel egyáltalán nem is volt detektálható (1. táblázat).

Szensz próbával csak egy rendkívül halvány, az egyes retinális rétegeket csak sejtető nonspecifikus mintázat rajzolódott ki a metszeteken, amely azonban semmiféle felismerhető sejtes szerkezethez nem volt kapcsolható (9. ábra, B). Összefoglalva tehát mindhárom CaM génre egymáshoz rendkívül hasonló, differenciált, rétegspecifikus mRNS eloszlási mintázat volt jellemző a felnőtt patkány retinában.

Megbeszélés

A mikrohullámú kezelés első közlése óta (Mayers, 1970) számos hisztológiai módszert fejlesztettek ki, amelyek a szövet felmelegítésével akár az immuncitokémiai, akár az in situ hibridizációs jel erősítését célozták (Mitchell és mtsai, 2001; Oliver és mtsai, 1997a, b). Elterjedtek olyan módszerek is, amelyekben az in situ hibridizációs érzékenység fokozásának érdekében a mikrohullámú besugárzással történő szöveti melegítést zsírolódószerek alkalmazásával kapcsolták össze (Breiningen és Baskin, 2000).

Sajnálatos módon a szöveti melegítés – akár mikrohullámú technikával, akár autoklávozással történik – vagy az erős zsírelvonó szerek alkalmazása (kloroform, triton X-100) a szöveti szerkezet kisebb-nagyobb fokú roncsolásához vezet, amely sok esetben megnehezíti, sőt gyakran lehetetlenné teszi, az immuncitológiai vagy in situ hibridizációs jel sejtszintű vagy intracelluláris lokalizálását (Norton és mtsai, 1994; Oliver és mtsai, 1999). Míg az autoklávozás paraffinba ágyazott szövetben valóban növelheti a szövetben hibridizációval detektálható mRNS tartalmat, más szövetpreparálási módszerek esetében (pl. fagyasztott metszetek) ez nem figyelhető meg. Egy kvantitatív in situ hibridizációs vizsgálat bizonyította, hogy formalinban fixált és paraffinba ágyazott metszetek autoklávozása 35-50%-kal megnövekedett szignál intenzitást (nCi/g szövetekvivalens értékben) eredményezett a fagyasztott szövetekben mért hibridizációhoz viszonyítva (Eastwood és Harrison, 1999). Bár ezek a módszerek – korlátok között – kétségtelenül alkalmasak a szignál/zaj arány javítására, ezt elsősorban a próba penetrációjának fokozásával érik el. Az általunk kifejlesztett, enyhén alkalikus pH mellett történő in situ hibridizáció nem a próba szövetbe hatolásának elősegítésével éri el az érzékenység megnövekedését, hanem a szöveti mRNS molekulák konformációjának kedvezőbbé tételével (Basyuk és mtsai, 2000; Kovács és Gulya, 2001, 2002; Szigeti és mtsai, 2003).

Basyuk és mtsai (2000) nemrég kidolgoztak egy in situ hibridizációs technikát, amelyben a módszer érzékenységének javítása érdekében alkalikus pH-t alkalmaztak a fixálóban (pH 9.5). Az általunk használt protokoll hasonló volt ehhez, de mi már nem a fixálóban, hanem a hibridizációs pufferben alkalmaztunk valamivel alacsonyabb alkalikus pH-t a CaM génekre specifikus DIG-jelölt ribopróbáink kimutatására (Kovács és Gulya, 2001, 2002). Ennek eredményeképpen olyan sejtek CaM mRNS tartalmát is sikerült detektálnunk, amelyeket korábban a nem eléggé érzékeny módszerek nem tudtak kimutatni (Ikeshima és mtsai, 1993). Az alkalikus pH-n történő fixálás önmagában nem növeli a

mRNS-ek megkötését az in situ hibridizáció alatt, viszont megnöveli azok hozzáférhetőségét a DIG-jelölt cRNS próba számára (Basyuk és mtsai, 2000). Az alkalikus pH-n történő hibridizáció tehát döntő fontosságú az érzékenység növelésében. Valószínűleg bármely in situ hibridizációs módszer alkalmas lehet az alacsony mRNS tartalom detektálására, amely alkalikus pH mellett végzi a hibridizációt. A módszer – példánk szerint – jól használható azokban a szövetekben is, ahol a mRNS tartalom hozzáférhetősége korlátozott, így például a magas lipidtartalmú szövetekben, mint a gerincvelő fehérállománya.

A radioaktív in situ hibridizációs technika röntgenfilm alkalmazásával elfogadható térbeli felbontást ad. Az emulziós autoradiográfiával kombinált in situ hibridizáció (Palfi és mtsai, 1999, 2000) esetében a felbontóképesség növekszik, s körülményessége ellenére ez a módszer még mindig alkalmas a mRNS-ek mennyiségi analízisére is. A DIG-jelölt ribopróbákkal azonban kitűnő lehetőség nyílik az in situ hibridizációs hisztokémiára, ha a cél a nagy felbontóképesség, és nincs szükség a szöveti mRNS tartalom kvantitatív mérésére, illetve megelégszünk szemikvantitatív analízissel.

Két különböző sejttípust mutattunk ki a fehérállomány lumbáris részén, amelyek a CaM géneket expresszálják (Kovacs és Gulya, 2002). Elsősorban a dorzális oszlopban találhatók nagy számban a közepes méretű, asztrocitához hasonló sejtek, míg a kisebb, oligodendrocitához hasonló sejtek a dorzális és laterális oszlopokban egyaránt megtalálhatók. A két sejttípus differenciált CaM génexpressziót mutat.

Az asztrocita típusú sejtek fő nyúlványai néha jól láthatóak a dorzális oszlopban, ahol a környező neuropil is erősebben jelölődik: itt a CaM I mRNS tartalom magasabb, a CaM III mRNS tartalom alacsonyabb szinten detektálható. A fehérállomány CaM mRNS-t expresszáló sejteinek zöme valószínűleg oligodendrocita. Eloszlásuk egyenletessége, nyúlványaik formája is erre utal: ezek a sejtek a laterális funiculusból kis szómával rendelkeznek, néha a fehérállományban radiálisan futó vékony, primer nyúlványaik is megfigyelhetők. Az oligodendrociták egységesebb jelölődést mutatnak a különböző CaM mRNS-ekre, mint a főleg a dorzális oszlopban látható nagyobb asztrociták. A CaM II és CaM III gének hasonlóan alacsony szinten expresszálódnak, míg a CaM I mRNS mennyisége valamivel nagyobb ezekben a sejtekben, és többé-kevésbé a szómára lokalizálódik. Ellentétben az oligodendrocitákkal, amelyeknek az mRNS tartalma perinukleáris régiókban és proximális nyúlványaiban oszlik el (Breitschopf és mtsai, 1992; Carson és mtsai, 1998; Landry és mtsai, 1994), az asztrociták mRNS eloszlása egyenlőtlen,

hiszen az elsődlegesen a sejttestre lokalizálódik és csak ritkán a nyúlványokra (Landry és mtsai, 1994).

A közelmúltban az agy és a gerincvelő fehérállományának néhány régiójában idegsejtesteket találtak. Basbaum és mtsai (Abaddie és mtsai, 1999) például neuronspecifikus markerekkel kimutatták, hogy a fehérállomány dorzális oszlopában olyan idegsejtek fordulnak elő, amelyek a szomatoszenzoros rendszerhez tartoznak. Hangsúlyozták, hogy ezek a neuronok nem azonosak a dorzális oszlop ventrális részén található spinocerebelláris köteg neuronjaival (Rivero-Melian és Grant, 1990), s különböznek a jóval korábban Waldeyer (1888), később pedig Scheibel és Scheibel (1968) által leírt neuronoktól is. Pozíciójuk, alakjuk és méretük alapján nem zárhatjuk ki, hogy a dorzális oszlopban a CaM mRNS-t expresszáló nagyobb sejtek némelyike az Abaddie és mtsai (1999) által leírt neurontípus. A CaM II-nél szignifikánsan magasabb CaM I és CaM III génexpresszió az agy molekuláris rétegeiben (például a szaglógumóban, a hippocampusban és a kisagyban) azt sugallja, hogy ezeknek a mRNS populációknak az intracelluláris transzportja differenciáltan történik (Palfi és mtsai, 1999). A három CaM mRNS esetében hasonlóképpen jelölt neuropil a dorzális oszlopban a neuronok jelenlétére és a dendritikusan transzportált mRNS-eikre utalhat, hiszen a fehérállomány ezen a területen erősebb jelölődést mutat, mint a laterális oszlopban.

