

**KALMODULIN GÉNEXPRESSZIÓ A KÖZPONTI IDEGRENSZER  
ALACSONY KÓPIASZÁMÚ KALMODULIN mRNS  
TARTALMÚ TERÜLETEIN**

PH.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

KOVÁCS BEATRIX

TÉMAVEZETŐ: DR. GULYA KÁROLY

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR  
ÁLLATTANI ÉS SEJTBiolÓGIAI TANSZÉK

2003

## 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 gliasejt típusaiban 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 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 sejtípus 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 immunitokémiai 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 tudásunk szerint így a retina az egyetlen olyan központi idegrendszeri terület, amelyben a CaM génextpresszió nem differenciált. Noha az egyes CaM gének rétegspecifikus megoszlása nagyon hasonló, a CaM génextpresszió 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 génextpresszió funkcionális jelentőségének megértéséhez ezekben a régiókban.

## **Bevezetés, irodalmi előzmények**

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 dezoxiriboprobáknak a szöveti (vagy szövetből kivont) nukleinsav-tartalommal történő hibridizációja a sejt saját vagy exogén eredetű nukleinsav-populációit detektálja nagy érzékenységgel és sejtszintű vagy szubcelluláris lokalizációval. A riboprobák nagyfokú specificitásuk, a célszekvenciák széles koncentrációtartományában való felhasználhatóságuk és könnyű kvantitálhatóságuk miatt az utóbbi években szinte teljesen kiszorították a gyakorlatból az oligoprobákat.

A szöveti mRNS tartalom riboprobákkal történő lokalizációját számos tényező befolyásolhatja. A szövet magas lipidtartalma és/vagy a nagy mennyiségben jelen lévő 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 vagy a szövetben alacsony koncentrációban jelen lévő mRNS tartalom detektálására kidolgozott módszerek (lipidtartalom csökkentése, a szövet részleges enzimatisz emésztése vagy hőkezelése, tiramid szignál amplifikáció, alkalikus pH tartományban végzett fixálás) általánosan elterjedtek, nem minden szövetben vagy protokoll esetében használhatók. Munkánk során egy 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 fehérje egy sokfunkciós intracelluláris kalcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-receptor protein, amely minden eukarióta sejtben megtalálható, és részt vesz számos, a sejt életében alapvető folyamat szabályozásában. Két doménje mindegyikén 2-2  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhely található. A  $\text{Ca}^{2+}$  megkötése okozza azt a konformációváltozást, amely a különböző célmolekulákkal történő interakciókhoz szükséges. Nagy mennyiségben van jelen az idegszövetben, ahol főként a neuronok perikarionjában, sejtmagjában és dendritjeiben fordul elő, utóbbiakban gyakran jellegzetes granuláris eloszlásban. Bár a CaM egyik legfontosabb, többnyire célfehérjéin át érvényre juttatott szerepe a neurotranszmitterek szintézisében és felszabadításában van, 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. Szerepe alapvető a sejt  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisának fenntartásában és a különböző  $\text{Ca}^{2+}$ -áramok kialakításában. A CaM többféle CaM kinázon keresztül a sejtmagban zajló folyamatokat is befolyásolja: transzkripció faktorok és különböző RNS-kötő fehérjék közvetítésével fontos szerepet játszik a sejtciklus, a sejtosztódás és a génexpresszió szabályozásában. A  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM komplex enzimaktivitással nem rendelkezik, ismert viszont több mint húsz olyan enzim, amely általa aktiválódik. Ilyenek például a ciklikus (3',5')-nukleotid foszfodiészterázok, az

adenilil-ciklázok, a nitrit oxid szintáz és a protein kinázok. A  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM talán legfontosabb célelzime a CaM kináz II és a kalcineurin.

Patkányban 3 működő és 4 nem működő, úgynevezett pszeudogén ismert. A három különböző CaM gén (CaM I, II, III) alternatív poliadenilációval legalább hét különböző mRNS-t kódol. 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. Az 5'- és 3'-nemtranszlálódó régiók szekvenciái között jelentős különbségek vannak, ahol számos szabályozó elem is ismert, amelyek különböző kombinációkban és különböző számban található meg az egyes transzkriptumokban. 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 szubcelluláris kompartmentekben is.

A fejlődő és felnőtt patkány központi idegrendszerében a CaM széleskörű expressziója figyelhető meg. Laboratóriumunk korábbi vizsgálatai feltárták a felnőtt patkány agyára jellemző CaM génexpresszió részleteit. Jelentős CaM expresszió van a kérgi és hippocampális piramis sejtekben, a hipotalamusz magnocelluláris neuroszekréciós sejtjeiben, a Purkinje sejtekben, a kisagyi mélymagvakban, a gerincvelő mellső szarvának motoneuronjaiban, a szaglógumó mitrális sejtjeiben, valamint összességében a kéreg, a középgagy, a bazális magvak és a gerincvelő minden nagyobb neuronjában. Az expresszió alacsony az interneuronokban és gyakran kimutathatatlan a legtöbb gliasejtben. A különböző CaM génekről átíródó mRNS-ek mennyisége jóval kisebb azokon a területeken, ahol kevés az idegsejttest – pl. a hippocampus, a nagyagy- és kisagykéreg molekuláris rétegei –, és egészen minimális például a corpus callosum területén. Alacsony CaM mRNS koncentráció van a gerincvelő fehérállományában és a retinában is: itt a CaM mRNS tartalom hagyományos 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 feltárták a CaM

génexpresszió jellegzetességeit bizonyos kísérleti körülmények között, az ontogenetikus fejlődés során, illetve in vitro rendszerekben, és újabb adatokat szolgáltatott arra vonatkozóan is, hogy az idegsejtek különböző intracelluláris kompartmentjeibe eltérő mennyiségű CaM mRNS szállítódik.

