

PHD ÉRTEKEZÉS

A KALMODULIN GÉNEK KIFEJEZŐDÉSÉNEK *IN SILICO*,
IN VIVO ÉS *IN VITRO* VIZSGÁLATA A PATKÁNY
KÖZPONTI IDEGRENDSZERÉBEN

KÖRTVÉLY ELŐD

TÉMAVEZETŐ: DR. GULYA KÁROLY
TANSZÉKVEZETŐ EGYETEMI TANÁR

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATTANI ÉS SEJTBiolÓgiai TANSZÉK

SZEGED
2004

Szüleimnek és Attila emlékének...

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK	5
BEVEZETÉS	8
<i>A kalciumionok közreműködésével megvalósuló jelátvitel általános jellemzése.....</i>	8
<i>Kalciumkötő fehérjék.....</i>	10
<i>A kalmodulin és célfehérjéi</i>	10
<i>A CaM gének szerkezete</i>	13
<i>A CaM aktivitásának szabályozása, a szabályozás szintjei.....</i>	15
<i>A CaM gének expressziós mintázatának vizsgálata élettani, kórélettani és kísérletes körülmények között</i>	20
CÉLKITŰZÉSEK	22
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	23
<i>Kísérleti állatok és szövetpreparálás.....</i>	23
<i>A 4,2 kilobázisos CaM I mRNS-hez tartozó, teljes hosszúságú cDNS nukleinsav-sorrendjének meghatározása.....</i>	23
<i>Számítógépes nukleinsav-sorrend elemzés</i>	24
<i>Primer sejt kultúra.....</i>	25
<i>In situ hibridizáció.....</i>	25
<i>Autoradiográfia, mikroszkópia és képanalízis.....</i>	27
<i>Statisztikai módszerek.....</i>	28
EREDMÉNYEK	29
<i>A CaM mRNS-ek szintézisét és a citoplazmán belüli sorsát befolyásoló, cisz-ható elemek számítógépes vizsgálata.....</i>	29
<i>A CaM gének kifejeződése a fejlődő patkány agyban</i>	31
<i>A CaM gének kifejeződése primer hippocampalis sejt kultúrában</i>	40
MEGBESZÉLÉS.....	42
<i>A CaM gének és cDNS-ek számítógépes nukleinsavsorrend-vizsgálata.....</i>	42
<i>A CaM gének kifejeződése a fejlődő patkány agyban</i>	44
<i>A CaM gének kifejeződése primer hippocampalis sejt kultúrában</i>	47
FELHASZNÁLT IRODALOM	49
A PhD ÉRTEKEZÉS ÖSSZEFOGLALÁSA	56
SUMMARY.....	61
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	66

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	67
AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM HASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	68

RÖVIDÍTÉSEK

[³⁵ S]UTPαS	az α-helyzetű foszforatomon 35-ös tömegszámú kénnel szubsztituált uridin 5'-trifoszfát
3'-RACE	a cDNS 3'-végének gyors felsokszorozása (rapid amplification of cDNA ends)
ARE	adeninben és uridinben gazdag elem (adenine- and uridine rich element)
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
AUF1	ARE-kötő fehérje, amely a mRNS-ek célzott lebontásában vesz részt (A+U-rich element binding factor 1)
bp	bázispár
Ca ²⁺	kalciumion
CaBPs	kalciumkötő fehérjék (calcium-binding proteins)
CaM	kalmodulin
cAMP	ciklikus adenzin-3',5'-difoszfát
CO ₂	szén-dioxid
CPE	citoplazmatikus poliadenilációs elem
DICE	differentiálódást szabályozó elem (differentiation control element)
DNS	dezoxiribonukleinsav
E19	19. embrionális életnap
ELAV/Hu	az ecetmuslica ELAV (embryonic lethal abnormal vision) fehérje humán homológjai, amelyek a mRNS-ek célzott lebontásában vesznek részt
ER	endoplazmatikus retikulum
FMRP	törékeny X mentális retardáció fehérje (Fragile X Mental Retardation Protein)
IRES	belső riboszóma-belépési hely (internal ribosome entry site)
K ⁺	káliumion
LTP	hosszútávú potencírozódás (long term potentiation)
mRNS	hírvivő ribonukleinsav
mtsai.	munkatársai
Na ⁺	nátriumion
Na ₂ HPO ₄	dinátrium-hidrogén-foszfát

NaCl	nátrium-klorid
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PDx	x. posztembrionális életnap (munkánkban x: 1, 5, 10, 15 vagy 20)

A szövettani metszetek ábráin használt rövidítések:

cb	cerebellaris neuroepithelium
CPu	nucleus caudatus-putamen (striatum)
ctx	cerebralis cortex
CxP	corticalis lemez
CxS	corticalis allemez
Grcb	a cerebellum granularis sejtrétege
HC	hippocampus
Hth	hypothalamus
Mcb	a cerebellum molekuláris rétege
ne	neuroepithelium
Pir	piriform cortex
S	septum
Th	thalamus

BEVEZETÉS

A kalciumionok közreműködésével megvalósuló jelátvitel általános jellemzése

A kalcium (Ca^{2+} formájában) számos alapvető biológiai folyamat résztvevője, mint például az izomösszehúzódás, a megtermékenyülés, a sejtosztódás, a biológiai membránok fúziója vagy az apoptózis (Putney, 1999). Sok élőlényben foszfátokkal képez komplexeket, ami aztán az állat külső vagy belső vázaként is szolgál. A merevítő funkció mellett ez a váz az extracelluláris folyadék Ca^{2+} -szintjének is meghatározója, mivel reverzibilis módon képes onnan a Ca^{2+} -t elvonni. A hormonrendszer által szabályozott módon így mintegy 10^{-3} M-os Ca^{2+} koncentráció mérhető a sejtek közötti térben. Ehhez képest a citoszol szabad Ca^{2+} -koncentrációja rendkívül alacsony ($<10^{-7}$ M; Chin és Means, 2000). Ennek a megoszlásnak két nyilvánvaló következménye van. Egyfelől, energetikailag kedvezményezett a Ca^{2+} bejutása a citoszolba, mind az extracelluláris térből, mind az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak (ld. alább) irányából. Másfelől, viszonylag kevés beáramló Ca^{2+} igen jelentős mértékű koncentrációnövekedést eredményezhet, míg más esetében (pl. Na^+ , K^+ , Cl^-) az eredendően magasabb intracelluláris koncentrációk miatt ugyanannyi ion belépése alig változtatná meg a kiindulási állapotot. A fentiek teszik alkalmassá a Ca^{2+} -t arra, hogy központi szerepet játszasson a sejten belüli jelátviteli folyamatokban (Nowycky és Thomas, 2002).

A citoszol nyugalmi állapotára jellemző alacsony Ca^{2+} -szint fenntartásáról számos mechanizmus gondoskodik. Alapvető jelentőségű a Ca^{2+} -ATPáz működése, ami az ATP hidrolíziséből nyert energiát fordítja a Ca^{2+} -ionok kipumpálására, illetve a fő intracelluláris Ca^{2+} raktárba, az ER-ba juttatására. Azok a sejtek, amelyek különösen intenzív Ca^{2+} -szignalizációt valósítanak meg (idegsejtek, izomsejtek), emellett még a Na^+ -ionok citoszolba lépésekor felszabaduló energiát is képesek Ca^{2+} -ionok koncentrációgradienssel szembeni mozgására használni. A 10^{-5} M-os citoszolikus koncentrációt meghaladó Ca^{2+} -szint közvetlen veszélyt jelent a sejtre. Ennek elhárítására szolgálnak többek között a mitokondriumok Ca^{2+} -pumpái, amelyek elsődlegesen ebben a helyzetben töltik be élettani szerepüket, kivonva a citoplazmából a feleslegben jelenlévő ionokat. Mindezek mellett magában a citoszolban is többféle olyan Ca^{2+} -puffer fehérje van, amelyeknek minden

valószínűség szerint egyedüli feladata a feleslegben lévő Ca^{2+} lekötése.

A Ca^{2+} citoszolikus koncentrációja – fizioiógias körülmények között – alapvetően két módon emelkedhet meg (Chin és Means, 2000). Az elektromosan ingerelhető sejtekben a plazmamembrán depolarizációja nyitja meg azokat az ioncsatornákat, amelyeken keresztül Ca^{2+} áramolhat a sejtbe. A másik mechanizmus univerzális, valamennyi eukarióta sejtípus él vele, ekkor a sejt felszín receptorainak aktiválódása indít el egy szignalizációs folyamatot, amely inozitol-foszfolipidek közbeiktatásával előidézi az ER-ban raktározott Ca^{2+} felszabadulását.

Hírvivő szerepét azonban csak rövid ideig töltheti be a Ca^{2+} , mivel a sejt nagyon hatékony módszerekkel rendelkezik a nyugalmi állapotra jellemző viszonyok visszaállításához. A citoplazma Ca^{2+} -puffer fehérjei megakadályozzák a Ca^{2+} szabad diffúzióját, így hatása csak a belépés környezetére fókuszálódik. A felsorolt folyamatok együttesen rendkívül gyorsan változó koncentrációviszonyokat hozhatnak létre egyetlen sejtben belül, amelyek gyakran Ca^{2+} -csúcsok formájában mérhetők a sejt különböző pontjain. Kiemelendő, hogy eltérő információt hordozhatnak a különböző frekvenciával és/vagy amplitúdóval megjelenő Ca^{2+} -csúcsok (Dolmetsch és mtsai., 1998). Gének egyik csoportja átírásának kiváltásához például egy adott Ca^{2+} -csúcs frekvencia optimális, míg egy másik csoport expressziója másféle optimummal rendelkezik (Gallin és Greenberg, 1995; Bito és mtsai., 1997; West és mtsai., 2001).

Az idegsejtekben különösen sok élettani folyamatot szabályoz a citoszol Ca^{2+} koncentrációjának megváltozása (Augustine és mtsai., 2003). Itt lelhetők fel a legváltozatosabb egyedi Ca^{2+} -szignálok, amelyek alapvetően különbözhetnek egymástól térbeli és időbeli megjelenésük alapján (Ghosh és Greenberg, 1995; Thomas és mtsai., 1996). A neurotranszmitterek kiürülése a preszinaptikus idegvégződésből például egy mindössze néhány mikroszekundumos Ca^{2+} koncentrációnövekedés következménye, ami ráadásul csak az ionok bejutását lehetővé tévő Ca^{2+} -csatorna néhány nanométeres környezetében jön létre. Egy egész dendritfát érintő, több hullámban visszatérő Ca^{2+} -áram által előidézett génextpressziós változás napokra, hetekre elnyúló következménye jelentheti a másik végletet.