A különböző funkciókkal rendelkező Ca^{2+} -kötő fehérjék lokalizálására a gerinces retinában évek óta folynak kutatások: a kalmodulin (Pochet és mtsai, 1991), a parvalbumin (PV), a calbindin D28K (Hamano és mtsai, 1990; Sanna és mtsai, 1990,1993), a calretinin (Pasteels és mtsai, 1990), a caldendrin (Menger és mtsai, 1999), és a guanilil-cikláz aktiváló proteinek (Braunewell és Gundelfinger, 1999; Polans és mtsai, 1996) retinális megoszlása jól ismert. Néhányan ezek közül, mint a PV, a calbindin D28K és a calretinin, bizonyos sejttípusokat specifikusabban jelölnek mint másokat, s így ezeknek a sejteknek részletesebb jellemzését teszik lehetővé. A főleg pálcikákat tartalmazó patkány retinában a parvalbumin például kimagasló mértékben az AII-amakrin sejteket jelöli, amelyek a pálcikákból induló szignalizáció legfontosabb amakrinjai, míg a többi amakrin sejtben és a ganglion sejtekben csak elhanyagolható mennyiségben van jelen (Wässle és mtsai, 1993). A calbindin D28K nagyjából az axonnal rendelkező B-típusú horizontális sejtekben (Peichl és Gonzalez-Soriano, 1994), kis amakrinokban, és a ganglionsejtek egy szubpopulációjában (Bastianelli és mtsai, 1995; Hamano és mtsai, 1990; Pasteels és mtsai, 1990) fordul elő. A calretinin számos amakrin és ganglion sejtet jelöl (Pasteels és mtsai,

1990), a caldendrin pedig az amakrin, bipoláris és ganglion sejteknek csak egy részében fejeződik ki (Menger és mtsai, 1999). Érdekes, hogy a különböző Ca^{2+} -kötő fehérjék kifejeződési mintázata fajok között még homológ sejtfeleségek esetében is jelentős eltéréseket mutat (Pochet és mtsai, 1991), s meglepő az is, hogy a calbindin D28K és a PV lokalizációjának különböző fajok közötti változatossága attól is függ, hogy mi az uralkodó fotoreceptor a retinában (Hamano és mtsai, 1990; Pasteels és mtsai, 1990), hiszen a pálcikát tartalmazó retinákban (tehát a patkány retinában is) a kis méretű amakrin sejtek dominánsan, míg a horizontális és ganglion sejtek csak kis számban jelölődtek (Sanna és mtsai, 1990; Wässle és mtsai, 1993). Immuncitokémiai módszerekkel nemrég kimutatták, hogy egy újonnan felfedezett, a kalmodulinnal sok közös vonással rendelkező Ca^{2+} -kötő fehérje alcsalád tagjai differenciálisan fejeződnek ki amakrin, pálcika és csap bipoláris sejtekben (Haeseleer és mtsai, 2000). A CaM és néhány neurális Ca^{2+} -kötő fehérje esetében (De Raad és mtsai, 1995; Pochet és mtsai, 1991) azonban a fajok közötti különbségek sokkal kevésbé kifejezettek, hiszen például a CaM fehérje retinális eloszlása hat különböző fajt összevetve is magasan konzervált: jelen van a horizontális, ganglion, amakrin és bipoláris sejtekben, míg a fotoreceptor sejtekből vagy teljesen hiányzik, vagy ezeknek csak jól definiálható részein található meg (Pochet és mtsai, 1991).

A gerinces retina CaM tartalmú sejtjeinek létét korábban csak immuncitológiai vizsgálatok bizonyították. Ezek szerint CaM tartalmú sejtek találhatóak hat állatfaj horizontális, a ganglion, az amakrin és a bipoláris sejtjeiben (Pochet és mtsai, 1991), de a fehérje vagy teljesen hiányzik a fotoreceptor sejtekből (Pochet és mtsai, 1991), vagy jelenléte e sejtekben jól körülhatárolható. Az egyik korábbi, elektronmikroszkópos immunogold technikával kivitelezett vizsgálatban például azt találták, hogy a CaM előfordulása a macskában a pálcikák külső szegmensének disztális régiójára (Wakakura és Yamamoro, 1987), míg más vizsgálatok azt mutatták ki, hogy a CaM jelenléte a külső és belső szegmens közötti ciliáris kiterjedésre korlátozódott (Chaitin és Bok, 1984; Roof és Applebury, 1984). Valószínűleg a viszonylag kis mennyiségű CaM mRNS tartalomnak, illetve az eddigi hibridizációs technikák alacsony érzékenységének tulajdonítható, hogy nincs in situ hibridizációs bizonyíték a kérdés eldöntésére. Az általunk kifejlesztett érzékeny ISH módszer azonban, amely a DIG-jelölt, CaM génekre specifikus cRNS próbákat enyhén alkalikus pH-jú hibridizációs oldatban alkalmazza (Kovacs és Gulya, 2001, 2002), a felnőtt patkány retina különböző rétegeiben széleskörű CaM mRNS eloszlást tárt fel. A differenciális, CaM génekre specifikus, normál (Kortvely és mtsai,

2002; Kovacs és Gulya, 2002; Palfi és mtsai, 1999) és kísérletes körülmények melletti (Palfi és Gulya, 1999; Palfi és mtsai, 2001; Vizi és Gulya, 2000) központi idegrendszeri mRNS megoszlással ellentétben, ahol a 3 CaM transzkriptum egymástól eltérő mennyiségben oszlik el a különböző agyterületeken, a retinában ezek lényegében azonos mennyiségben és nagyon hasonló rétegspecifikus megoszlásban lokalizálódtak. A különböző CaM gének transzkriptumainak egymáshoz ennyire hasonló eloszlása a központi idegrendszer más területein nem ismert.

A különböző CaM génekről átíródó mRNS-ek eloszlását a fehérje eloszlásával összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy azok a patkány retinában nagymértékben megegyeznek. Mi azonban nemcsak a nukleáris és plexiform rétegekben detektáltunk CaM transzkriptumokat, amelyek egérben a CaM fehérje lokalizációs területei (Pochet és mtsai, 1991), vagyis a ganglionsejt réteg, a külső és belső plexiform és a belső nukleáris réteg területén, hanem a retina más rétegeiben is. Nem kaptunk viszont specifikus hibridizációs szignált a fotoreceptorok külső szegmensének rétegében. Ez a megfigyelés egyezik egy korábbi immunhisztokémiai eredménnyel (Pochet és mtsai, 1991), szemben áll viszont egy másik közlemény megállapításával, amelyben a macska retinát vizsgálták (Wakakura és Yamamoto, 1987). A perikarionális jelölődés egyértelmű volt a ganglion sejtekben és a belső nukleáris réteg belső szublamínájában megfigyelhető (valószínűsíthetően) amakrin típusú sejtekben. A külső határolómembrán zónája is közepes mennyiségű CaM mRNS-t tartalmazott. Mivel ez a terület főként a Müller gliának a fotoreceptorokkal, a csap sejtek szómáival és pálcikák belső szegmenseinek mioid részével képzett kapcsolatait tartalmazza, az itt kimutatható mRNS populáció valószínűleg kevert eredetű, azaz egyaránt tartalmaz gliális és neuronális (fotoreceptor) eredetű mRNS-eket. A pálcikák mioid része és a csapok perikarionja nemcsak mitokondriumokat, hanem Golgi-komplexumot és endoplazmatikus retikulumot, a fehérjeszintézis és poszttranszlációs módosítás elsődleges helyszíneit is tartalmazza (Hargrave, 1986; Olive, 1980).

Érdekes, hogy a Müller sejteknek szerepet tulajdonítanak a látás Ca^{2+} -szignalizációjában is (Bringmann és mtsai, 2000; Newman, 1985, 1996). Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a csak fénymikroszkópos vizsgálatra alkalmas, alacsony felbontású képet adó in situ hibridizációs módszerrel nem tudtuk pontosan jellemezni a szignál eloszlását a retinának ezen a részén. A fotoreceptorok külső szegmenseinek rétegéből teljesen hiányzott a specifikus hibridizációs szignál, ami nem meglepő, tekintve, hogy a külső szegmensek jól rendezett membránokkal vannak kitöltve, és ezen a területen sem

mitokondriumok, sem pedig fehérjeszintézisben résztvevő sejtorganellumok nem találhatók (Olive, 1980).

Vizsgálatunk indirekt bizonyítékot szolgáltatott a retinában a perikarionból a nyúlványok felé történő intracelluláris CaM mRNS transzportra: mindhárom CaM gén transzkriptumai intermedier szignál intenzitásúak azokban a rétegekben, amelyek elsődlegesen neuropilból (külső és belső plexiform rétegek) állnak, a csapok és pálcikák, a bipoláris és amakrin sejtek axonjait, a ganglion, horizontális és bipoláris sejtek dendritjeit, valamint a Müller-féle gliasejtek proximális nyúlványait tartalmazzák. Több, közelmúltban megjelent tanulmány eredményeivel összhangban korábban munkacsoportunk is felhívta a figyelmet a dendritikusan transzportált CaM mRNS-ek neuronális szignalizációs folyamatokban betöltött fontosságára (Palfi és mtsai, 1999; 2002), illetve a lokális proteinszintézis lehetőségére a patkány agyban (Palfi és mtsai, 1999) és primer hippocampális szövettenyészetben (Kortvely és mtsai, 2003). Ennek megfelelően a CaM mRNS-ek szerepe a külső határolómembránban az lehet, hogy biztosítsa a nagyszámú CaM-függő célproteinek számára a CaM fehérjét a lokális szükségleteknek megfelelően: ilyenek a csapok rezidens fehérjei, többek között a G-protein kapcsolt receptor kinázok (Chuang és mtsai, 1996; Pronin és mtsai, 1997) és a cGMP-kapuzott fotoreceptor csatornák (Chen és mtsai, 1994; Haynes és Stotz, 1997; Schwarzer és mtsai, 2000).

Egy másik indirekt bizonyíték is arra utal, hogy a CaM elsődleges szerepe a lokális Ca^{2+} -szignalizációban elsősorban a célenzimek szabályozásán, nem pedig az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció szabályozásán keresztül valósul meg. A Ca^{2+} /CaM függő protein kináz I immunhisztokémiai lokalizációja a retinában például bizonyította ennek jelenlétét a ganglionsejtekben és a belső nukleáris réteg néhány más sejtjében is (Tsumura és mtsai 1999). Ezzel ellentétben, a Ca^{2+} /CaM függő protein kináz IV immuncitokémiai vizsgálata azt bizonyította, hogy ez az enzim alacsony mennyiségben található meg a ganglionsejtekben, de nagy mennyiségben figyelhető meg a belső nukleáris réteg belső szublamínájában (Sakagami és Kondo, 1996). Így mindkét Ca^{2+} /CaM függő protein kináz jelen van azokban a retina rétegekben, ahol a CaM génexpresszió a legkifejezettebb. Érdekes, hogy egy másik CaM célfehérjét, a Ca^{2+} /CaM függő protein kináz II-t, a kolinerg marker enzimmel, a kolin acetiltranszferázzal kolokalizáltak az amakrin sejtek perikarionjában és a belső plexiform réteg ganglionsejtjeinek szómáiban (Ochiishi és mtsai, 1994; Terashima és mtsai, 1994). Mivel ezek a retinális rétegek számottevő mennyiségben tartalmazzák CaM mRNS populációkat, illetve a Ca^{2+} /CaM protein kináz II

lényegesen eltérő lokalizációs mintázatot mutatott a Ca^{2+} /CaM kináz I és IV-hez viszonyítva, felvetődhet annak a lehetősége, hogy ezek a Ca^{2+} /CaM kinázok a vizuális szignalizációs folyamatok eltérő funkcióit szabályozzák. A különböző retinális sejttípusok CaM génexpressziójának további vizsgálata elengedhetetlenül fontos ezen kináz gének szignalizációban betöltött szerepeinek tisztázásához.