Mivel a központi idegrendszerben a kalmodulint expresszáló sejtek zöme idegsejt, e fehérjét a gliális funkciókkal kapcsolatban ezidáig csak ritkán említették. A CaM jelenléte a gliasejtekben érthető, hiszen számos, a gliasejtekre is jellemző, CaM által szabályozott sejtfunkció létezik, és ismertek bizonyos patofiziológiás, illetve kísérleti körülmények is, amelyekben e protein mennyisége megnövekszik. Az a megfigyelés, hogy ezekben a sejtekben a CaM mRNS élettani körülmények között is valóban jelen van, 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 (így a gerincvelő fehérállományában), vagy esetleg más, a próba penetrációját nehezítő faktor (pl. jelentős mennyiségű kötőszövet) van jelen.

A CaM fehérje jelenlétét a gerinces retinában korábban bizonyították, ahol az egyes rétegekben nagyon eltérő mennyiségben van jelen. Változó erősségű CaM immunoreaktivitás figyelhető meg a felnőtt patkány retinájának ganglion, amakrin, horizontális és bipoláris sejteiben, valamint a ganglion és amakrin sejtekből eredő rostokban a belső plexiform rétegben. Fajonként eltérő, de többnyire alacsony CaM tartalom van a fotoreceptor sejtekben. Különös, hogy nincs olyan in situ hibridizációs vizsgálat, amely a CaM mRNS populációk megoszlására vagy e gének szabályozására utalna. Mivel a CaM számos, a szignalizációs folyamatokban résztvevő célfehérjét szabályoz, meglepő, hogy szerepe nem világos a vizuális szignalizációs folyamatokban, különösen annak fényében, hogy milyen sok adat áll rendelkezésre a többi  $Ca^{2+}$ -kötő fehérjére, vagy számos CaM-függő proteinre vonatkozóan, így például  $Ca^{2+}$ /CaM függő adenilil-cikláz, cGMP-kapuzott kationcsatorna, a különböző  $Ca^{2+}$ /CaM függő protein kinázok vagy a G-protein kapcsolt receptor kinázok 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 viszonylag alacsony érzékenységére 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 alkalikus 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 összehasonlítjuk 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 kópiaszám 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**

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 [<sup>35</sup>S]- vagy digoxigenin (DIG)-jelölt, az egyes CaM génekre specifikus antiszensz ribopróbákkal végeztük el; a nonspecifikus hibridizációt minden esetben szensz cRNS próbákkal mértük.

Az in situ hibridizáció érzékenységének 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.

## **Eredmények**

Az in situ hibridizáció érzékenyebbé tétele érdekében elvégzett kísérleteinkben a CaM I gén transzkriptumaira specifikus DIG-jelölt ribopróbákat használtunk. A mikrohullámú melegítéssel kapcsolt tritonos kezelések közül a kisebb triton X-100 koncentrációt (0.1%) és a kloroformot alkalmazó protokoll bizonyult hatásosabbnak, és a detektálható háttér is jóval alacsonyabb volt, mint az 1.0% triton tartalmú oldat esetében. Bár mindkét alkalmazott tritonkoncentráció alkalmas volt a gerincvelő mellső szarvában elhelyezkedő motoneuronok CaM expressziójának kimutatására, a jelölt interneuronok száma a kisebb tritonkoncentrációnál volt magasabb. A tritonos kezelés és a mikrohullámú melegítés általunk vizsgált kombinációi a gerincvelő fehérállományában nem mutattak ki jelölt sejteteket. Az enyhén alkalikus pH mellett elvégzett in situ hibridizáció (pH 8.0) eredményezte a legalacsonyabb háttér mellett a legtöbb sejt jelölődését: nemcsak a gerincvelő szürkeállományában láthatók a CaM mRNS-t tartalmazó sejtet, de a fehérállományban is nagyszámú jelölt sejt figyelhető meg. 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.