Kalciumkötő fehérjék

Bár néhány enzim közvetlenül függ a Ca^{2+} -tól (ez jellemző például a protein kináz C-re), a sokféle Ca^{2+} -szignál értelmezésében, sejtaktivitásra váltásában alapvető jelentősége van a Ca^{2+} -kötő receptorfehérjéknek. Utóbbiak beékelődnek a szignalizációs útba a Ca^{2+} és a végrehajtók közé. Ide tartoznak az ún. EF-hand fehérjék is, amelyek szerkezetére egy N-terminális hélix (E-hand), Ca^{2+} -kötő hurok vagy hurkok, végül egy C-terminális hélix (F-hand) egymásutánja jellemző. Egyetlen fehérjén belül 2-8 EF-hand is előfordulhat. Az ilyen domainnel rendelkező fehérjék között legkevesebb 45 önálló alcsaládot lehet elkülöníteni (Kawasaki és mtsai., 1998). Molekuláris evolúciós szempontból is különlegességnek számítanak, amennyiben esetükben nem érvényesül az egy exon egy domain elv (Gilbert, 1987; Kretsinger és Nakayama, 1993; Kawasaki és mtsai., 1998). Alcsaládtól függően, alapvetően két különböző mód egyikével reagálhatnak a Ca^{2+} megkötésére (Nelson és Chazin, 1998). Az egyik csoport tagjai (ismertebb képviselője a parvalbumin és a calbindin) nem szenvednek konformációváltozást a kötés következtében, Ca^{2+} -puffer, illetve -szállító fehérjeként működnek. A másik csoport tagjai Ca^{2+} -szenzorok, a kalmodulin (CaM) fehérjék szupercsaládjába tartoznak. Esetükben az ion(ok) megkötése jelentős konformációváltozást idéz elő. Legrégebben ismert képviselőjük a harántcsíkolt izom összehúzódását szabályozó troponin C. Emellett ide tartoznak az S100 fehérjecsalád tagjai, a Ca^{2+} -kötő fehérjék (calcium-binding proteins, CaBPs) és a névadó CaM is. Utóbbi esetében rendelkezünk a legtöbb ismerettel arról, hogyan alakul sejtválasszá a Ca^{2+} koncentráció(k) formájában érkező szignál (Chin és Means, 2000). Mivel a jelen értekezés tárgya a kalmodulin gének kifejeződésének vizsgálata, az alábbiakban kiemelten esik szó e gének által kódolt fehérjéről.

A kalmodulin és célfehérjei

Bár eltérő mennyiségben, a CaM fehérje valamennyi eukarióta sejtben megtalálható, egymagában kiteheti a sejt összfehérje-tömegének több mint 1%-át (Chin és Means, 2000). Annak ellenére, hogy saját enzimaktivitással nem rendelkezik, gyakorlatilag nincs olyan sejtműködés, amire ne lenne hatással. Kihat a sejtosztódásra, a sejtek mozgására, differenciálódására, ioncsatornák működésére, de a nukleáris CaM a génexpressziós

mintázatot is befolyásolja (Means és mtsai., 1991; Sweitzer és Hanover, 1996; Luk és mtsai., 1999). Mindezeket a folyamatokat a vele kölcsönhatásba lépő, változatos funkcióval és szerkezettel rendelkező fehérjéken keresztül modulálja (Kennedy, 1989). Noha a CaM fehérje igen magas koncentrációban van jelen a sejtben, nagyszámú célfehérjéje között állandó versengés folyik érte, olyannyira, hogy az elérhető szabad CaM mennyisége számos sejtműködés valós korlátját jelenti (Tran és mtsai., 2003).

A gerinces CaM fehérje 148 aminosavból áll, két N-, ill. két C-terminális, tehát összesen négy EF-hand domainnel rendelkezik. A Ca^{2+} -ot nem kötő (apo-CaM) és a Ca^{2+} -ot kötő (holo-CaM) forma közötti konformációbeli különbségek jól ismertek (Moorthy és Murthy, 2001). A Ca^{2+} kötésére létrejövő szerkezetváltozást gyakran követi a fehérje intracelluláris eloszlásának megváltozása, ezek között a legszembetűnőbb a sejtmagi megjelenése (Agell és mtsai., 1998).

A magasabbrendű eukarióta szervezeten belül a központi idegrendszerben mutatható ki a legnagyobb CaM koncentráció. Noha egyes gliasejtek is tartalmazhatnak számottevő mennyiségű CaM fehérjét (Sola és mtsai., 1997; 1999), általánosan elfogadott, hogy a legnagyobb mennyiségben a neuronok tartalmazzák (Zhou és mtsai., 1985), ami összhangban áll az idegsejtekre jellemző, intenzív Ca^{2+} -szignalizációval. Ezekben a sejtekben a CaM fehérje egyaránt jelen van a sejtmagban, a perikarionban, a dendritekben és az axonokban is (Caceres és mtsai., 1983; Seto-Ohshima és mtsai., 1983; Bachs és mtsai., 1994). Szabályozza a neurotranszmitterek szintézisét és felszabadulását (DeLorenzo, 1980), az axonális transzportfolyamatokat (Kennedy, 1989), az LTP-t (Malenka és mtsai., 1989), és az axon kinövését (Polak és mtsai., 1991).

A legjobban jellemzett, CaM által szabályozott fehérjék valamennyien enzimek, amelyek közvetve vagy közvetlenül érintettek a fehérjefoszforilációban (CaM-függő adenilil-cikláz, foszfodiészteráz, protein kinázok, calcineurin). Láthatóan ezek az enzimek gyakran éppen ellentétes irányú biokémiai folyamatokat katalizálnak, ami szükségessé teszi a CaM rendkívül precíz citoplazmatikus kontrollját. Ezek mellett – a teljesség igénye nélkül – a CaM a plazmamembrán Ca^{2+} -pumpájára, ioncsatornákra, a nitrogén-monoxid szintázokra és a rianodin receptor működésére is hat. A lehetséges kölcsönható partnerek nagy számából adódóan nem elégséges a sejtben belüli mindenkori CaM szint globális szabályozása; az

A

CaM I	C	T	A	C	G	G	C	A	G	T	G	G	T	G	C	T	G	G	A	G	T	C	T	C	G	T	G	T	C	C	G	T	G	G	T	G	C	C	G	40
CaM II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
CaM III	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	
Konsz.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40		

CaM I	T	T	A	C	T	C	G	C	A	G	T	C	G	G	C	G	G	C	G	G	C	T	G	A	G	G	C	T	C	A	G	C	G	C	A	C	C	A	A	C	80	
CaM II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	A	G	T	5
CaM III	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	A	A	4
Konsz.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	A	A	-	80		

CaM I	G	C	A	G	G	T	A	G	C	G	C	G	T	T	A	G	C	A	G	C	A	G	C	A	G	C	G	A	G	G	C	A	T	C	T	C	G	G	C	G	120
CaM II	C	C	G	A	G	T	G	T	G	A	G	C	G	A	G	C	G	A	G	T	C	G	A	G	T	G	T	T	G	T	C	T	G	T	T	C	T	G	G	T	45
CaM III	G	A	G	T	G	T	G	G	A	G	C	C	G	A	C	G	C	G	C	G	C	A	G	A	G	C	T	C	G	A	G	C	T	G	C	T	G	C	44		
Konsz.	G	C	G	-	G	T	G	G	A	G	C	G	-	G	A	G	-	-	G	C	G	G	C	A	G	-	G	-	G	-	C	A	G	C	T	C	-	G	G	-	120

CaM I	G	T	C	A	C	A	G	C	C	C	T	G	C	G	C	T	G	T	G	C	A	G	C	C	A	C	C	C	T	C	G	C	C	T	G	C	T	C	160	
CaM II	C	T	C	G	G	A	A	A	C	C	G	T	A	G	C	C	C	T	T	G	C	A	G	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	73		
CaM III	A	G	C	T	G	C	T	G	C	C	G	C	C	G	C	C	A	G	A	G	T	A	A	C	C	T	C	G	A	T	C	C	C	G	A	G	C	T	C	84
Konsz.	-	T	C	-	G	A	-	-	C	C	G	-	-	G	C	-	G	-	T	G	C	A	G	C	-	-	G	-	-	-	C	-	C	-	-	G	C	T	C	160

CaM I	C	G	C	T	C	T	T	C	C	T	T	C	C	T	T	C	G	C	T	C	G	C	A	C	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	188	
CaM II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	73
CaM III	C	G	G	A	T	A	C	C	G	G	T	G	C	C	T	C	G	C	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	106	
Konsz.	C	G	-	-	-	-	C	-	-	T	-	C	-	T	C	G	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	188	

B

egér	T	T	A	G	T	C	C	G	A	G	T	G	G	A	G	C	G	A	G	C	G	A	G	T	C	G	A	G	C	G	G	T	T	G	T	C	T	G	G	T	40	
patkány	T	T	A	G	T	C	C	G	A	G	T	G	G	A	G	C	G	A	G	C	G	A	G	T	C	G	A	G	T	G	G	T	T	G	T	C	T	G	T	T	40	
kutya	T	T	A	G	T	C	C	G	A	G	C	G	G	G	G	C	G	A	G	C	G	A	G	C	T	G	A	C	T	G	G	T	T	G	T	G	T	G	T	G	C	40
ember	T	T	A	G	T	C	C	G	A	G	T	G	G	A	G	A	G	A	G	C	G	A	G	C	T	G	A	G	T	G	G	T	T	G	T	G	T	G	T	G	T	40
Konsz.	T	T	A	G	T	C	C	G	A	G	T	G	G	A	G	C	G	A	G	C	G	A	G	-	-	G	A	G	T	G	G	T	T	G	T	-	T	G	G	T	40	

egér	C	G	C	G	T	C	T	C	G	G	A	A	A	C	C	C	G	T	A	G	C	C	C	T	T	G	C	A	G	C	A	T	G	.	.	.	.	.	73
patkány	C	T	G	T	C	T	C	G	G	A	A	A	C	C	G	G	T	A	G	C	C	C	T	T	G	C	A	G	C	A	T	G	.	.	.	.	.	73	
kutya	C	G	C	T	T	C	T	C	G	G	A	G	A	C	C	G	G	T	A	G	C	G	C	T	T	G	C	A	G	C	A	T	G	.	.	.	.	.	73
ember	C	G	C	G	T	C	T	C	G	G	A	A	A	C	C	G	G	T	A	G	C	G	C	T	T	G	C	A	G	C	A	T	G	.	.	.	.	.	73
Konsz.	C	G	C	G	T	C	T	C	G	G	A	A	A	C	C	G	G	T	A	G	C	-	-	C	T	T	G	C	A	G	C	A	T	G	-	-	-	-	73

1. ábra A CaM mRNS-ek (cDNS-ek) 5'-nemtranszlálódó régióinak összehasonlítása. A) A három patkány CaM gén megfelelő szakaszainak összeillesztése nem mutat jelentős hasonlóságokat. B) Különböző gerinces fajok (itt egér, patkány, kutya és ember) adott (itt CaM II) génjei azonban nagymértékben megegyeznek. (Forrás: Pálfi és mtsai., 2002)

ellentétes működések megkövetelik a célfehérje közvetlen környezetében található CaM-szint lokális, csak az adott mikrodomaint érintő változtatását.