A patkány gerincvelő fehérállományában és a retinában elvégzett in situ hibridizációs vizsgálataink elsőként derítették ki a CaM transzkriptumok szöveti eloszlását ezeken a területeken. A CaM expresszáló sejtek típusainak pontos meghatározása egyrészt a laboratóriumunkban korábban kifejlesztett elektronmikroszkópos in situ hibridizációs módszerrel, másrészt az in situ hibridizációt gliális és/vagy neuronális markereket felhasználó immunhisztológiával kombináló módszerekkel lehetséges.

Összegzés

Vizsgálataink során az alábbi megállapításokat tettük:

- 1) A különböző in situ hibridizációs módszerek egyes paramétereit összehasonlítva (a szövet mikrohullámú roncsolása, zsírtartalmának eltávolítása, a hibridizációs oldat pH-jának változtatása) megállapítottuk, hogy az enyhén alkalikus pH mellett történő hibridizáció (pH 8.0) olyan szövetben is nagy érzékenységgel mutatja ki a CaM mRNS-ek különböző populációit, ahol azok nagyon alacsony koncentrációban vannak jelen, vagy a szövet magas zsírtartalmú (Kovacs, 2003; Szigeti és mtsai, 2003).
- 2) Enyhén alkalikus pH mellett történő színes in situ hibridizációs technikánkat az alacsony kópiaszámú CaM transzkriptumok detektálására optimalizáltuk a felnőtt patkány gerincvelő fehérállományában (Kovacs és Gulya, 2001, 2002) és a retinában (Kovacs és Gulya, 2003).
- 3) Érzékeny, színes in situ hibridizációs módszerünket használva két olyan gliasejtípust (valószínűleg asztrocitákat és oligodendrocitákat) térképeztünk fel, amelyek a patkány lumbáris gerincvelőjének fehérállományában differenciálisan expresszálják a CaM géneket (Kovacs és Gulya, 2001, 2002; Palfi és mtsai, 2002; 2832. oldal, 2. kép). Ezen sejtek pontos azonosítása a további kísérletek során egy elektronmikroszkópos in situ hibridizációs módszer feladata lesz. Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy a felnőtt patkány gerincvelő CaM expressziója sokkal gazdagabb és sokrétűbb, mint azt eddig gondoltuk. A fehérállomány CaM pozitív sejtjeinek – az asztrocitáknak és az oligodendrocitáknak – további, elsősorban funkcionális génexpressziós vizsgálatai felderíthetik e fehérjének a glia-neuron interakcióban, a szignalizációban és a mielinizációban betöltött esetleges szerepét is.
- 4) A felnőtt patkány retinájában a CaM gének transzkriptumainak mennyisége alacsony. Érzékeny in situ hibridizációs módszerünk segítségével leírtuk ezen mRNS populációk megoszlását felnőtt állatban élettani körülmények között (Kovacs és Gulya, 2003). A CaM mRNS-ek egymáshoz meglepően hasonló, de jellegzetesen rétegspecifikus megoszlását figyeltük meg. A különböző retina rétegekben megfigyelt eltérő intenzitású CaM génexpresszió e fehérjének közvetlen szerepét bizonyítja a vizuális szignalizációs folyamatokban. Bár a különböző CaM géneknek a látási folyamatokban betöltött szerepére nagyon kevés a közvetlen adatunk, kísérleteinkben megteremtettük

azt az anatómiai alapot, amelyre támaszkodva ezen géneknek expressziós mintázatát és funkcióinak analízisét a neurális retina élettani és kórélettani körülményei mellett vizsgálni lehet.

Felhasznált irodalom

- Abaddie C, Skinner K, Mitrovic I, Basbaum AI. Neurons in the dorsal column white matter of the spinal cord: complex neuropil in an unexpected location. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96:260–265.
- Agell N, Aligue R, Alemany V, Castro A, Jaime M, Pujol MJ, Rius E, Serratosa J, Taules M, Bachs O. New nuclear functions for calmodulin. *Cell Calcium* (1998) 23:115–121.
- Ainger K, Avossa D, Morgan F, Hill SJ, Barry C, Barbarese E, Carson JH. Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J Cell Biol* (1993) 123:431–441.
- Armstrong DL. Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca^{2+} -activated phosphatase in mammalian brain. *Trends Neurosci* (1989) 12:117–122.
- Bachs O, Agell N, Carafoli E. Calcium and calmodulin function in the cell nucleus. *Biochim Biophys Acta* (1992) 1113:259–270.
- Bachs O, Agell N, Carafoli E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in the nucleus. *Cell Calcium* (1994) 16:289–296.
- Barbarese E, Koppel DE, Deutscher MP, Smith CL, Ainger K, Morgan F, Carson JH. Protein translation components are colocalized in granules in oligodendrocytes. *J Cell Sci* (1995) 108: 2781–2790.
- Bastianelli E, Takamatsu K, Okazaki K, Hidaka H, Pochet R, Hippocalcin in rat retina. Comparison with calbindin-D28k, calretinin and neurocalcin. *Exp Eye Res* (1995) 60:257–266.
- Basyuk E, Bertrand E, Journot L. Alkaline fixation drastically improves the signal of in situ hybridization. *Nucl Acids Res* (2000) 28:e46.
- Beaudoing E, Freier S, Wyatt JR, Claverie JM, Gautheret D. Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res* (2000) 10:1001–1010.
- Beaudoing E, Gautheret D. Identification of Alternate Polyadenylation Sites and Analysis of their Tissue Distribution Using EST Data. *Genome Res* (2001) 11:1520–1526.
- Berry F, Brown IR. Developmental expression of calmodulin mRNA and protein in regions of the postnatal rat brain. *J Neurosci Res* (1995) 42:613–622.
- Berry FB, Brown IR. CaM I mRNA is localized to apical dendrites during postnatal development of neurons in the rat brain. *J Neurosci Res* (1996) 43:565–575.
- Bobrow MN, Litt GJ, Shaughnessy KJ, Mayer PC, Conlon J. The use of catalyzed reporter deposition as a means of signal amplification in a variety of formats. *J Immunol Methods* (1992) 150:145–149.
- Bobrow MN, Shaughnessy KJ, Litt GJ. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. II. Application to membrane immunoassays. *J Immunol Methods* (1991) 137:103–112.
- Braunewell K-H, Gundelfinger ED. Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell and Tissue Res* (1999) 295: 1–12.

- Breining JF, Baskin DG. Fluorescence in situ hybridization of scarce leptin receptor mRNA using the enzyme-labeled fluorescent substrate method and tyramide signal amplification. *J Histochem Cytochem* (2000) 48:1593-1599.
- Breitschopf H, Suchanek G, Gould RM, Colman DR, Lassmann H. In situ hybridization with digoxigenin-labeled probes: sensitive and reliable detection method applied to myelinating rat brain. *Acta Neuropathol* (1992) 84: 581-587.
- Bringmann A, Schopf S, Reichenbach A. Developmental regulation of calcium channel-mediated currents in retinal glial (Müller) cells. *J Neurophys* (2000) 84: 2975-2983.
- Brophy PJ, Boccaccio GL, Colman DR. The distribution of myelin basic protein mRNAs within myelinating oligodendrocytes. *Trends Neurosci* (1993) 16:515-521.
- Brostrom CO, Huang YC, Breckenridge BM, Wolff DJ. Identification of a calcium-binding protein as a calcium-dependent regulator of brain adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* (1975) 72:64-68.
- Caceres A, Bender P, Snavely L, Rebhun LI, Steward O. Distribution and subcellular localization of calmodulin in adult and developing brain tissue. *Neurosci* (1983) 10:449-461.
- Carson JH, Kwon S, Barbarese E. RNA trafficking in myelinating cells. *Curr. Opin. Neurobiol* (1998) 8:607-612.
- Casal C, Tusell JM, Serratosa J. Role of calmodulin in the differentiation/activation of microglial cells. *Brain Res.* (2001) 902:101-107.
- Chaitin MH, Bok D. Immunoferritin localization of actin, myosin and calmodulin in photoreceptor outer segments. *J Cell Biol* (1984) 99:114a.
- Chen T-Y, Illing M, Molday LL, Hsu Y-T, Yau K-W, Molday RS. Subunit 2 (or β) of retinal rod cGMP-gated cation channel is a component of the 240-kDa channel-associated protein and mediates Ca^{2+} -calmodulin modulation. *Proc Nat Acad Sci USA* (1994) 91:11757-11761.
- Cheung WY. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Sci* (1980) 207:19-27.
- Chuang TT, Paolucci L, De Blasi A. Inhibition of G protein-coupled receptor kinase subtypes by Ca^{2+} /calmodulin. *J Biol Chem* (1996) 271:28691-28696.
- Cimino M, Chen JF, Weiss B. Ontogenetic development of calmodulin mRNA in rat brain using in situ hybridization histochemistry. *Dev Brain Res* (1990) 54:43-49.
- Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* (1995) 80:259-268.
- Corneliussen B, Holm M, Waltersson Y, Onions J, Hallberg B, Thornell A, Grundstrom T. Calcium/calmodulin inhibition of basic-helix-loop-helix transcription factor domains. *Nature* (1994) 368:760-764.
- Crocker G, Dawson RA, Barton CH, MacNeil S. An extracellular role for calmodulin-like activity in cell proliferation. *Biochem J* (1988) 253:877-884.
- Dash PK, Karl KA, Colicos MA, Prywes R, Kandel ER. cAMP response element-binding protein is activated by Ca^{2+} /calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) 88:5061-5065.
- De Raad S, Comte M, Nef P, Lenz SE, Gundelfinger ED, Cox JA. Distribution pattern of three neural calcium-binding proteins (NCS-1, VILIP and recoverin) in chicken, bovine and rat retina. *Histochem J* (1995) 27:524-535.