A hagyományos, neutrális pH-t alkalmazó fénymikroszkópos in situ hibridizációs technika során egyetlen olyan sejtet sem detektált a lumbáris gerincvelő fehérállományában, amely CaM II mRNS-t expresszált volna. Csak a szürkeállományban figyelhető meg erős jelölődés: a motoneuronok a ventrális szarvban, illetve az interneuronok a dorzális szarvban tartalmaznak számottevő mennyiségű CaM II-specifikus mRNS-t. 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 lumbáris gerincvelő egész fehérállományában láthatóvá váltak. A neutrális pH alkalmazásakor a szürkeállomány sejtjeiben jól láthatók a CaM II mRNS-t expresszáló moto- és interneuronok, de a fehérállományban CaM II pozitív sejtek nem figyelhetőek meg. Enyhén alkalikus pH mellett mind a szürkeállományban, mind a fehérállományban jól láthatók a CaM II expressziót mutató sejtek. 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 differenciált CaM génextpressziót mutatott. Itt közepes méretű, szómaméretükben és nyúlványaik morfológiájában az asztrocitához hasonló sejtek szómái jelölődtek erősen; itt a neuropil jelölődése is figyelemre méltó volt. A dorzális oszlopban a CaM I mRNS tartalom volt a legnagyobb, ezt követte a CaM III, majd a CaM II mRNS tartalom mennyisége. Míg a CaM I és CaM III mRNS tartalom élesen kijelölte a sejteket, néha fő nyúlványaikkal együtt, a CaM II mRNS csak a sejttestekben volt jelen.

Kisebb, kerekded sejtek, valószínűleg oligodendrociták, a fehérállomány egész területén láthatók, ezek alkotják a sejtek másik típusát: esetenként 10-20  $\mu$ m hosszú, radiálisan futó nyúlványaik is előtűntek. Ez a sejtípus szintén expresszál CaM mRNS-t: a CaM II és CaM III géneknek kissé alacsonyabb a kifejeződése, mint a CaM I génnek. A CaM I és CaM III génspecifikus próbákkal jól láthatóan jelölődött a motoneuronok axonjai körül az oligodendrociták nyúlványai által képzett mielinhüvely is. A DIG-jelölt szensz ribopróbák jelölődése a háttérjellel volt összevethető.

Neutrális pH-n történő hibridizációval a retinában specifikusan jelölt CaM mRNS tartalmú sejtes elem nem volt detektálható. Ha a hibridizációs oldat pH-ját enyhén lúgossá (pH 8.0) tettük, a retina bizonyos rétegeiben CaM jelölődés volt megfigyelhető. A központi idegrendszerrel eltérően a retinában mindhárom CaM gén egyformán alacsony szinten expresszáldott és azonos rétegbeli eloszlást mutatott.

A ganglionsejt réteg mindegyik CaM gén esetében nagy mennyiségben tartalmazott mRNS-eket. A jel zöme a ganglionsejtek perinukleáris régiójában volt megfigyelhető. Nagy mennyiségű CaM mRNS volt jelen a belső nukleáris rétegben is, ahol a horizontális, bipoláris, amakrin és Müller sejtek helyezkednek el. A belső nukleáris rétegen belül annak belső szublamínájában volt a legerősebb a jelölődés, ahova többnyire az amakrin sejtek szómái lokalizálhatók. A felnőtt patkány retinában mind a három CaM génre nézve ez a szublamina tartalmazza a CaM mRNS-ek legnagyobb mennyiségeit. A jelölődés itt is főként a perikarionokra volt jellemző, míg a belső nukleáris réteg többi részén a jel diffúz volt, sejtestek csak ritkán voltak detektálhatók. Közepes erősségű, homogén eloszlású szignál volt a külső és a belső plexiform rétegekben, illetve a retina pigment epitéliumában és a külső határolómembrán környékén is. Mindhárom CaM gén esetében jellemzően nagyon gyenge jelölődést mutatott a csapok és pálcikák sejtmagjait tartalmazó külső nukleáris réteg. Érdekes, hogy a fotoreceptorok belső szegmensének rétege hasonló módon rendkívül gyenge jelet adott, a külső szegmensék rétegében pedig specifikus jel egyáltalán nem volt detektálható. Szensz próbával csak egy rendkívül halvány, nonspecifikus mintázat rajzolódott ki a metszeteken, amely semmiféle felismerhető sejtes szerkezethez nem volt kapcsolható. Összefoglalva tehát a felnőtt patkány retinában mindhárom CaM génre egymáshoz rendkívül hasonló, differenciált, rétegspecifikus mRNS eloszlási mintázat volt jellemző.

## **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 gerincevelő 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 lumbális gerincevelőjének 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 gerincevelő 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 analizését a neurális retina élettani és kóreltani körülményei mellett vizsgálni lehet.

## 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. (IF: 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. (IF: 2.309)
- 4) **Kovacs B**, Gulya K. Calmodulin gene expression in the neural retina of the adult rat. *Life Sciences* 73 (2003) 3213-3224. (IF: 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* 47 (2003) 1-6.
- 6) **Kovacs B**. Calmodulin gene expression in central nervous system areas of low calmodulin abundance. *Acta Biol Szeged* 47 (2003) (in press)

## Társszerzői lemondó nyilatkozat

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

A Jelölt mint társszerző az alább felsorolt közlemények elkészítéséhez meghatározó mértékben járult hozzá: *Acta Biol Szeged* (2001) 45:75-77; *Mol Brain Res* (2002) 102:28-34; *Life Sciences* 73 (2003) 3213-3224.

Szeged, 2003. október 9.

Dr. Gulya Károly

.....