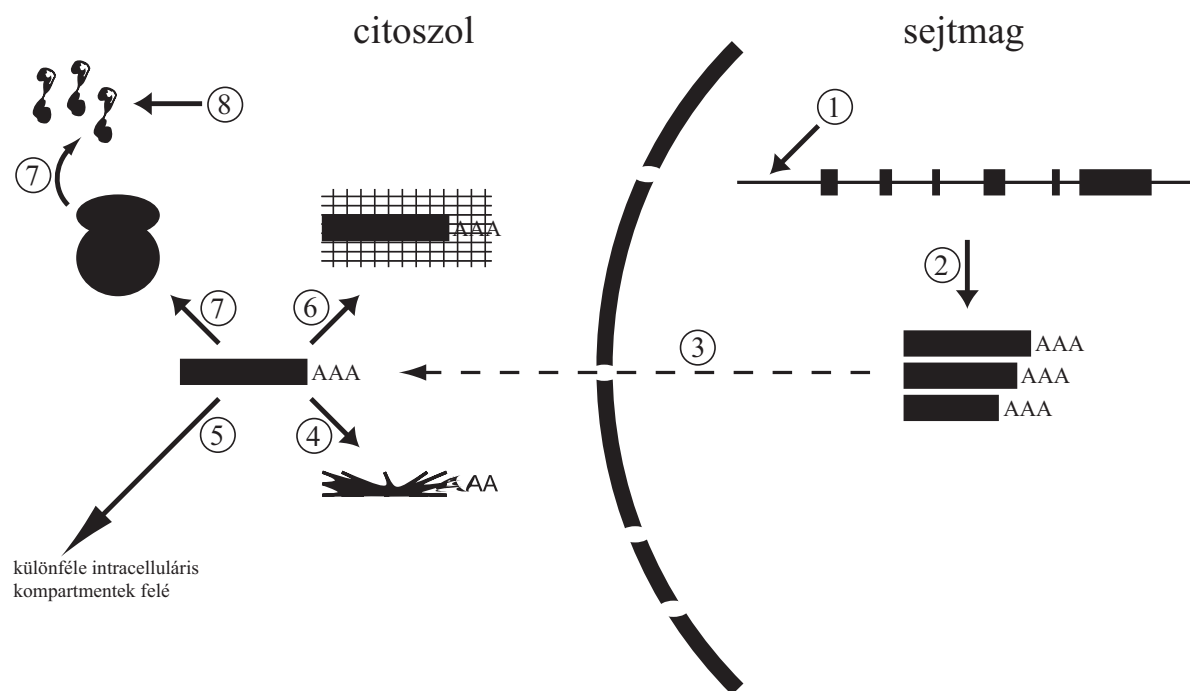
A CaM és a célfehérjék rendkívül változatos módon kapcsolódhatnak össze (Chin és Means, 2000). Az egyik lehetőség, amelyet pl. sokféle ioncsatorna esetében igazoltak, hogy a célfehérje gyakorlatilag irreverzibilisen hozzákötődik a CaM-hoz, függetlenül attól, hogy az apo- vagy holo-CaM formájában van-e jelen. Ebben az esetben a CaM-ot a

fehérje alegységének tekinthetjük. Más fehérjék kizárólag apo-CaM-ot kötnek, a Ca^{2+} -nal való feltöltés a komplex disszociálásához vezet. Ezek (pl. neuromodulin, neurogranin) az „üres” CaM intracelluláris raktározására szolgálnak. A harmadik típusba tartozó fehérjék (pl. calcineurin) a Ca^{2+} -koncentrációtól függő módon lépnek kölcsönhatásba a CaM-nal. A részlegesen töltött CaM-hoz képesek kötődni, de aktiválódásukhoz az szükséges, hogy valamennyi Ca^{2+} -kötőhely betöltött legyen. A negyedik csoport tagjai a Ca^{2+} -nal töltött CaM-hoz kötődnek, ez azonban inaktiválódásukat eredményezi. Az ötödik csoportba tartoznak a holo-CaM kötése által aktiválódó enzimek (pl. CaM-kináz I, II és IV). A hatodik típus az ötödiknek azon alete, amelyben a holo-CaM megkötése szükséges ahhoz, hogy további regulációs lépések (egészen pontosan: a célfehérje foszforilációja) bekövetkezessen. A foszforilációt gyakran olyan enzimek végzik, amelyek maguk is CaM-függők (pl. CaM-kináz-kináz), ami jól mutatja a különböző CaM-aktivált folyamatok konvergenciáját. Az interakciók sokasága tükröződik biokémiai szinten is; a CaM képes konformációját az egyes célfehérjék kötőhelyének megfelelő optimumhoz igazítani (Hoeftlich és Ikura, 2002). A két globuláris EF-hand domaint összekötő szakasz flexibilis, ami lehetővé teszi a különféle konformációk felvételét. Ez a tulajdonsága egészen kivételes, mivel a természetben előforduló fehérjékre rendszerint egyetlen stabil fiziológiai konformáció jellemző.

A CaM gének szerkezete¹

A CaM protein szerteágazó tevékenységeiből adódóan a CaM gének szerkezete is számos ponton eltér más génekétől. A legtöbb gerinctelen fajban egyetlen CaM gén található, a tuskésbőrűek és a fejgerinchúrosok kivételével (a gerincesekhez evolúciós szempontból a legközelebb álló gerinctelenek), amelyek két CaM génnel rendelkeznek. A gerincesek közül számos fajban – beleértve az embert, a patkányt és az egeret – három önálló, nem-allélikus CaM gén létét igazolták (Berchtold és mtsai., 1993; Nojima 1989; Skinner és mtsai., 1994). Egyes csontoshalakban a CaM multigén család akár négy tagot is számlálhat

¹ Bár az értekezés tárgyát képező vizsgálatok kizárólag a patkány CaM génekre irányultak, az alábbi fejezetekben további fajok CaM génjei is előfordulnak. Ezt a gének fajok közötti nagyfokú konzerváltsága indokolja; a más emlősökben megfigyelt szabályszerűségek nagy valószínűséggel érvényesek patkányban is. Hasonlóképpen feltételezhető a patkányoknál leírtakról is, hogy ezen eredmények kiterjeszthetők további modellállatokra.



2. ábra A legfontosabb lépések, amelyek meghatározzák az intracelluláris CaM fehérje mennyiségét. Egy faj különböző CaM génjeinek promotor régiójában eltérő transzkripciósfaktorok kötődhetnek (1). Az egyszerűség kedvéért az ábra csak egyetlen CaM gént mutat, itt a fekete téglalapok a gén exonjait szemléltetik. Erről az egyetlen génről alternatív poliadeniláció mechanizmusával többféle transzkriptum szintetizálódhat (2). A megfelelő pre-mRNS-érési lépéseket követően a transzkriptum elhagyhatja a sejtmagot (3). Citoszolikus sorsát jelentősen befolyásolja szabályozott lebontása (4). Emellett szelektív transzport segítségével eljuthat pl. az idegsejtek dendritjeibe (5). A cisz-ható CPE segítségével a mRNS anélkül halmozódhat fel nagy mennyiségben, hogy fehérjévé fordítódna át (6). Ezen túlmenően, a transzláció hatékonysága is befolyásolható megfelelő cisz-ható elemek segítségével (7). A szintetizált CaM fehérje aktivitásának finomhangolása kovalens módosításán keresztül valósulhat meg (8). (Forrás: Körtvély és Gulya, 2004)

(Matsuo és mtsai., 1992). A gének számától függetlenül valamennyi gerinces CaM gén ugyanazt az aminosavsorrendű fehérjét határozza meg, de a gerinctelen CaM fehérjék is csak egy-egy aminosavban térnek el ettől (Toutenhoofd és Strehler, 2000). Ebből következik, hogy egy adott fajon belüli CaM gének kódoló régiója csak olyan mértékben különbözhet egymástól, amennyit a genetikai kód redundanciája még megenged. E gének nemkódoló szakaszai ugyanakkor viszonylag szabadon változhattak az evolúció során, így jelentősen különbözhetnek egymástól. Összehasonlítva például a patkány CaM I, II és III cDNS-ek 5'-nemkódoló szakaszait megállapítható, hogy a homológia közöttük csak minimális

mértékű. Ha ugyanezt az összehasonlítást elvégezzük különböző gerinces fajokban fellelhető, egymásnak megfeleltethető (ortológ) CaM gének szabályozó és nemkódoló szakaszai esetében, akkor azonban igen nagyfokú hasonlóságot tapasztalunk (1. ábra). Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy létezik valamilyen evolúciós hajtóerő, amely kialakította és fenntartja egy faj összes CaM génjét. Más szavakkal: a három emlős CaM gén eltérő szerepkörrel rendelkezik, más-más élettani folyamatokban nélkülözhetetlenek.

A CaM aktivitásának szabályozása, a szabályozás szintjei²

A célfehérjék nagy számának, vagyis a befolyásolt sejtműködések sokféleségének köszönhetően a genomikus DNS-től a megfelelő helyen, megfelelő időben és megfelelő módon (pl. Ca^{2+} -kötötten) rendelkezésre álló CaM fehérjéig vezető útnak minden lépése szabályozott (Palfi és mtsai., 2002; Kortvely és Gulya, 2004). A lehetséges ellenőrzőpontokat a 2. ábra foglalja össze.

A genomikus DNS szerkezetének szintje. Ez a szabályozás képezi a regulációs hierarchia csúcsát. Mivel saját vizsgálataink ezt a szintet nem érintették, részletes bemutatására nem térek ki.

A promoterek szintje. Noha számos CaM gén promoter régiója ismert, ezidáig nem derült fény azokra a regulációs mechanizmusokra, amelyek a CaM gének egységes kifejeződését biztosítják (Matsuo és mtsai., 1993; Ikeshima és mtsai., 1994; Rhyner és mtsai., 1994; Shimoda és mtsai., 1995; Karkera és Friedberg, 1998; Toutenhoofd és mtsai., 1998). A nukleotidsorrend vizsgálatával azonban számos feltételezett szabályozó elemet azonosítottak.

A pre-mRNS érésének szintje. Míg a prokarióta sejtek génjeiről átírt mRNS molekulákról még az átírás befejezése előtt elkezdődhet a kódolt fehérje szintézise, addig az eukarióta sejtek magjában szintetizálódó pre-mRNS molekulának különböző módosulásokon kell

² Didaktikai okokból az alábbiakban elsősorban a génexpresszió szabályozásának általános törvényszerűségei kerülnek bemutatásra, a CaM-ra vonatkozó konkrét eredmények jelentős része a Megbeszélés fejezetben található.

keresztülmennie, és csak ezt követően történhet meg citoplazmatikus transzlációja. Az érési lépések közül megemlíthető az 5'-végi sapka bioszintézise, az intronok eltávolítása (splicing) és a 3'-vég módosulása. Utóbbi a szintetizálódó transzkriptum endonukleolitikus elhasítását, majd – szinte kivétel nélkül – az így keletkező szabad 3'-vég párszáz adenin nukleotid egymásutánjából álló, ún. poli(A)-farokkal történő templátfüggetlen kiegészítését foglalja magába (Zhao és mtsai., 1999). A poliadeniláció helyét alapvetően megszabja a poliadenilációs szignál transzkriptumon belüli elhelyezkedése. Gerincesekben maga a szignál egy konzervált hexamer (AAUAAA, az emberi mRNS-ek ~58%-ának esetében), amelynek közelében, tőle 3'-irányban megtörténik a pre-mRNS elhasítása (Beaudoing és mtsai., 2000). Egyetlen pre-mRNS több poliadenilációs szignált is tartalmazhat, amelyek versengenek egymással a poliadenilációt végző enzimkomplexért (Legendre és Gautheret, 2003). A primer transzkriptum poliadenilációs szignálhasználata gyakran mutat szövet-, ill. sejttípusfüggő eltéréseket. Minél több poliadenilációs szignált tartalmaz egy pre-mRNS molekula, annál nagyobb valószínűséggel fordulnak elő e szignálok között olyanok, amelyek eltérnek a konszenzustól (Beaudoing és Gautheret, 2001). (A leggyakoribb eltérés az AUUAAA hexamer, az emberi mRNS-ek ~15%-ban használják.) Ezen túlmenően, ha egy génről alternatív poliadenilációval eltérő hosszúságú mRNS-ek keletkeznek, akkor általában a leghosszabb forma képződik a legnagyobb mennyiségben. Az ehhez használt szignál pedig nagy valószínűséggel megfelel a konszenzusnak. A leghosszabb 3'-nemtranszlálódó régióval rendelkező mRNS molekula viszont nem feltétlenül a legstabilabb, mivel gyakran tartalmaz destabilizáló elemeket (ld. később).