- Decker CJ, Parker R. Diversity of cytoplasmic functions for the 3' untranslated region of eukaryotic transcripts. *Curr Opin Cell Biol* (1995) 7:386-392.
- DeLorenzo RJ, Freedman SD, Yohe WB, Maurer SC. Stimulation of Ca^{2+} -dependent neurotransmitter release and presynaptic nerve terminal protein phosphorylation by calmodulin and a calmodulin-like protein isolated from synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* (1979) 76:1838-1842.
- DeLorenzo RJ. Calmodulin in neurotransmitter release and synaptic function. *Fed Proc* (1982) 41:2265-2272.
- DeLorenzo RJ. Role of calmodulin in neurotransmitter release and synaptic function. *Ann N Y Acad Sci* (1980) 356:92-109.
- Durrant I, Brunning S, Eccleston L, Chadwick P, Cunningham M. Fluorescein as a label for non-radioactive in situ hybridization. *Histochem J* (1995) 27:94-99.
- Eastwood SL, Harrison PJ. Detection and quantification of hippocampal synaptophysin messenger RNA in schizophrenia using autoclaved, formalin-fixed paraffin wax-embedded sections. *Neurosci* (1999) 93:99-106.
- Eberwine J, Miyashiro K, Kacharina JE, Job C. Local translation of classes of mRNAs that are targeted to neuronal dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) 98:7080-7085.
- Enslen H, Soderling TR. Roles of calmodulin-dependent protein kinases and phosphatase in calcium-dependent transcription of immediate early genes. *J Biol Chem* (1994) 269:20872-20877.
- Fujisawa H, Yamauchi T, Nakata H, Okuno S. Role of calmodulin in neurotransmitter synthesis. *Fed Proc* (1984) 43:3011-3014.
- Gannon MN, McEwen BS. Distribution and regulation of calmodulin mRNAs in rat brain. *Mol Brain Res* (1994) 22:186-192.
- Gao FB. Messenger RNAs in dendrites: localization, stability, and implications for neuronal function. *Bioessays* (1998) 20:70-78.
- Gardiol A, Racca C, Triller A. Dendritic and postsynaptic protein synthetic machinery. *J Neurosci* (1999) 19:168-179.
- Gebicke-Haerter, PJ, Van Calker D, Nörenberg W, Illes P. Molecular mechanisms of microglial activation. A. Implications for regeneration and neurodegenerative diseases, *Neurochem. Int.* (1996) 29:1-12.
- Ghosh A, Greenberg ME. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Sci* (1995) 268:239-247.
- Goberdhan NJ, Dawson RA, Freedlander E, Mac Neil S. A calmodulin-like protein as an extracellular mitogen for the keratinocyte. *Br J Dermatol* (1993) 129:678-688.
- Griffith LC, Schulman H. The multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca^{2+} -dependent phosphorylation of tyrosine hydroxylase. *J Biol Chem* (1988) 263:9542-9549.
- Haeseleer F, Sokal I, Verlinde CL, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pronin AN, Benovic JL, Fariss RN, Palczewski K. Five members of a novel Ca^{2+} -binding protein (CABP) subfamily with similarity to calmodulin. *J Biol Chem* (2000) 275:1247-1260.
- Hamano K, Kiyama H, Emson PC, Manabe R, Nakauchi M, Tohyama M. Localization of two calcium binding proteins, calbindin (28 kD) and parvalbumin (12 kD), in the

- vertebrate retina. *J Comp Neurol* (1990) 302:417–424.
- Hargrave PA. Molecular dynamics of the rod cell. In: Adler R, Farber D (Eds), *The retina. A model for cell biology studies. Part I.* Academic Press, NY, pp. (1986) 207-237.
- Haynes LW, Stotz SC. Modulation of rod, but not cone, cGMP-gated photoreceptor channels by calcium-calmodulin. *Vis Neurosci* (1997) 14:233-239.
- Hoskins B, Burton CK, Liu DD, Porter AB, Ho IK. Regional and subcellular calmodulin content of rat brain. *J Neurochem* (1986) 46:303-304.
- Hrabovszky E, Petersen SL. Increased concentrations of radioisotopically-labeled complementary ribonucleic acid probe, dextran sulfate, and dithiothreitol in the hybridization buffer can improve results of in situ hybridization histochemistry. *J Histochem Cytochem* (2002) 50:1389-1400.
- Ikeshima H, Yuasa S, Matsuo K, Kawamura K, Hata J, Takano T. Expression of three nonallelic genes coding calmodulin exhibits similar localization on the central nervous system of adult rats. *J Neurosci Res* (1993) 36:111-119.
- Kakiuchi S, Yamazaki R, Teshima Y, Uenishi K, Miyamoto E. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat tissues and occurrence of a calcium-plus-magnesium-ion-dependent phosphodiesterase and its protein activator. *Biochem J* (1975) 146:109-120.
- Kakiuchi S, Yamazaki R. Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (3). *Biochem Biophys Res Commun* (1970) 41:1104-1110.
- Kapiloff MS, Mathis JM, Nelson CA, Lin CR, Rosenfeld MG. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase mediates a pathway for transcriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) 88:3710-3714.
- Kelly PT, McGuinness TL, Greengard P. Evidence that the major postsynaptic density protein is a component of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* (1984) 81:945-949.
- Kennedy MB, Bennett MK, Erondy NE. Biochemical and immunochemical evidence that the "major postsynaptic density protein" is a subunit of a calmodulin-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* (1983) 80:7357-7361.
- Kennedy MB, Greengard P. Two calcium/calmodulin-dependent protein kinases, which are highly concentrated in brain, phosphorylate protein I at distinct sites. *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) 78:1293-1297.
- Kennedy MB. Regulation of neuronal function by calcium. *Trends Neurosci* (1989) 12:417-420.
- Kislauskis EH, Zhu X, Singer RH. Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J Cell Biol* (1994) 127:441-451.
- Kitamura Y, Miyazaki A, Yamanaka Y, Nomura Y. Stimulatory effects of protein kinase C and calmodulin kinase II on N-methyl-D-aspartate receptor/channels in the postsynaptic density of rat brain. *J Neurochem* (1993) 61:100-109.
- Knowles RB, Sabry JH, Martone ME, Deerinck TJ, Ellisman MH, Bassell GJ, Kosik KS. Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neurosci* (1996) 16:7812-7820.

- Kohnken RE, Chafouleas JG, Eadie DM, Means AR, McConnel DG. Calmodulin in bovine rod outer segments. *J Biol Chem* (1981) 256:12517-12522.
- Kortvely E, Palfi A, Bakota L, Gulya K. Ontogeny of calmodulin gene expression in rat brain. *Neurosci* (2002) 114:301-316.
- Kortvely E, Varszegi S, Palfi A, Gulya K. Intracellular targeting of calmodulin mRNAs in primary hippocampal cells. *J Histochem Cytochem* (2003) 51:541-544.
- Kovacs B. Calmodulin gene expression in central nervous system areas of low calmodulin abundance. *Acta Biol Szeged* 47 (2003) (in press)
- Kovacs B, Gulya K. A color in situ hybridization method with improved sensitivity for the detection of low-abundance mRNAs. *Acta Biol Szeged* (2001) 45:75-77.
- Kovacs B, Gulya K. Differential expression of multiple calmodulin genes in cells of the white matter of the rat spinal cord. *Mol Brain Res* (2002) 102:28-34.
- Kovacs B, Gulya K. Calmodulin gene expression in the neural retina of the adult rat. *Life Sciences* (2003) 73:3213-3224.
- Kuhn DM, Lovenberg W. Role of calmodulin in the activation of tryptophan hydroxylase. *Fed Proc* (1982) 41:2258-2264.
- Lan HY, Mu W, Ng YY, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC. A simple, reliable, and sensitive method for nonradioactive in situ hybridization: use of microwave heating to improve hybridization efficiency and preserve tissue morphology. *J Histochem Cytochem* (1996) 44:281-287.
- Landry CF, Watson JB, Kashima T, Campagnoni AT. Cellular influences on RNA sorting in neurons and glia: an in situ hybridization histochemical study. *Mol Brain Res* (1994) 27:1-11.
- Lerea LS, McNamara JO. Ionotropic glutamate receptor subtypes activate c-fos transcription by distinct calcium-requiring intracellular signaling pathways. *Neuron* (1993) 10:31-41.
- Lieberman DN, Mody I. Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca(2+)-dependent phosphatase. *Nature* (1994) 369:235-239.
- Lin YM, Liu YP, Cheung WY. Cyclic 3':5'-nucleotide phosphodiesterase. Purification, characterization, and active form of the protein activator from bovine brain. *J Biol Chem* (1974) 249:4943-4954.
- Lisman J. The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci* (1994) 17:406-412.
- Liu LO, Li G, McCall MA, Cooper NGF. Photoreceptor regulated expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in the mouse retina. *Mol Brain Res* (2000) 82:150-166.
- Liu YC, Storm DR. Regulation of free calmodulin levels by neuromodulin: neuron growth and regeneration. *Trends Pharmacol Sci* (1990) 11:107-111.
- Lu KP, Means AR. Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin. *Endocr Rev* (1993) 14:40-58.
- Lu YF, Hayashi Y, Moriwaki A, Tomizawa K, Matsui H. FK506, a Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphatase inhibitor, inhibits the induction of long-term potentiation in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* (1996) 205:103-106.