A CaM mRNS-ek szintézise közvetlenül is szabályozott folyamat. Emlősökben mind a CaM I (4,2 kb; 4,1 kb; 1,7 kb; 1,0 kb), mind a CaM III (2,3 kb; 1,9 kb; 0,9 kb) génről többféle mRNS íródik át, tandem elhelyezkedésű alternatív poliadenilációs helyek használatával (3. ábra, Nojima, 1989; Ikeshima és mtsai, 1993). A CaM II génről ezzel szemben csak egyetlen transzkriptum szintetizálódik (1,4 kb). Az egyes transzkriptumok egymáshoz viszonyított mennyisége Northern analízis során jellegzetes szöveti különbségeket mutat, amely adódhat a különféle szövetek eltérő poliadenilációs szignál-használatából.

A mRNS stabilitásának szintje. A poliadeniláció illetve egy mRNS poliadeniláltságának foka kihat a teljes mRNS metabolizmusra; befolyásolja a mRNS stabilitását (fél-életidejét), transzlációra kerülésének valószínűségét, de a sejtmagból a citoplazmába való kiszállítását is. Léteznek azonban olyan cisz-ható szekvenciareszletek is, amelyek elsődleges feladata a fokozott stabilitás vagy éppen instabilitás előidézése. Mindezen faktorok összessége együttesen határozza meg a mRNS fél-életidejét, amely néhány percet, de akár néhány napot is jelenthet (Ross, 1995). A mRNS instabilitását okozhatják pl. a 3'-nemtranszlálódó régióban nagyszámban előforduló, pentamerikus (AUUUA), adeninben és uridinben gazdag elemek (ARE). Transz-ható fehérjéken keresztül ezek az elemek a mRNS deadenilálódásához vezetnek, amely a lebontás első lépése (Xu és mtsai., 1997; Tebo és mtsai., 2003). Egy mRNS transzlációjának szabályozása történhet a poli(A) faroktól független módon is. Erre példa a differenciálódást szabályozó elem (DICE), amely a hozzákötődő fehérjéken keresztül megnövekedett stabilitást kölcsönöz a mRNS-nek, ugyanakkor egyidejűleg meggátolja transzlációját (Ostareck és mtsai., 2001; Reimann és mtsai., 2002).

Saját vizsgálatainkat megelőzően mindössze a humán CaM I génben található nagyszámú ARE volt ismert (Senterre-Lesenfants és mtsai., 1995).

A transzláció hatékonyságának szintje. Azt követően, hogy a mRNS elhagyja a sejtmagot, a részét alkotó poli(A) farok hossza mindkét irányba változhat: rövidülhet illetve megnőhet. A deadenilálás általában akadályozza a mRNS transzlációját, míg a citoplazmatikus poliadenilálás serkenti azt. A korai embrionális egyedfejlődés során a mRNS-ek időleges deadenilálása (represszió), majd az ezt követő poliadeniláció (reaktiválás) jól ismert jelenség (Richter, 1999). Azok az mRNS-ek, amelyek a sejtmagi poliadeniláció mellett a citoplazmatikus poliadeniláción is áteshetnek a klasszikus poliadenilációs szignál közelében egy uridinben gazdag második szignált is tartalmaznak (UUUUUAU), ez a citoplazmatikus poliadenilációs elem (CPE). A transzláció poliadeniláción keresztüli befolyásolása nem korlátozódik az egyedfejlődésre. Az LTP egyik kulcsfehérjéjét, a Ca^{2+} /CaM-függő protein kináz II α -t meghatározó mRNS például két CPE-et is tartalmaz (Wu és mtsai., 1998). Ez a mRNS molekula a posztzinaptikus régióban inaktív formában halmozódik fel. A szinaptikus aktivitás függvényében történik meg a poliadenilációja, amit követ transzlációja is (Mayford

és mtsai., 1996).

A CaM fehérje kimutatására irányuló immunhisztokémiai vizsgálatok nagy száma ellenére maga a CaM transzláció ezidáig egyáltalán nem képezte vizsgálat tárgyát, tehát nem rendelkezünk ismeretekkel arról, hogy a – legkevesebb – nyolcféle CaM mRNS milyen hatékonysággal fordítódik át fehérjévé. Ennek a szintnek a jelentőségére elsőként munkacsoportunk hívta fel a figyelmet.

A transzláció helyszínének szintje. Hasonlóan a fenti szignálokhoz, a mRNS szekvenciája a transzkriptum sejten belüli szállítására vonatkozó információt is tartalmazhat. Ezek az ún. lokalizációs szignálok vagy „irányítószámok” a leggyakrabban a 3’-nemtranszlálódó régióban helyezkednek el. A mRNS-ek sejten belüli egyenlőtlen megoszlása kulcsfontosságú a polarizált állapot kialakításának szempontjából. Az utóbbi években folyamatosan nő azon mRNS fajták száma, amelyekről igazolták, hogy szelektív transzportfolyamatok eredményeképp kijutnak az idegsejtek dendritjeinek citoplazmájába (Kloc és mtsai., 2002). Az is bizonyítást nyert, hogy a dendritikus kompartmentben valóban történik *de novo* protein szintézis (Glanzer és Eberwine, 2003). Ez a mechanizmus a transzláció szabályozásának egy új lehetőségét teremti meg; szemben a háztartási génekről induló, konstitutív, perinukleáris régióban zajló transzlációval, a dendritikus kompartment fehérjeszintézise a szükségletek függvényében (induktívan) működik (Glanzer és Eberwine, 2003). Noha például az inzulin képes a teljes fehérjeszintézis rátáját megváltoztatni, a legtöbb sejtaktivitáshoz (sejtvándorlás, apoptózis, exocitózis stb.) csak néhány célfehérje megemelt vagy lecsökkentett szintézise szükséges. Ilyen folyamat az LTP is, amely szintén igényli új fehérjék képződését. A színterét jelentő szinapszis környezetében meglévő mRNS-ekre korlátozott transzlációs aktivitás teszi lehetővé, hogy a neuron gyorsan és plasztikusan válaszolhasson a környezetéből érkező impulzusokra. Ma már számos olyan cisz-ható elem ismert, amely a dendritikus kompartmentbe irányítja az adott mRNS-t. A szállítandó mRNS-ek és az RNS-kötő fehérjék gyakran szemcsék (transzport részecskék) formájában mutathatók ki, főként a periszinaptikus térben.

A CaM mRNS-ek dendritikus lokalizációját elsőként Berry és Brown igazolta (1996). Eredményeik azt mutatták, hogy újszülött állatok nagyagykérgi és hippocampális

piramissejtjeiben valamint a kisagyi Purkinje-sejtek apikális dendritjeiben átmenetileg jelen van a CaM I mRNS molekula. Munkacsoportunk kvantitatív radioaktív *in situ* hibridizációs módszerekkel közvetett módon mindhárom CaM gén esetében kimutatta a mRNS-ek dendritikus transzportját felnőtt patkányokban (Palfi és mtsai., 1999). PC12 sejtek nyúlványaiban már jóval korábban leírták a három CaM génhez rendelhető mRNS-ek génspecifikus előfordulását (Zhang és mtsai., 1993).

A transzláció kezdőpontjának szintje. A mRNS transzlációja két úton kezdődhet el. Az egyik esetben a riboszóma az 5'-sapkától elindulva halad 3'-irányba, majd – általában – az első transzlációs start kodonnál (AUG) elkezdi a fehérjeszintézist. Mintegy 10%-ra teszik azon mRNS-ek arányát, amelyek egy nukleinsavrészlet segítségével, az 5'-sapkától függetlenül képesek a transzlációs apparátus összeállítását kiváltani, így transzlációt indítani a mRNS „belsejéből” (Vagner és mtsai., 2001). Ez az elem a belső riboszóma belépési hely (internal ribosome entry site, IRES), általában a mRNS 5'-nemkódoló régiójában helyezkedik el. Alternatív utat jelent a transzlációhoz olyan esetekben, mint a sejtosztódás vagy az apoptózis, amikor a hagyományos transzláció egy iniciációs faktor foszforilációja következtében gátolt (Holcik és Korneluk, 2000; Pyronnet és mtsai., 2000). A transzláció elindításához szükséges faktorok ugyan megtalálhatók a dendritekben (ld. fent), mennyiségük azonban sokkal kevesebb, mint a sejttestben. Így ebben a mikrodomaiban a transzláció szempontjából előnyt jelent ennek az elemnek a megléte.

A CaM mRNS-ek és az IRES kapcsolatát munkacsoportunk vetette fel elsőként (saját nempublikált eredmény).

A poszttranszlációs módosítások szintje. A CaM fehérjének többféle poszttranszlációs módosítását is leírták. Ilyenek a protein acetilálása, trimetilálása, karboxi-metilálása, proteolitikus hasítása és foszforilálása (Watterson és mtsai., 1980; Murtaugh és mtsai., 1986; Benaim és Villalobo, 2002). A modifikációk széles spektruma ellenére csak feltételezések léteznek arra vonatkozóan, hogy mi lehet ezeknek a kovalens módosításoknak a szerepe. A CaM fehérjét kódoló génszakasz kismértékű (pontmutációs) megváltoztatása is nagy valószínűséggel letális. Ugyanakkor a többsejtű szervezet sejtjeinek különbözőségéből

adódóan más-más sejtek más-más célfehérjékkel rendelkezhetnek, amelyek a kissé módosított CaM-ot erősebben köthetik. Ez a szint tehát lehetőséget teremt a CaM aktivitás sejtípus-függő „finomhangolására”.

Mint látható, a mRNS nukleinsav-sorrendjében számos olyan elemet tartalmazhat, amely alapvetően befolyásolja funkcióját. Ezeknek az elemeknek a fenti kategorizálása azonban sok esetben megkérdőjelezhető. A destabilizáló elemként leírt pentamerről például bizonyították, hogy egyes esetekben nélkülözhetetlen részét képezik lokalizációs szignáloknak (Veyrune és mtsai., 1996). Hasonló módon, az elsődlegesen poliadenilációt szabályozó CPE-ről ismert, hogy önmagában előidézhetheti egy mesterséges, riporter RNS dendritbe szállítását (Huang és mtsai., 2003).

A CaM gének expressziós mintázatának vizsgálata élettani, kórélettani és kísérletes körülmények között

Az elmúlt évtizedekben jelentős erőfeszítések történtek a CaM gének expresszióját szabályozó mechanizmusok tisztázásának érdekében. Mindhárom CaM gén működése kimutatható a nagyon korai embrionális életszakasztól kezdődően, és ez az aktivitás minden valószínűség szerint valamennyi sejtben megmarad az egész életen át. Általában megállapítható, hogy a CaM gének kifejeződése nem mutat feltűnő szövet- és/vagy sejtípusfüggő preferenciákat, azaz expressziós mintázatuk mindenütt nagyon hasonló. Így például mindhárom CaM génről neuronokban íródik át a legtöbb mRNS, ami ideális lehetőséget teremt a CaM gének központi idegrendszeren belül kifejeződésének tanulmányozásához.