- MacManus JP, Gillen MF, Korczak B, Nojima H. Differential calmodulin gene expression in fetal, adult, and neoplastic tissues of rodents. *Biochem Biophys Res Commun* (1989) 159:278-282.
- MacNeil S, Dawson RA, Crocker G, Barton CH, Hanford L, Metcalfe R, McGurk M, Munro DS. Extracellular calmodulin and its association with epidermal growth factor in normal human body fluids. *J Endocrinol* (1988) 118:501-509.
- Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Nicoll RA. The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission-its role in long-term potentiation. *Trends Neurosci* (1989) 12:444-450.
- Manalan AS, Klee CB. Calmodulin. *Adv Cycl Nucl Prot Phosph Res* (1984) 18:227-278.
- Martone ME, Pollock JA, Jones YZ, Ellisman MH. Ultrastructural localization of dendritic messenger RNA in adult rat hippocampus. *J Neurosci* (1996) 16:7437-7446.
- Matsuoka I, Giuli G, Poyard M, Stengel D, Parma J, Guellaen G, Hanoune J. Localization of adenylyl and guanylyl cyclase in rat brain by in situ hybridization: comparison with calmodulin mRNA distribution. *J Neurosci* (1992) 12:3350-3360.
- Matthews RP, Guthrie CR, Wailes LM, Zhao X, Means AR, McKnight GS. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. *Mol Cell Biol* (1994) 14:6107-6116.
- Mayers CP. Histological fixation by microwave heating. *J. Clin Pathol* (1970) 23:273-275.
- McGlade-McCulloh E, Yamamoto H, Tan SE, Brickey DA, Soderling TR. Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Nature* (1993) 362:640-642.
- Means AR, Tash JS, Chafouleas JG. Physiological implications of the presence, distribution, and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. *Physiol Rev* (1982) 62:1-39.
- Means AR, VanBerkum MF, Bagchi I, Lu KP, Rasmussen CD. Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacol Ther* (1991) 50:255-270.
- Medrano S, Steward O. Differential mRNA localization in astroglial cells in culture. *J Comp Neurol* (2001) 430:56-71.
- Menger N, Seidenbecher CI, Gundelfinger ED. The cytoskeleton-associated neuronal calcium-binding protein caldendrin is expressed in a subset of amacrine, bipolar and ganglion cells of the rat retina. *Cell and Tissue Res* (1999) 298:21-32.
- Miller SG, Kennedy MB. Distinct forebrain and cerebellar isozymes of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase associate differently with the postsynaptic density fraction. *J Biol Chem* (1985) 260:9039-9046.
- Mitchell V, Feyereisen K, Bouret S, Leroy D, Beauvillain J-C. Microwave startegy for improving the simultaneous detection of estrogen receptor and galanin receptor mRNA in the rat hypothalamus. *J Histochem Cytochem* (2001) 49:901-910.
- Mohr E. Subcellular RNA compartmentalization. *Prog Neurobiol* (1999) 57:507-525.
- Mori Y, Imaizumi K, Katayama T, Yoneda T, Tohyama M. Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of alpha-CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nat Neurosci* (2000) 3:1079-1084.

- Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* (1994) 369:486-488.
- Nagao S, Yamazaki A, Bitensky MW. Calmodulin and calmodulin binding proteins in amphibian rod outer segments. *Biochem* (1987) 26:1659-1665.
- Newman EA, Reichenbach A. The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* (1996) 19:307-317.
- Newman EA. Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature* (1985) 317:809-811.
- Ni B, Landry CF, Brown IR. Developmental expression of neuronal calmodulin mRNA species in the rat brain analyzed by in situ hybridization. *J Neurosci Res* (1992) 33:559-567.
- Ni B, Rush S, Gurd JW, Brown IR. Molecular cloning of calmodulin mRNA species which are preferentially expressed in neurons in the rat brain. *Mol Brain Res* (1992) 13:7-17.
- Nichols RA, Sihra TS, Czernik AJ, Nairn AC, Greengard P. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II increases glutamate and noradrenaline release from synaptosomes. *Nature* (1990) 343:647-651.
- Nicoll RA, Kauer JA, Malenka RC. The current excitement in long-term potentiation. *Neuron* (1988) 1:97-103.
- Nojima H, Kishi K, Sokabe H. Multiple calmodulin mRNA species are derived from two distinct genes. *Mol Cell Biol* (1987) 7:1873-1880.
- Nojima H, Sokabe H. Structure of a gene for rat calmodulin. *J. Mol Biol* (1987) 193:439-445.
- Nojima H, Sokabe H. Structure of rat calmodulin processed genes with implications for a mRNA-mediated process of insertion. *J Mol Biol* (1986) 190:391-400.
- Nojima H. Structural organization of multiple rat calmodulin genes. *J Mol Biol* (1989) 208:269-282.
- Norton AJ, Jordan S, Yeomans P. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J Pathol* (1994) 173:371-379.
- Ochiishi T, Terashima T, Sugiura H, Yamauchi T. Immunohistochemical localization of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in the rat retina. *Brain Res* (1994) 634:257-265.
- Oh S. The generation of nitric oxide and its roles in neurotransmission and neurotoxicity. *Keio J Med* (1995) 44:53-61.
- Olive L. The structural organization of mammalian retina disc membrane. *Int Rev Cyt* (1980) 64:107-169.
- Oliver KR, Heavens, RP, Sirinathsinghji DJS. Quantitative comparison of pretreatment regimens used to sensitize in situ hybridization using oligonucleotide probes on paraffin-embedded brain tissue. *J Histochem Cytochem* (1997a) 45:1707-1713.
- Oliver KR, Wainwright A, Heavens, RP, Sirinathsinghji DJS. Retrieval of cellular mRNA in paraffin-embedded human brain using hydrated autoclaving. *J Neurosci Meth* (1997b) 77:169-174.

- Ouimet CC, McGuinness TL, Greengard P. Immunocytochemical localization of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* (1984) 81:5604-5608.
- Palfi A, Gulya K. Water deprivation upregulates the three calmodulin genes in exclusively the supraoptic nucleus of the rat brain. *Mol Brain Res* (1999) 74:111-116.
- Palfi A, Hatvani L, Gulya K. A new quantitative film autoradiographic method of quantifying mRNA transcripts for in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* (1998) 46:1141-1149.
- Palfi A, Kortvely E, Fekete E, Kovacs B, Varszegi S, Gulya K. Differential calmodulin gene expression in the rodent brain. *Life Sci* (2002) 70:2829-2855.
- Palfi A, Simonka JA, Pataricza M, Tekulics P, Lepran I, Papp G, Gulya K. Postschismic calmodulin gene expression in the rat hippocampus. *Life Sci* (2001) 68:2373-2381.
- Palfi A, Tarcsa M, Varszegi A, Gulya K. Calmodulin gene expression in an immortalized striatal GABAergic cell line. *Acta Biol Hung* (2000) 51:65-71.
- Palfi A, Vizi S, Gulya K. Differential distribution and intracellular targeting of mRNAs corresponding to the three calmodulin genes in rat brain: a quantitative in situ hybridization study. *J Histochem Cytochem* (1999) 47:583-600.
- Pasteels B, Rogers J, Blachier F, Pochet R. Calbindin and calretinin localization in retina from different species. *Vis Neurosci* (1990) 5:1-6.
- Peichl L, Gonzalez-Soriano J. Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Vis Neurosci* (1994) 11:501-517.
- Pochet R, Pasteels B, Seto-Ohshima A, Bastianelli E, Kitajima S, Eldik LH van. Calmodulin and calbindin localization in retina from six different species. *J Comp Neurol* (1991) 314:750-762.
- Polans A, Baehr W, Palczewski K. Turned on by Ca^{2+} ! The physiology and pathology of Ca^{2+} -binding proteins in the retina. *Trends Neurosci* (1996) 19:547-554.
- Price NE, Mumby MC. Brain protein serine/threonine phosphatases. *Curr Opin Neurobiol* (1999) 9:336-342.
- Pronin AN, Satpaev DK, Slepak VZ, Benovic JL. Regulation of G protein-coupled receptor kinases by calmodulin and localization of the calmodulin binding domain. *J Biol Chem* (1997) 272:18273-18280.
- Racca C, Gardiol A, Triller A. Dendritic and postsynaptic localizations of glycine receptor alpha subunit mRNAs. *J Neurosci* (1997) 17:1691-1700.
- Rao A, Steward O. Evaluation of RNAs present in synaptodendrosomes: dendritic, glial, and neuronal cell body contribution. *J Neurochem* (1993) 61:835-844.
- Rao A, Steward O. Evidence that protein constituents of postsynaptic membrane specializations are locally synthesized: analysis of proteins synthesized within synaptosomes. *J Neurosci* (1991) 11:2881-2895.
- Rasmussen CD, Means AR. Calmodulin, cell growth and gene expression. *Trends Neurosci* (1989) 12:433-438.
- Relf BL, Machaalaani R, Waters KA. Retrieval of mRNA from paraffin-embedded human infant brain tissue for non-radioactive in situ hybridization using oligonucleotides. *J Neurosci Methods* (2002) 115:129-136.