A vizsgálatok kiterjedtek a három CaM génhez rendelhető mRNS-ek fiziológiás (Sola és mtsai., 1996; Palfi és mtsai., 1999), patofiziológiás (MacManus és mtsai., 1989) és kísérletesen módosított körülmények közötti eloszlásának megállapítására (Barron és mtsai., 1995; Sola és mtsai., 1997; Palfi és Gulya, 1999; Vizi és mtsai., 2000), mind embrionális (MacManus és mtsai., 1989; Cimino és mtsai., 1990), mind felnőtt életkorban (Gannon és McEwen, 1994; Palfi és mtsai., 1999), sőt *in vitro* rendszerekben is (Bai és Weiss, 1991; Bai és mtsai., 1992; Zhang és mtsai., 1993). Mindezek a kísérleti adatok arra utalnak, hogy

a CaM gének azonos expressziós mintázata valójában csak látszólagos, a részletekbe menő vizsgálatok jelentős eltéréseket tárhatnak fel közöttük. Berry és Brown például a 4,1 kb-os CaM transzkriptum mennyiségének növekedését detektálta a korai egyedfejlődés alatt, miközben az 1,7 kb-os mRNS mennyisége alig változott (1995). A spermatogenezis során pedig valamennyi CaM gén egyedi expressziós mintázatot mutat (Slaughter és Means, 1989). Továbbmenve, számos neoplasia esetében a CaM II gén aktivitása a legmagasabb, ami eltér a fiziológiás viszonyoktól (MacManus és mtsai., 1989). Kiemelendő, hogy a hivatkozott vizsgálatok arra nézve nem szolgáltatnak információval, hogy vajon az adott CaM gén átírásának aktivitása (transzkripcionális szabályozás) vagy a meglévő CaM mRNS készlet stabilitásának megváltozása (poszttranszkripcionális szabályozás) idézi-e elő az egyes CaM génekhez rendelhető mRNS-ek egymáshoz viszonyított arányának megváltozását. Sajnálatos módon az sem ismert, hogy egy adott mRNS relatív mennyiségének megnövekedése tükröződik-e a transzláció szintjén, azaz jelentősen növeli-e a sejt CaM-készletét.

CÉLKITŰZÉSEK

Az elmúlt években számos eredmény született a CaM gének kifejeződésének vizsgálata során. Mindezek arra mutatnak, hogy a három CaM gén eltérően viselkedhet különböző fiziológiás, illetve patofiziológiás körülmények között. A legtöbb erre irányuló kísérlet azonban csak kvalitatív módon és/vagy csak egy adott CaM gén szempontjából közelítette meg ezt a kérdést. Ugyanakkor mindezekig nem történt meg a CaM mRNS-ek átfogó, valamennyi leírt szabályozó elemet magába foglaló számítógépes analízise. Vizsgálatainkban éppen ezért az alábbi célokat tűztük ki:

- A CaM I génről átíródó, 4,2 kb hosszúságú mRNS-nek megfelelő cDNS klónozása, a transzkriptum 3'-végét alkotó nukleinsavrészlet meghatározásának céljából.
- A három CaM génhez rendelhető mRNS-ek stabilitásában, intracelluláris elhelyezkedésének meghatározásában, translációs hatékonyságában feltételezhetően szerepet játszó cisz-ható nukleinsav részletek számítógépes (*in silico*) azonosítása.
- A három CaM génről átíródó mRNS-ek *in vivo* megoszlásának génspecifikus vizsgálata a fejlődő patkányban, a korai posztembrionális élet során. Az ezen időszakra jellemző CaM génexpressziós változások precíz (kvantitatív) nyomonkövetése.
- A CaM gének expressziójának *in vitro* vizsgálata primér hippocampalis sejtenyészeten, különös tekintettel a mRNS-ek irányított intracelluláris szállítására.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok és szövetpreparálás

A kísérletekben használt állatok tartása és felhasználása az Európai Közösség Tanácsa irányelveinek (86/609/EEC) és a magyar törvényi szabályozásnak (XXVIII/1998 és 243/1998) megfelelően, az intézményi etikai bizottság engedélyével történt. Az ontogenetikus vizsgálatokhoz standard körülmények között tartott, terhes Sprague-Dawley patkányoktól származó embriókat, ill. újszülötteket használtunk. *In situ* hibridizációs célokra különböző életkorú állatokat dekapitáltunk (19. embrionális életnapos, E19; 1 napos, PD1; 5 napos, PD5; 10 napos, PD10; 15 napos, PD15; és 20 napos, PD20), agyukat gyorsan eltávolítottuk, és Cryomatrix beágyazóanyagba ágyaztuk (Shandon Scientific, Pittsburg, PA, USA), majd -70°C -on azonnal lefagyasztottuk. Minden korcsoportból öt állatot használtunk, amelyekből koronasíku, 20 μm vastagságú kriosztát sorozatmetszeteket készítettünk, a patkányagy atlaszból kiválasztott síkoknak megfelelően (Paxinos és Watson, 1998). A Cr-Al-zselatinnal bevont, steril tárgylemezekre felvett metszeteket a száradást követően a felhasználásig -70°C -on tároltuk.

A 4,2 kilobázisos CaM I mRNS-hez tartozó, teljes hosszúságú cDNS nukleinsav-sorrendjének meghatározása

RNS izolálás céljára felnőtt hím patkányok agyát a megölést követően azonnal eltávolítottuk, majd az irodalomból ismert módon teljes RNS-t tisztítottunk belőle (Chomczynski és Sacchi, 1987). Mivel az adatbázisokból a 4,2 kb-os CaM transzkriptumnak a 3'-vége hiányzott, ezért módosított 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) kísérleteink ennek a szakasznak a klónozását célozták meg. Első lépésként egy univerzális, valamennyi poli(A) farokkal rendelkező mRNS-sel hibridizálni képes dT17-adapter primerrel (5' GACTCGAGTCGAC ATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTNN 3') reverz transzkripciót végeztünk az egér leukémia vírusból izolált M-MuLV reverz-transzkriptáz enzim segítségével (Fermentas, Vilnius, Litvánia). A dT17-adapter primer a 3'-végén lévő legutolsó két nukleotid segítségével a poli(A) faroknak az mRNS kódoló régiója felé tekintő végéhez rögzül, míg a primer

5'-végén lévő, nemhibridizáló nukleotidok (adapter) nagyságrendekkel megnövelik a későbbi polimeráz láncreakciók specifitását. A kívánt, a 4,2 kb-os CaM I mRNS 3'-végét reprezentáló cDNS szakaszt a reverz transzkripcióval készített templáton CaM1_3R/long (5' CAATCGATACTTGGAGTAGAGCCCTAGTG 3') génspecifikus, illetve az AP/3' (5' G ACTCGAGTCGACATCG 3') adapter-specifikus primerekkel végzett PCR-al állítottuk elő. Kihasználva a primerekre tervezett, restrikciós endonukleázok által felismert hasítóhelyeket, a reakcióterméket pBlueScript II KS (Stratagene, La Jolla, CA, USA) vektorba klónoztuk. Az inszert nukleinsav-sorrendjét a Szegedi Biológiai Központban üzemelő ABI Prism 3100 Genetic Analyzer kapilláris szekvenátorra épülő szolgáltatás igénybevételével határoztuk meg. A szekvenciaadatokat az Entrez Nucleotides adatbázisban közzétettük (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/index.html>, hivatkozási kód: AF176375).

Számítógépes nukleinsav-sorrend elemzés

A különböző fajok adott CaM génjeinek, illetve egy faj különböző CaM génjeinek 5'-nemtranszlálódó régióját a GCG program (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA) felhasználásával hasonlítottuk össze. A különféle CaM mRNS-ek viselkedését szabályozó, ezekben a transzkriptumokban előforduló szekvenciaelemek elsődleges, illetve másodlagos szerkezete által meghatározott cisz-ható régiók azonosítására a TransTerm és UTRdb adatbázist használtuk (Jacobs és mtsai., 2002; Pesole és mtsai., 2002). Ezen kívül, mivel megfelelő patkány adatbázis jelenleg nem áll rendelkezésre, a humán AU-gazdag elemeket tartalmazó mRNS adatbázisban megvizsgáltuk a CaM transzkriptumok jelenlétét (Bakheet és mtsai., 2003). Feltételezzük, hogy a CaM gének fajok közötti nagyfokú hasonlósága miatt a humán CaM génekre vonatkozó megfigyelések nagy valószínűséggel érvényesek patkányban is.

Primer sejt kultúra

A 18. embrionális élet napos patkányok hippocampusát kimetszettük, majd a szövetdarabot tripszinnel emésztettük, végül a sejteket mechanikailag elválasztottuk egymástól. A sejteket poli-L-lizinnel bevont üveg fedőlemezekre tenyésztettük 10^5 sejt/fedőlemez (átlagosan ~ 174 sejt/mm²) sűrűségben. Az így nyert kultúrákat 5% CO₂ tartalmú légtermosztátban, 37°C-on, 10 napig tartottuk fenn Neurobasal/B27 tápfolyadékban (Gibco BRL; Life Technologies, Eggenstein, Németország). Felhasználás előtt a sejteket 0,01 M-os, foszfátpufferelt fiziológiás sóoldatban (PBS; 0,01 M Na₂HPO₄, pH 7,4, 0,9% NaCl) öblítettük.

In situ hibridizáció

A radioaktívan jelölt cRNS próbák készítéséhez a korábban kidolgozott módszert használtuk (Palfi és mtsai., 1998; Palfi és mtsai., 1999; Vizi és Gulya, 2000), a haptén-jelölt próbák készítése lényegében ugyanilyen módon történt. Röviden, a CaM I, II és III mRNS-ek nemhomológ, 3'-nemtranszlálódó régiójába eső szakaszainak megfelelő genomikus DNS-eket polimeráz láncreakció segítségével felsokszoroztuk, majd a reakciótermékeket pcDNA3 vektorba (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) klónoztuk. A felhasznált primerek nukleinsav-sorrendje a következő volt: CaM I, 5' AGACCTACTTTCAACTACT (30-48 bp, 6. exon) és 5' TGTAAGAACTCAGTAGGGG (237-255 bp, 6. exon); CaM II, 5' ATTAGGACTCCATTCCTCC (1929-1947 bp, 5. exon) és 5' CACAACCTCCACACTTCAACAGC (2138-2159 bp, 5. exon); CaM I, 5' ATGATGACTGCGAAGTGAAG (7058-7077 bp, 6. exon) és 5' CAGGAGGAAGGAGAAAGAGC (7228-7247 bp, 6. exon). A primerek pozíciójának megjelölésével korábbi irodalmi adatokat követtünk (Nojima, 1989). Az antiszensz (a mRNS megfelelő szakaszával komplementer) és a szensz (a mRNS megfelelő szakaszával megegyező) próbákat a linearizált és tisztított vektorokról *in vitro* RNS szintézissel készítettük, a gyártó utasításait követve (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország). A radioaktívan jelölt próbák esetében [³⁵S]UTP α S-t (>1250 Ci/mmol, ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA), a hapténnel jelölt próbák esetében digoxigenin-11-UTP-t (Roche) adtunk az RNS szintézishez. A nem beépült, radioaktív nukleotidoktól Sephadex G-50 oszlopon

(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) végzett gélszűrőssel szabadultunk meg, majd folyadékszintillációs méréssel meghatároztuk specifikus aktivitásukat.