- Remgard P, Ekstrom AR, Wiklund P, Edstrom A. Calmodulin and in vitro regenerating frog sciatic nerves: release and extracellular effects. *Eur J Neurosci* (1995) 7:1386-1392.
- Rivero-Melian C, Grant G. Lumbar dorsal root projections to spinocerebellar cell groups in the rat spinal cord: a double labeling study. *Exp Brain Res* (1990) 81:85-94.
- Roberts-Lewis JM, Cimino M, Krause RGD, Tyrrell DF, Davis LG, Weiss B, Lewis ME. Anatomical localization of calmodulin mRNA in the rat brain with cloned cDNA and synthetic oligonucleotide probes. *Synapse* (1990) 5:247-254.
- Roof DJ, Applebury ML. Cytoskeletal specializations of the vertebrate rod outer segment. *J Cell Biol* (1984) 99:114a.
- Sakagami H, Kondo H. Immunohistochemical localization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV in the mature and developing rat retina. *Brain Res* (1996) 719:154-160.
- Sanna PP, Keyser KT, Battenberg E, Bloom FE. Parvalbumin immunoreactivity in the rat retina. *Neurosci Lett* (1990) 118:136-139.
- Sanna PP, Keyser RT, Celio MR, Karten HJ, Bloom FE. Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the vertebrate retina. *Brain Res* (1993) 600:141-150.
- Sarthy PV, Fu M, Huang J. Subcellular localization of an intermediate filament protein and its mRNA in glial cells. *Mol Cell Biol* (1989) 9:4556-4559.
- Scheibel ME, Scheibel AB. Terminal axon patterns in cat spinal cord. II. The dorsal horn. *Brain Res* (1968) 9:32-58.
- Schulman H, Hyman SE. Intracellular signaling. Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR (Eds). Academic Press, San Diego (1999) pp. 269-316
- Schwarzer A, Schauf H, Bauer PJ. Binding of the cGMP-gated channel to the Na/Ca-K exchanger in rod photoreceptors. *J Biol Chem* (2000) 275:13448-13454.
- Scolding NJ, Morgan BP, Campbell AK, Compston DA. The role of calcium in rat oligodendrocyte injury and repair. *Neurosci Lett* (1992) 35:95-98.
- Senatorov VV, Trudeau VL, Hu B. Immunofluorescence in situ hybridization (IFISH) in neurones retrogradely labelled with rhodamine latex microspheres. *Brain Res Protoc* (1997) 1:49-56.
- Senterre-Lesenfants S, Alag AS, Sobel ME. Multiple mRNA species are generated by alternate polyadenylation from the human calmodulin-I gene. *J Cell Biochem* (1995) 58:445-454.
- Seto-Ohshima A, Kitajima S, Sano M, Kato K, Mizutani A. Immunohistochemical appearance of calmodulin in the developing brain: a comparison with neuron specific enolase. *Cell Struct Funct* (1984) 9:337-344.
- Seto-Ohshima A, Kitajima S, Sano M, Kato K, Mizutani A. Immunohistochemical localization of calmodulin in mouse brain. *Histochem* (1983) 79:251-257.
- Seto-Ohshima A, Yamazaki Y, Kawamura N, Sano M, Kitajima S, Mizutani A. The early expression of immunoreactivity for calmodulin in the nervous system of mouse embryos. *Histochem* (1987) 86:337-343.
- Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME. CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Sci* (1991) 252:1427-1430.

- Sherbany AA, Parent AS, Brosius J. Rat calmodulin cDNA. *DNA* (1987) 6:267-272.
- Sola C, Barron S, Tusell JM, Serratos J. The Ca²⁺/calmodulin signaling system in the neural response to excitability. Involvement of neuronal and glial cells. *Prog Neurobiol* (1999) 58:207-232.
- Sola C, Tusell JM, Serratos J. Calmodulin is expressed by reactive microglia in the hippocampus of kainic acid-treated mice. *Neurosci* (1997) 81:699-705.
- Sola C, Tusell JM, Serratos J. Comparative study of the pattern of expression of calmodulin messenger RNAs in the mouse brain. *Neurosci* (1996) 75:245-256.
- Sola C, Tusell JM, Serratos J. Differential response of calmodulin genes in the mouse brain after systemic kainate administration. *Neurosci* (1997) 78:155-164.
- Steward O, Levy WB. Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci* (1982) 2:284-291.
- Steward O, Worley PF. A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) 98:7062-7068.
- Steward O. Targeting of mRNAs to subsynaptic microdomains in dendrites. *Curr Opin Neurobiol* (1995) 5:55-61.
- Swope SL, Moss SI, Raymond LA, Huganir RL. Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. *Adv Sec Mess Phosphopr Res* (1999) 33:49-78.
- Szigeti C, Kovacs B, Kortvely E, Gulya K. Comparison of treatment regimens to sensitize in situ hybridization for low-abundance calmodulin transcripts in the white matter of the rat spinal cord. *Acta Biol Szeged* (2003) 47:1-6.
- Terashima T, Ochiishi T, Yamauchi T. Immunohistochemical localization of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II isoforms in the ganglion cells of the rat retina: immunofluorescence histochemistry combined with a fluorescent retrograde tracer. *Brain Res* (1994) 650:133-139.
- Tian QB, Nakayama K, Okano A, Suzuki T. Identification of mRNAs localizing in the postsynaptic region. *Mol Brain Res* (1999) 72:147-157.
- Tong G, Shepherd D, Jahr CE. Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin. *Science* (1995) 267:1510-1512.
- Toutenhoofd L, Strehler EE. The calmodulin multigene family as a unique case of genetic redundancy: multiple levels of regulation to provide spatial and temporal control of calmodulin pools? *Cell Calcium* (2000) 28:83-96.
- Toutenhoofd SL, Foletti D, Wicki R, Rhyner JA, Garcia F, Tolon R, Strehler EE. Characterization of the human CALM2 calmodulin gene and comparison of the transcriptional activity of CALM1, CALM2 and CALM3. *Cell Calcium* (1998) 23:323-338.
- Toutenhoofd SL, Garcia F, Zacharias DA, Wilson RA, Strehler EE. Minimum CAG repeat in the human calmodulin-1 gene 5' untranslated region is required for full expression. *Biochim Biophys Acta* (1998) 1398:315-320.
- Tsai SC, Haun RS, Tsuchiya M, Moss J, Vaughan M. Isolation and characterization of the human gene for ADP-ribosylation factor 3, a 20-kDa guanine nucleotide-binding protein activator of cholera toxin. *J Biol Chem* (1991) 266:23053-23059.

- Tsui SK, Lee SM, Fung KP, Waye MM, Lee CY. Primary structures and sequence analysis of human ribosomal proteins L39 and S27. *Biochem Mol Biol Int* (1996) 40:611-616.
- Tsumura T, Murata A, Yamaguchi F, Sugimoto K, Hasegawa E, Hatase O, Nairn AC, Tokuda M. The expression of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase I in rat retina is regulated by light stimulation. *Vis Res* (1999) 39:3165-3173.
- Vendrell M, Aligue R, Bachs O, Seratosa J. Presence of calmodulin and calmodulin-binding proteins in the nuclei of brain cells. *J Neurochem* (1991) 57:622-628.
- Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H. Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* (1998) 78:99-141.
- Victor RG, Thomas GD, Marban E, O'Rourke B. Presynaptic modulation of cortical synaptic activity by calcineurin. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92:6269-6273.
- Vizi S, Gulya K. Calculation of maximal hybridization capacity (Hmax) for quantitative in situ hybridization: a case study for multiple calmodulin mRNAs. *J Histochem Cytochem* (2000) 48:893-904.
- Vizi S, Palfi A, Gulya K. Multiple calmodulin genes exhibit systematically differential responses to chronic ethanol treatment and withdrawal in several regions of the rat brain. *Mol Brain Res* (2000) 83:63-71.
- Vizi S, Palfi A, Hatvani L, Gulya K. Methods for quantification of in situ hybridization signals obtained by film autoradiography and phosphorimaging applied for estimation of regional levels of calmodulin mRNA classes in the rat brain. *Brain Res Protoc* (2001) 8:32-44.
- Wakakura M, Yamamoto N. Immunological localization of calmodulin in feline rod outer segments. *Exp Eye Res* (1987) 44:451-458.
- Waldeyer H. Das Gorilla-Rückenmark, Abhandl. d. Kaiserl. Akad. d. Wissensch. zu Berlin, Berlin (1888)
- Wang JH, Stelzer A. Inhibition of phosphatase 2B prevents expression of hippocampal long- term potentiation. *Neuroreport* (1994) 5:2377-2380.
- Wässle H, Grünert U, Rohrenbeck J. Immunocytochemical staining of AII-amacrine cells in the rat retina with antibodies against parvalbumin. *J Comp Neurol* (1993) 332:407-420.
- Watterson DM, Sharief F, Vanaman TC. The complete amino acid sequence of the Ca^{2+} -dependent modulator protein (calmodulin) of bovine brain. *J Biol Chem* (1980) 255:962-975.
- Willardson BM, Wilkins JF, Yoshida T, Bitensky MW. Regulation of phosphodiesterase phosphorylation in retinal rods by Ca^{2+} /calmodulin-dependent adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) 93:1475-1479.
- Yang H, Wanner IB, Roper SD, Chaudhari N. An optimized method for in situ hybridization with signal amplification that allows the detection of rare mRNAs. *J Histochem Cytochem* (1999) 47:431-446.
- Zaidi AU, Enomoto H, Milbrandt J, Roth KA. Dual fluorescent in situ hybridization and immunohistochemical detection with tyramide signal amplification. *J Histochem Cytochem* (2000) 48:1369-1375.
- Zhang, J, Madden TL. PowerBLAST: new network BLAST application for interactive or

automated sequence analysis and annotation. *Genome Res* (1997) 7:649–656.

Zhou LW, Moyer JA, Muth EA, Clark B, Palkovits M, Weiss B. Regional distribution of calmodulin activity in rat brain. *J Neurochem* (1985) 44:1657-1662.