A radioaktív *in situ* hibridizációhoz a metszeteket 4% formaldehidet tartalmazó 2X SSC-ben (0,3 M NaCl és 0,03 M Na-citrát, pH 7,0) rögzítettük szobahőn 5 percig, majd kétszer 1 percig mostuk 2X SSC-ben. Ezt követően a metszeteket 5 percig szobahőn inkubáltuk 0,1 M-os trietanol-amint és 0,25% ecetsav-anhidridet tartalmazó oldatban, majd etanolos dehidrált és szárítást követően 50 µl, 200 fmol/ml jelölt próbát tartalmazó hibridizációs oldatot (50% formamid, 5X SSC, 1X Denhardt reagens, 10% dextrán-szulfát, 50 mM ditiotritol, 100 µg/ml élesztő transzfer RNS) cseppentettünk minden tárgylemezre. A mintákat parafilm fedőlemezekkel láttuk el, majd nedveskamrákban 45°C-on 20 órán át hibridizáltuk. Ezt követően kétszer mostuk 50°C-on, 2X SSC-t és 50% formamidot tartalmazó oldatban, majd a nemhibridizált próbát 37°C-on, 30 percen át végzett RNáz A emésztéssel bontottuk el, amit e lépést megelőző mosással azonos kezelés követett. A dehidrált, megszárított metszeteken autoradiográfiát végeztünk. Néhány metszetet az autoradiográfiát követően a Mayer-féle hematoxilinos módszerrel felülfestettünk.

A színes *in situ* hibridizációhoz a tenyészeteket 4% formaldehidet tartalmazó 2X SSC-ben szobahőn 5 percig fixáltuk, majd 2 percig mostuk 2X SSC-ben. A sejteket 0,1% Triton X-100-at tartalmazó 2X SSC-ben permeabilizáltuk, majd ismételtén 2 percig mostuk 2X SSC-ben. Ezt követően 30 másodpercig 20%-os ecetsavas kezelést végeztünk, amit ismét egy 2 perces, 2X SSC-t tartalmazó mosás követett. A prehibridizációt szobahőn végeztük, 0,1 M-os trietanol-amint és 0,25% ecetsav-anhidridet tartalmazó oldatban, majd egy 2 perces, 2X SSC-t illetve egy 2 perces 2X SSC-t és 50% formamidot tartalmazó mosás után a radioaktív módszernél leírtakkal azonos módon jártunk el, a magasabb, 56°C-os hibridizációs hőmérséklet kivételével. A hibridizációt követő mosások és a poszthibridizációs RNáz A kezelés szintén megegyezik a két módszer esetében. Ezt követően az aspecifikus fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakulásának megakadályozása érdekében a sejteket 5% normál kecske vérszérumot tartalmazó B1 oldatban (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) szobahőn inkubáltuk, 1 órán keresztül. Ezután a blokkolóoldatot 1% szarvasmarha vérszérum-albumin-t és alkalikus-foszfátázhoz kapcsolt anti-digoxigenin ellenanyagot (1:3000-es hígításban) tartalmazó B1 oldatra cseréltük, és egész éjszakán át folytattuk az

inkubálást 4°C-on. A nemkötődött antitesteket intenzív mosással távolítottuk el (négyyszer 5 perc, B1 oldatban, szobahőn), majd B2 oldatban (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂) tartottuk a sejteket 10 percen keresztül. Az immun-enzim reakciót egész éjszakán át hívtuk elő 0,4 mM nitrotetrazolium-blue-klorid (NBT) és 0,4 mM 5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfát (BCIP) szubsztrátokat tartalmazó B2 oldat használatával. Az enzimreakciót B3 oldatban (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) történő inkubálással állítottuk le, a preparátumok lefedéséhez glicerín/zselatin oldatot használtunk.

Autoradiográfia, mikroszkópia és képanalízis

Az autoradiográfiát a korábban leírtaknak megfelelően végeztük (Vizi és Gulya, 2000; Palfi és mtsai., 2001). Röviden, a radioaktív próbákkal hibridizált szöveteket membrán standard skálákkal együtt exponáltuk SR Cyclone foszforernyőkre (Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA) 20 órán keresztül. Az autoradiogramokat 600 x 600 dpi képfelbontással rögzítettük a Cyclone Storage Phosphor System (Packard) képalkotó rendszer segítségével. Az így nyert adatokat az OptiQuant 3.0 számítógépes programmal értékeltük ki. A képeken a membrán standardokat és az egyes agyi régiókat körülhatároltuk, majd meghatároztuk a hozzájuk tartozó autoradiográfias jelölődés erősségét területegységre eső digitális fényegység mértékegységben (dlu/mm²). Ezeket az értékeket korrigáltuk az ernyő nem exponált területein minták nélkül mérhető háttér értékével. A membrán standard skála segítségével a helyesbített jelet RNS próba-kópiaszám/mm² mértékegységre alakítottuk át, és kivontuk belőle a megfelelő, szensz próbával végzett hibridizálás során mérhető jelet. Öt állatban valamennyi agyterületen, valamennyi gén esetében, két-két mérést végeztünk, majd a kapott adatokat átlagoltuk. Önkényesen, valamennyi gén esetében a PD20 életkorban a nagyagykéregben mérhető jel erősségét tekintettük 100%-nak, minden mérési adatot ehhez viszonyítva adtunk meg.

Statisztikai módszerek

A mért eredmények szignifikanciáját egyutas varianciateszttel végeztük (Analyse-it v1.62, Analyse it Software Ltd., Leeds, Egyesült Királyság for Microsoft Excel 2000, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). Két független esetet vizsgáltunk. Először egy adott régióban, egy adott gén esetében hasonlítottuk össze a különböző életkorokban mért értékeket.

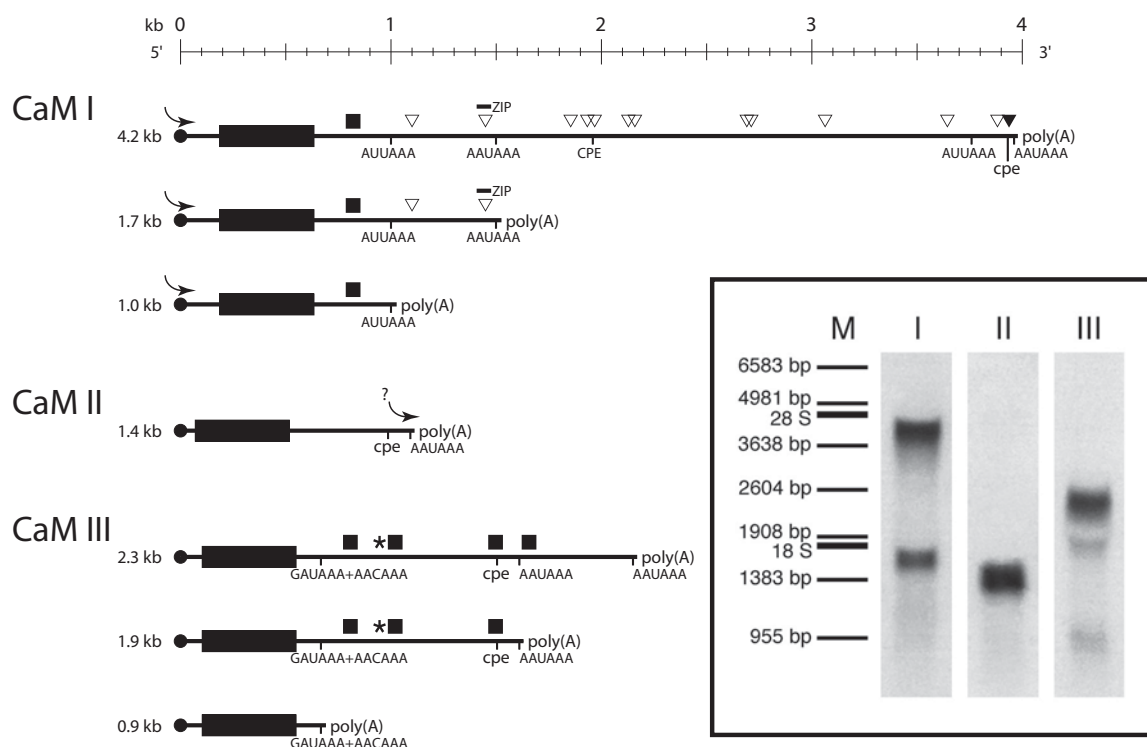
Másodszor egy adott régióban és egy adott életkorban vetettük össze a három CaM génre jellemző mérési adatokat. Egy különbséget akkor tekintettünk szignifikánsnak, ha P értéke kisebb volt 0,01-nél. A kontrasztok megállapításához a Tukey-féle eljárást követtük, a csoportok közötti valamennyi páros megalkotásával, 99%-os konfidencia intervallum használatával.

EREDMÉNYEK

A CaM mRNS-ek szintézisét és a citoplazmán belüli sorsát befolyásoló, cisz-ható elemek számítógépes vizsgálata

A CaM gének, illetve cDNS-ek ismeretében számítógépes szekvenciaanalízis módszerével számos feltételezett szabályozó elemet azonosítottuk (3. ábra). Valamennyi CaM transzkriptumra vonatkozóan meghatároztuk a poliadenilációs szignálokat. A CaM I esetében a 4,2 kb-os és az 1,7 kb-os transzkriptum, a CaM II gén egyetlen, 1,4 kb-os transzkriptuma, valamint a CaM III gén 2,3 kb-os és 1,9 kb-os transzkriptumainak poliadenilálódása a leggyakrabban előforduló hexanukleotid szignált (AAUAAA) követően történik meg. Ugyanakkor a CaM I gén 4,1 kb-os és 1,0 kb-os transzkriptumának 3'-végi érése egy jóval ritkábban előforduló, az előző szignáltól egyetlen nukleotidban eltérő hexamert (AUUAAA) használ. A CaM III gén 0,9 kb-os transzkriptumának poliadenilációs szignálja összetett, két, nagyon ritkán előforduló hexamert tartalmaz (GAUAAA és AACAAA). A humán CaM gének szintén ezeket a poliadenilációs szignálokat használják. A megfelelő emberi és a patkány cDNS-eket összehasonlítva feltűnő, hogy e szignálok nukleinsav környezete is rendkívül hasonló.

Az eltérő poszttranszkripció szabályozás lehetőségét vetik fel a különféle CaM mRNS-ek 3'-nemtranszlálódó régiójában azonosított elemek. A CaM I mRNS-ekre jellemző az ARE-k nagy száma, amelyek elsősorban a 4,2 kb-os transzkriptumon csoportosulnak. Ez alapján a transzkriptum humán megfelelője megtalálható az ARE-kben gazdag mRNS-ek adatbázisában (Bakheet és mtsai., 2003). A 4,2 kb-os transzkriptum emellett két CPE-t is tartalmaz, amely azonban hiányzik a többi, rövidebb CaM I mRNS-ből. A 4,2 kb-os CaM I mRNS-nek az 1,7 kb-os transzkriptummal átfedő részletében pedig egy további, 70 nukleotid hosszúságú elemet azonosítottunk. Ez az elem nagyfokú homológiát mutat a β -aktin és az angiotenzin II receptor mRNS-ekben előforduló, azok dendritikus transzlokációját előidéző szekvenciadarabbal. A CaM II mRNS szintén tartalmaz CPE-t, akárcsak a hosszabb CaM III mRNS-ek. Utóbbiakban különösen gyakran előforduló szabályozóelem a DICE. A 2,3 kb-os ill. 1,9 kb-os CaM III mRNS-ek egy, az mRNS stabilitását nagymértékben megnövelő,



3. ábra A CaM transzkriptumok méretarányos ábrázolása és kimutatása Northern analízissel. Fekete kör: sapka a mRNS 5' végén, fekete téglalap: kódoló régió, fekete négyzet: DICE, fehér háromszög: AUUUA destabilizáló elem, fekete háromszög: UUAUUUA U/A U/A destabilizáló elem, ZIP: lokalizációs szignál, CPE: UUUUUUAU általános citoplazmatikus szignál, cpe: UUUUAU minimális citoplazmatikus elem. Ívelt nyíl: IRES. A CaM II transzkriptum esetében elhelyezkedéséből adódóan nem játszhat szerepet a transzlációban, erre utal a kérdőjel. Csillag: GU-gazdag stabilizáló elem. Az ábrán feltüntettük valamennyi poliadenilációs szignál nukleotid sorrendjét valamint a transzkriptumok hosszát is. (Forrás: Pálfi és mtsai., 2002)

guaninban és uridinben gazdag elemet is tartalmaznak (Chrzanowska-Lightowlers és Lightowlers, 2001).

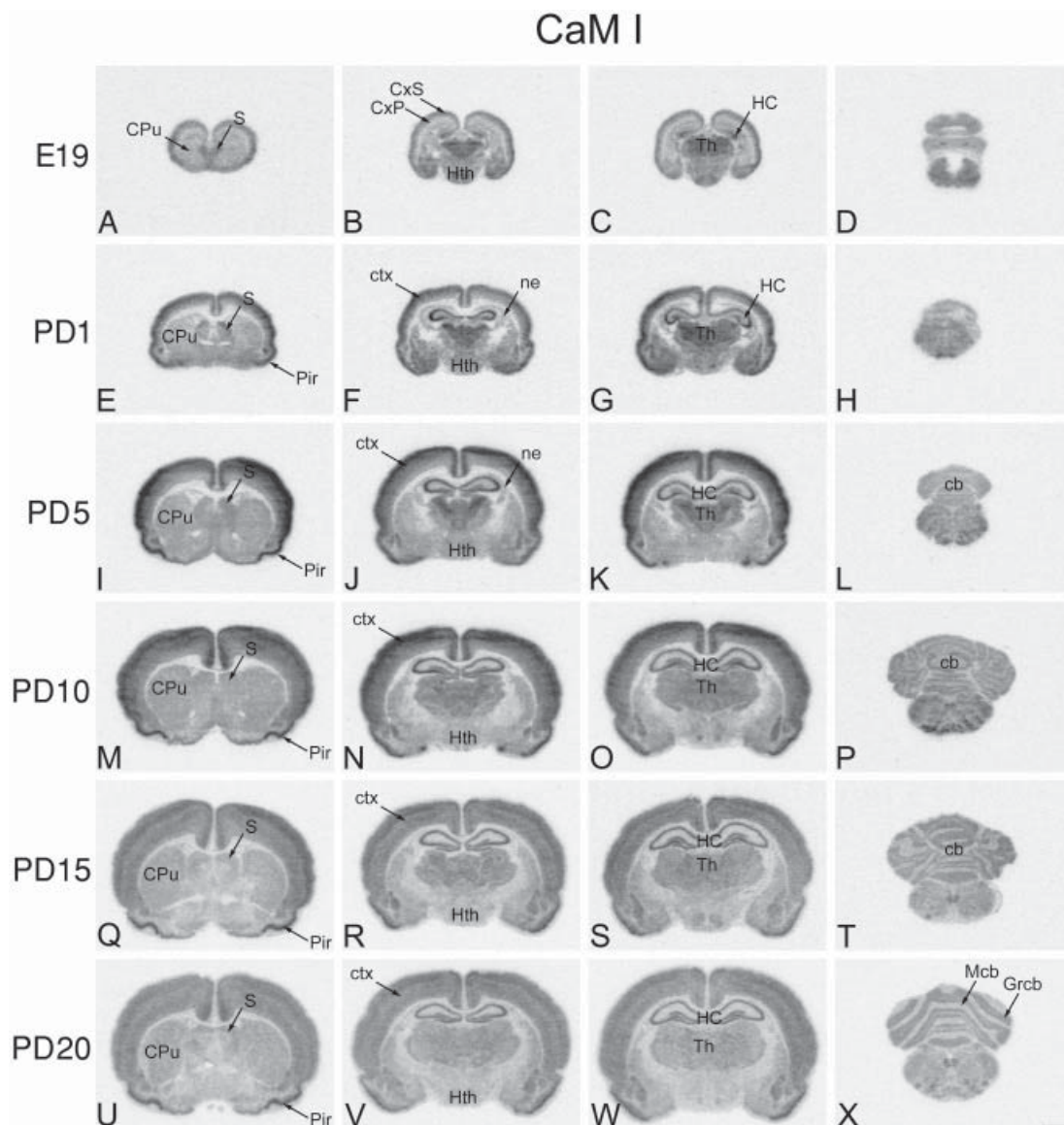
A számítógépes analízissel két IRES-t is azonosítottunk, egyet a CaM I transzkriptumok első száz nukleotidjában, és egy másikat a CaM II mRNS utolsó száz nukleotidjában.

A CaM gének kifejeződése a fejlődő patkányagyban

Kvantitatív *in situ* hibridizációs kísérleteink során fejlődő patkányagyban meghatároztuk a három CaM génre specifikus hibridizált [³⁵S]cRNS próba átlagos mennyiségét 15 agyterületen, 6 különböző életkorban. Önkényesen, valamennyi gén esetében a 20. poszttembrionális életnapon, a nagyagykéregben mért jelet tekintettük referenciának, minden további, más területeken mért értéket ehhez viszonyítva fejeztünk ki. Általánosságban megállapítható, hogy mindhárom CaM gén expresszálódik a fejlődő agyban, valamennyi vizsgált életkorban (4.-6. ábra). Leegyszerűsítve, az expressziós profilok három csoportra oszthatók. A leggyakoribb esetben az expresszió egy adott napig fokozódik, ezt követően pedig csökken (I. típus). Más esetekben a legerősebb expressziót a legfiatalabb vizsgált életkorban (E19) mértük, amit a szignál fokozatos gyengülése követett az életkor előrehaladtával (II. típus). Néhány esetben az expressziós profilok látszólag szabálytalan lefutást mutattak (III. típus). Az alábbiakban a vizsgált agyterületek kerülnek részletes bemutatásra.

Cortex cerebri. A kortikális neuroepitheliumot kizárólag az E19 életkorban vizsgáltuk (4.-6. ábra). A három CaM gén expressziója ekkor feltűnő különbségeket mutatott. A CaM II gén esetében közepes expressziót (109,5%) mértünk, míg a CaM I (43,9%) és III (75,9%) gének csak gyengén fejeződtek ki (7. A ábra).

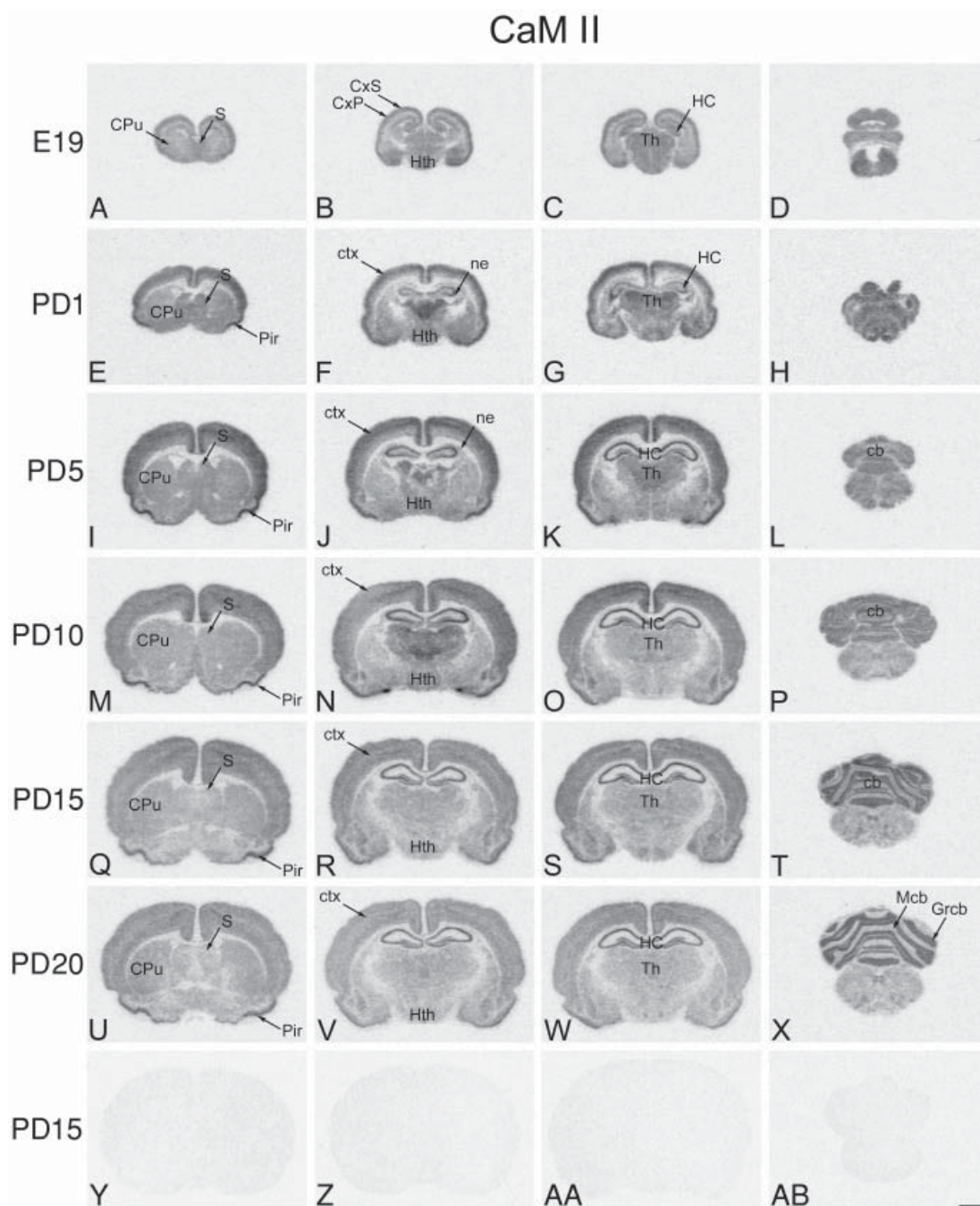
A nagyagykéreg 2.-6. rétegében közepes erősségű, I.-es típusú expressziót detektáltunk. A szignálértékek folyamatosan növekedtek PD5-ig, ahol elérték maximumukat (CaM I: 172,7%, II: 199,4%, III: 188,6%). Az ezt követő csökkenés PD20-ra hasonló expressziós intenzitást eredményez, mint ami E19-ben mérhető. A stratum moleculare-ban (1. réteg) mérhető jel jóval gyengébbnek bizonyult a többi rétegénél. Az itt tapasztalt, II. típusú profil a CaM II esetében PD1-nél (101,3%), a CaM I (47,3%) és III (59,7%) esetében PD5-nél rendelkezett a legerősebb szignálértékekkel. Kiemelendő, hogy amíg a 2.-6. rétegben mért szignálok azonos profilt eredményeztek mindegyik CaM génre vonatkoztatva, addig az 1. réteg génspecifikus profillal jellemezhető. A csúcserőértékét követően a CaM I gén esetében csak viszonylag lassan csökkent a jel erőssége, PD20-on még mindig megtartottan