A disszertáció anyagát alkotó saját közlemények

- 1) **Kovacs B**, Gulya K. A color in situ hybridization method with improved sensitivity for the detection of low-abundance mRNAs. *Acta Biol Szeged* (2001) 45:75-77.
- 2) Palfi A, Kortvely E, Fekete E, **Kovacs B**, Varszegi S, Gulya K. Differential calmodulin gene expression in the rodent brain. *Life Sciences* (2002) 70:2829-2855. (Impakt faktor: **1.824**)
- 3) **Kovacs B**, Gulya K. Differential expression of multiple calmodulin genes in cells of the white matter of the rat spinal cord. *Mol Brain Res* (2002) 102:28-34. (Impakt faktor: **2.309**)
- 4) **Kovacs B**, Gulya K. Calmodulin gene expression in the neural retina of the adult rat. *Life Sciences* (2003) 73:3213-3224. (Impakt faktor: **1.824**)
- 5) Szigeti C, **Kovacs B**, Kortvely E, Gulya K. Comparison of treatment regimens to sensitize in situ hybridization for low abundance calmodulin transcripts in the white matter of the rat spinal cord. *Acta Biol Szeged* (2003) 47:1-6.
- 6) **Kovacs B**. Calmodulin gene expression in central nervous system areas of low calmodulin abundance. *Acta Biol Szeged* (2003) 47:(in press)

Kumulatív impakt faktor (a SCI 2002-re kiadott adatai alapján): **5.957**

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm dr. Gulya Károly tanszékvezető egyetemi tanárnak, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi Kar Állattani és Sejtbiológiai Tanszéke vezetőjének, hogy doktori disszertációm elkészítését laboratóriumában lehetővé tette és azt támogatta. Köszönöm dr. Pálfi Árpádnak, a Tanszék volt egyetemi adjunktusának munkám kezdete során nyújtott nélkülözhetetlen szakmai támogatását, kritikai észrevételeit és türelmét, valamint Ambrus Józsefné szaklaboráns önzetlen, mindig rendelkezésre álló, értékes segítségét. Köszönöm dr. Fekete Éva egyetemi docens, Várszegi Szilvia, Körtvély Előd és Szigeti Csaba egyetemi tanársegédek kísérletes munkámhoz nyújtott segítségét. Vizsgálataink anyagi háttérét az OTKA (T034621) és az ETT (57/2000) kutatási pályázatok biztosították.

A disszertáció magyar nyelvű összefoglalója

Összefoglalás

A kalmodulin (CaM) fehérje rendkívül összetett szerepet játszik a sejtek citoplazmikus folyamatainak szabályozásában és – az idegsejtek szignalizációs folyamataiban betöltött fontos szerepe miatt – az idegrendszer egészének működésében. Míg az idegszövetben általában közepes vagy nagy koncentrációban van jelen a CaM fehérje, egyes központi idegrendszeri területek (gerincvelő, retina) az átlagosnál jóval alacsonyabb mennyiségben tartalmazzák, sőt a három CaM gén transzkriptumainak mennyisége is kisebb. A gerincvelő és a retina különböző neuron- és gliasejttypusaiban történő CaM génexpresszió jellemzőiről – a bennük található viszonylag kis mennyiségű CaM mRNS tartalom miatt – kevés információval rendelkezünk. Vizsgálataink első szakaszában ezért egy olyan, enyhén alkalikus pH-t alkalmazó, digoxigenin (DIG)-jelölt riboprobákat felhasználó in situ hibridizációs eljárást fejlesztettünk ki, amelynek alkalmazása lehetővé tette a szövetben alacsony kópiaszámban jelenlévő mRNS tartalom kimutatását. Módszerünket a CaM gének mRNS populációinak detektálásával teszteltük két olyan központi idegrendszeri régióban, amelyekben a CaM mRNS-ek szokatlanul alacsony koncentrációban vannak jelen: a gerincvelőben és a retinában. A CaM mRNS-ek lokalizálását a gerincvelőben alacsony koncentrációjuk mellett a szövet igen magas lipidtartalma is nehezíti; módszerünket itt is sikerrel alkalmaztuk.

Vizsgálataink célja egyrészt az volt, hogy kidolgozzunk egy, az alacsony kópiaszámú CaM mRNS populációk detektálására is alkalmas in situ hibridizációs módszert, másrészt, hogy a központi idegrendszer CaM mRNS-ben szegény régióiban (gerincvelő, retina) nagy térbeli feloldású, színes in situ hibridizációs módszerrel lokalizáljuk ezen gének eltérő mRNS populációit.

Célkitűzéseink az alábbiak voltak:

- 1) A rendelkezésre álló és széleskörűen használt in situ hibridizációs módszereket érzékenységük alapján összehasonlítsuk egy alacsony CaM mRNS tartalmú, de magas lipidtartalmú szövetben;
- 2) Optimalizáljuk az általunk kifejlesztett, enyhén alkalikus pH tartományban (pH 8.0) végzett hibridizációt felhasználó módszerünket az alacsony CaM mRNS tartalom detektálására;

- 3) Ezzel a módszerrel lokalizáljuk és elkülönítjük a három CaM génről átíródott mRNS-ek populációit a felnőtt patkány lumbáris gerincvelő fehérállományban;
- 4) Módszerünkkel demonstráljuk a különböző CaM gének transzkriptumainak jelenlétét a felnőtt patkány retinájában.

Az állatkísérletek mind az Európai Közösség (86/609/EEC), mind a Magyar Köztársaság (XXVIII/1998 és 243/1998) által hozott, a laboratóriumi állatok védelmére és kísérleti felhasználására vonatkozó jogszabályainak megfelelően zajlottak a Szegedi Tudományegyetem állatkísérleteket ellenőrző bizottsága engedélyének birtokában. Kísérleteinkhez felnőtt hím Sprague-Dawley patkányok szemének és lumbáris gerincvelőjének paraffinos és kriosztátos metszeteit használtuk. Az in situ hibridizációt [³⁵S]- vagy digoxigenin (DIG)-jelölt, az egyes CaM génekre specifikus antiszensz ribopróbákkal végeztük el; a nemspecifikus hibridizációt minden esetben szensz cRNS próbákkal mértük.

Az in situ hibridizáció érzékenységeinek fokozására – különös tekintettel a magas lipidtartalmú szövetek alacsony CaM mRNS tartalmának kimutatására – kidolgoztunk egy szenzitív, DIG-jelölt cRNS alapú módszert is, amelyben a hibridizációt enyhén alkalikus pH (pH 8.0) mellett végezzük el (Kovacs, 2003; Kovacs és Gulya, 2001). E munka során elvégeztük a rendelkezésre álló hagyományos in situ hibridizációs technikák összehasonlítását is (Szigeti és mtsai, 2003). Módszerünkkel sikeresen mutattuk ki nemcsak a patkány gerincvelő fehérállománya CaM expresszáló sejtjeit (Kovacs és Gulya, 2002; Palfi és mtsai, 2002), de a felnőtt patkány retinájának különböző CaM mRNS populációkat tartalmazó sejtjeit is (Kovacs és Gulya, 2003). A retina CaM expresszióját számítógépes képanalízis felhasználásával szemikvantitatív módon analizáltuk.

A patkány gerincvelő fehérállományában morfológiájuk alapján két CaM expresszáló sejtípust detektáltunk. A közepes méretű, asztrocita típusú sejtek, amelyek zömmel a gerincvelő dorzális oszlopában helyezkednek el, differenciált CaM génexpressziót mutattak: ezekben a sejtekben a CaM I mRNS tartalom volt a legnagyobb, ezt követte a CaM III, majd a CaM II mRNS populációk mennyisége. Az oligodendrociták CaM génexpressziója – a dorzális és a laterális oszlopokban egyaránt – kevésbé különbözött egymástól, bár a CaM I mRNS tartalom kissé magasabb volt. A kapott eredmények azt mutatják, hogy 1) a CaM génexpresszió a gerincvelőben gazdagabb és sokkal összetettebb, mint azt korábban a hagyományos radioaktív in situ hibridizációs technikákkal sejteni lehetett, 2) érzékeny módszert használva több CaM mRNS-t

tartalmazó sejttípus mutatható ki, így a gliasejtek is, annak ellenére, hogy ezek a sejtek lipidgazdag környezetben helyezkednek el, és e sejtek CaM mRNS tartalma más sejtekénél jóval alacsonyabb.

A neurális retina alacsony lipidtartalmú idegszövet, amelyben a korábbi, viszonylag alacsony szenzitivitású in situ hibridizációs módszerek nem mutattak ki CaM mRNS tartalmú sejteket, annak ellenére, hogy immuncitokémiai módszerekkel e protein jelenlétét bizonyították. Érzékeny in situ hibridizációs módszerünkkel kimutattuk a különböző CaM mRNS populációk jelenlétét a felnőtt patkány retinában, s megállapítottuk, hogy az egyes CaM gének expressziója közel azonos. Ez a megfigyelés azért érdemel figyelmet, mert tudomásunk szerint így a retina az egyetlen olyan központi idegrendszeri terület, amelyben a CaM génexpresszió nem differenciált. Noha az egyes CaM gének rétegspecifikus megoszlása nagyon hasonló, a CaM génexpresszió az egyes rétegek között jelentősen változik. A legerősebb jelölődés a ganglionsejtek rétegében és a belső nukleáris rétegben volt. Közepes erősségű szignál intenzitást találtunk a külső és a belső plexiform rétegben, a külső határoló hártya közelében és a retinális pigment epitéliumban. Nagyon alacsony jel volt a külső nukleáris és a fotoreceptor belső szegmens rétegekben, s nem volt detektálható specifikus jel a fotoreceptor külső szegmensében.

Összefoglalva, szenzitív in situ hibridizációs módszerünk alkalmas volt a központi idegrendszer két területén – a gerincvelő fehérállományában és a retinában, egy magas és egy alacsony lipidtartalmú területen – az alacsony koncentrációban jelen lévő CaM mRNS populációk kimutatására. Eredményeink várhatóan hozzájárulnak a CaM fehérje, illetve a CaM génexpresszió funkcionális jelentőségének megértéséhez ezekben a régiókban.

Vizsgálataink során az alábbi megállapításokat tettük:

- 1) A különböző in situ hibridizációs módszerek egyes paramétereit összehasonlítva (a szövet mikrohullámú roncsolása, zsírtartalmának eltávolítása, a hibridizációs oldat pH-jának változtatása) megállapítottuk, hogy az enyhén alkalikus pH mellett történő hibridizáció (pH 8.0) olyan szövetben is nagy érzékenységgel mutatja ki a CaM mRNS-ek különböző populációit, ahol azok nagyon alacsony koncentrációban vannak jelen, vagy a szövet magas zsírtartalmú (Kovacs, 2003; Szigeti és mtsai, 2003).
- 2) Enyhén alkalikus pH mellett történő színes in situ hibridizációs technikánkat az alacsony CaM transzkriptumok detektálására optimalizáltuk a felnőtt patkány gerincvelő fehérállományában (Kovacs és Gulya, 2001, 2002) és a retinában (Kovacs

és Gulya, 2003).

- 3) Érzékeny, színes in situ hibridizációs módszerünket használva két olyan gliasejtípust (valószínűleg asztrocitákat és oligodendrocitákat) térképeztünk fel, amelyek a patkány lumbáris gerincvelőjének fehérállományában differenciáltan expresszálják a CaM géneket (Kovacs és Gulya, 2001, 2002; Palfi és mtsai, 2002; 2832. oldal, 2. kép). Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy a felnőtt patkány gerincvelő CaM expressziója sokkal gazdagabb és sokrétűbb, mint azt eddig gondoltuk. A fehérállomány CaM pozitív sejtjeinek – az asztrocitáknak és az oligodendrocitáknak – további, elsősorban funkcionális génexpressziós vizsgálatai felderíthetik e fehérjének a glia-neuron interakcióban, a szignalizációban és a mielinizációban betöltött esetleges szerepét is.
- 4) A felnőtt patkány retinájában a CaM gének transzkriptumainak mennyisége alacsony. Érzékeny in situ hibridizációs módszerünk segítségével leírtuk ezen mRNS populációk megoszlását felnőtt állatban élettani körülmények között (Kovacs és Gulya, 2003). A CaM mRNS-ek egymáshoz meglepően hasonló, de jellegzetesen rétegspecifikus megoszlását figyeltük meg. A retina különböző rétegeiben megfigyelt eltérő intenzitású CaM génexpresszió e fehérjének közvetlen szerepét bizonyítja a vizuális szignalizációs folyamatokban. Bár a különböző CaM géneknek a látási folyamatokban betöltött szerepére nagyon kevés közvetlen adat áll rendelkezésre, kísérleteinkben megteremtettük azt az anatómiai alapot, amelyre támaszkodva ezen géneknek expressziós mintázatát és funkcióinak analízisét a neurális retina élettani és kórélettani körülményei mellett vizsgálni lehet.

A disszertáció angol nyelvű összefoglalója

Summary

The calmodulin (CaM) protein plays a complex role in the regulation of the different cytoplasmic processes in general, and also (because of its paramount role in the neuronal signalization processes) in the nervous system as a whole in particular. While this protein is often present in medium-to-high concentrations in the nervous tissue, there are other regions (the spinal cord and the retina) that contain CaM only in minute quantities, and the amounts of the different CaM transcripts in these regions are also low. Our knowledge on the CaM gene expression in the different cell types of the spinal cord and the retina is sparse, mainly in consequence of their low CaM mRNA contents. Thus, during the initial stage of our research, we developed a sensitive color in situ hybridization method, employing a slightly alkaline pH (pH 8.0) in the hybridization mixture, which is sensitive enough to detect low-abundance transcripts in areas of the central nervous system (the white matter areas of the spinal cord and the retina) that may also have high lipid contents (the white matter areas of the spinal cord). The method was then tested for the detection of the different CaM gene transcripts in two central nervous system regions, the spinal cord and the retina, where these mRNAs are present in unusually low concentrations. The detection of CaM mRNAs in the spinal cord was hindered not only by the low abundance of these transcripts, but additionally by the high lipid content; our method was successfully employed here too.

The goals of these studies were to develop a sensitive in situ hybridization method that can be used to detect CaM transcripts with low abundance, and to localize CaM mRNAs with high resolution in CaM mRNA-poor regions of the central nervous system (the white matter of the spinal cord and the retina).

Our specific aims were as follows:

- 1) To compare the sensitivities of the conventionally used in situ hybridization methods in a CaM-poor and lipid-rich region of the central nervous system of the rat,
- 2) To optimize our sensitive color in situ hybridization method, using a slightly alkaline hybridization solution (pH 8.0) for the detection of low-abundance CaM transcripts,
- 3) To localize mRNA populations transcribed from the three different CaM genes in the white matter of the adult rat lumbar spinal cord,

- 4) To demonstrate the presence and localize mRNA populations transcribed from the three different CaM genes in the adult rat neural retina.

The experimental procedures were carried out in strict compliance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC), and followed the Hungarian legislation requirements (XXVIII/1998 and 243/1998) regarding the care and use of laboratory animals, and they complied with the directives of the University of Szeged on this subject. Paraffin-embedded and cryostat sections of lumbar spinal cord and retinal tissues of adult (200-220g) male Sprague-Dawley rats were used in these experiments. In situ hybridization was performed by using ³⁵S- or DIG-labeled antisense cRNA probes specific for each of the CaM genes; sense probes were used to detect nonspecific hybridization.

We developed an in situ hybridization method, using DIG-cRNA and employing a slightly alkaline hybridization solution (pH 8.0) in order to increase the sensitivity, especially in lipid-rich nervous tissue with a low-abundance CaM mRNA content (Kovacs, 2003; Kovacs and Gulya, 2001), and compared its sensitivity with those of the available in situ hybridization techniques (Szigeti et al., 2003). We successfully demonstrated the presence of different CaM-expressing cells in the white matter of the adult rat spinal cord (Kovacs and Gulya, 2002; Palfi et al., 2002), and also CaM mRNA populations in the adult rat neural retina (Kovacs and Gulya 2003). The retinal CaM expression was semiquantitatively analyzed by means of computer-assisted microdensitometry.

On the basis of their morphology, we detected two distinct cell types that express CaM in the white matter area of the rat spinal cord. The medium-sized, astrocyte-like cells residing mainly in the dorsal column of the white matter displayed differential CaM expression: the CaM I mRNA content was most abundant, followed by the CaM III and CaM II mRNA contents in these cells. The CaM gene expression of the oligodendrocytes –in both the dorsal and the lateral columns – was less differentiated, although the CaM I mRNA content was slightly higher than that of the others. Our results indicate that 1) the CaM expression profile of the spinal cord is richer and more complex than previously thought on the basis of conventional radioactive in situ hybridization techniques, and 2) when a method that is sufficiently sensitive was used, more cell types could be demonstrated to express CaM mRNAs; thus, in spite of their lower CaM expression and their lipid-rich environment, glial cells could also be visualized.

The neural retina is a tissue with low lipid content, where the conventional in situ hybridization techniques with relatively low sensitivity did not detect any CaM-expressing

cells, in spite of the fact that the presence of the protein was previously demonstrated by immunohistochemical techniques. Our sensitive in situ hybridization technique revealed the presence of CaM mRNA populations in the adult rat retina, and we concluded that the expression levels of the different CaM genes were almost identical. In fact, the uniquely similar layer-specific retinal distribution pattern of these transcripts is the first such example for the different CaM genes in the central nervous system. Although the layer-specific distributions of these genes are strikingly similar, there are major differences in CaM expression within the different retinal layers. The strongest signals for all CaM mRNAs were demonstrated in the ganglion cell layer and the inner nuclear layer. Similarly intermediate signal intensities for all CaM genes were detected in the inner and outer plexiform layers, within the vicinity of the outer limiting membrane and in the pigment epithelium. Very low specific signals were characteristic in the outer nuclear layer and the photoreceptor inner segment layer, while no specific hybridization signal was observed in the photoreceptor outer segment layer.

In summary, our sensitive in situ hybridization technique was able to demonstrate the presence of low-abundance CaM transcripts in two central nervous system areas: the white matter of the rat spinal cord and the neural retina of the adult rat. Our results contribute to a better understanding of the functional role(s) of the CaM protein and also of the CaM gene expression in these regions.

The main results of our studies were as follows:

- 1) By comparing the parameters of the different in situ hybridization methods (microwave heating and lipid removal of the tissue, and change of the pH of the hybridization solution), we concluded that hybridization at a slightly alkaline pH (pH 8.0) detects CaM mRNA populations with high sensitivity in tissues with high lipid contents or where they exist only in low abundance (Kovacs, 2003; Szigeti et al., 2003).
- 2) We optimized our sensitive in situ hybridization method for the detection of low-abundance CaM transcripts in the white matter of the spinal cord (Kovacs and Gulya, 2001, 2002) and the retina (Kovacs and Gulya, 2003) of the adult rat.
- 3) With the use of our sensitive in situ hybridization method, we successfully detected two glial cell types (astrocytes and oligodendrocytes) in the white matter areas of the rat lumbar spinal cord that differentially express CaM genes (Kovacs and Gulya, 2001, 2002; Palfi et al., 2002; page 2832 and Fig. 2). Our results indicate that the CaM gene expression profile of the spinal cord is richer and more complex than previously

thought. Further, primarily functional gene expression studies on the CaM positive cells in the white matter (the astrocytes and the oligodendrocytes) may shed light on the roles of this protein in glial–neuron interactions, signalization and myelinization processes.

- 4) The amount of CaM transcripts in the adult rat retina is low. With the use of our sensitive in situ hybridization technique, we described the distributions of these mRNA populations in adult rat under physiological conditions (Kovacs and Gulya, 2003). The uniquely similar expression pattern of a layer-specific distribution for all CaM genes was observed. The different intensities of the CaM gene expression in the different retinal layers suggest a direct role for CaM in visual signaling processes. Although the functional significance of the different CaM genes in visual signaling processes remains unclear at present, we have provided an anatomical basis for further analysis of the functions and expression patterns of these genes in the neural retina under normal and pathologic conditions.

A saját közlemények másolatai