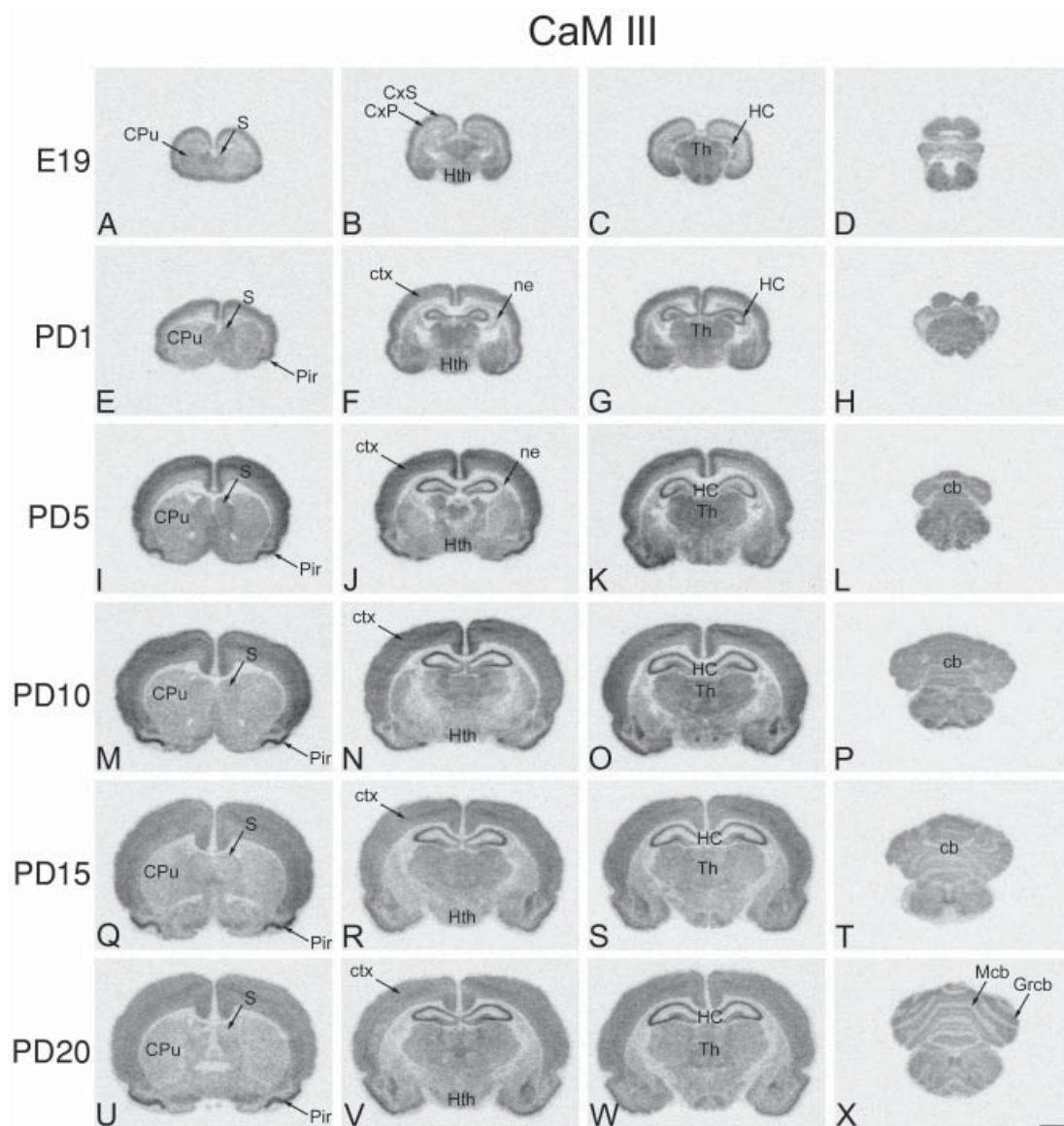
4. ábra Az autoradiogramok a CaM I mRNS eloszlását mutatják fejlődő patkány agyban. Különböző életkorból származó (A-D: E19; E-H: PD1; I-L: PD5; M-P: PD10; Q-T: PD15; U-X: PD20) metszeteket hibridizáltunk CaM I génre specifikus [^{35}S]cRNS próbákkal. Skála: 2 mm. (Forrás: Körtvély és mtsai., 2002)

tekinthető (28,1%). A CaM II és III gének esetében viszont a CaM I-nél magasabb kezdeti szignálértékek rohamosan csökkennek, PD20-on csak az eredeti értékek töredéke mérhető (CaM II: 11,9%, CaM III: 14,7%).

A piriform kéregre erős illetve nagyon erős szignálértékek jellemzőek. Az I. típusú expressziós profil lefutása a 2.-6. rétegekre hasonlít, a CaM I (221,0%) és II (305,3%) PD5-on, a CaM III PD10-on (346,2%) éri el maximumát (7. A ábra).

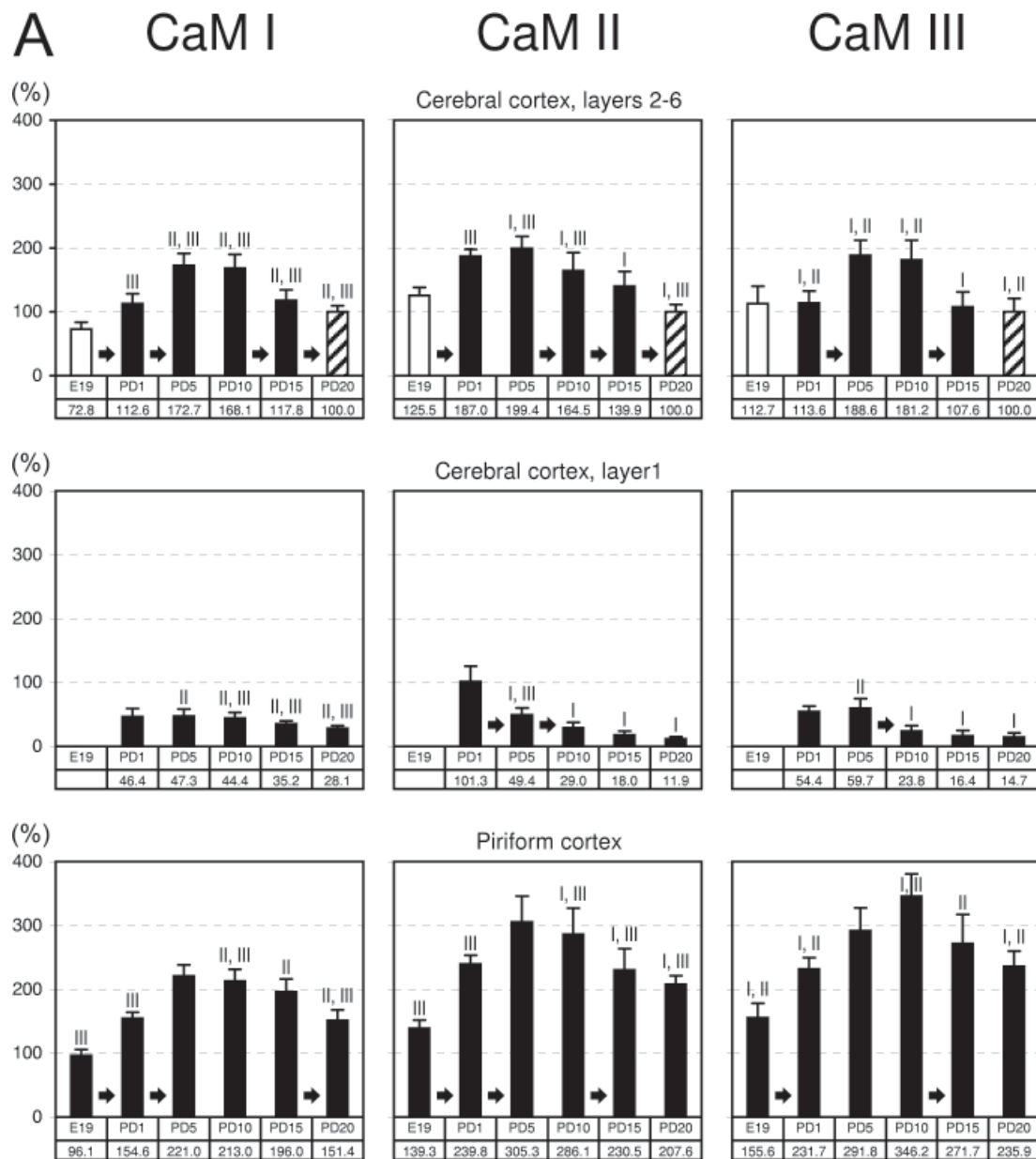


5. ábra Az autoradiogramok a CaM II mRNS eloszlását mutatják fejlődő patkány agyban. Különböző életkorból származó (A-D: E19; E-H: PD1; I-L: PD5; M-P: PD10; Q-T: PD15; U-X: PD20) metszeteket hibridizáltunk CaM I génre specifikus [35 S]cRNS próbákkal. Az Y-AB metszeteket szensz próbával hibridizáltuk. Skála: 2 mm. (Forrás: Körtvély és mtsai., 2002)



6. ábra Az autoradiogramok a CaM III mRNS eloszlását mutatják fejlődő patkány agyban. Különböző életkorból származó (A-D: E19; E-H: PD1; I-L: PD5; M-P: PD10; Q-T: PD15; U-X: PD20) metszeteket hibridizáltunk CaM I génre specifikus [^{35}S]cRNS próbákkal. Skála: 2 mm. (Forrás: Körtvély és mtsai., 2002)

Striatum. Alacsony, I-es típusú expresszió jellemezte ezt a területet a vizsgált életszakaszban (7. C ábra). Az E19-ot (35,3%) követően a CaM I gén expressziója folyamatosan emelkedett PD10-ig (66,9%), majd némileg csökkent a PD20-ra (57,6%). A három CaM gén közül a CaM II mutatta a legerősebb straitális expressziót. A születést követően expressziója a PD5-ig



7. ábra A három CaM génhez rendelhető mRNS szintek összehasonlítása az életkor függvényében. A) nagyagykéreg, B) hippocampus-gyrus dentatus komplex, C) septum laterale, striatum, thalamus, hypothalamus, D) kisagy. Valamennyi oszlop a nagyagykéregben, PD20 életkorban, az adott génspecifikus próba használatakor mérhető (sávozott oszlop), önkényesen 100 százaléknak tekintett szignálértékekhez viszonyított relatív intenzitást ábrázol. A fehér oszlopok a külső kortikális lemezben mérhető szignált ábrázolják (a felnőttkori agykérgi rétegek legfontosabb előfutára). A szomszédos életkorok közötti nyilak szignifikáns változást jelölnek egy adott génre és területre vonatkoztatva. A római számok szignifikáns különbségeket jelölnek a CaM gének expressziója között egy adott területre és életkorra vonatkoztatva. A részletek megtalálhatók az Anyagok és módszerek fejezetben.

(Forrás: Körtvély és mtsai., 2002)

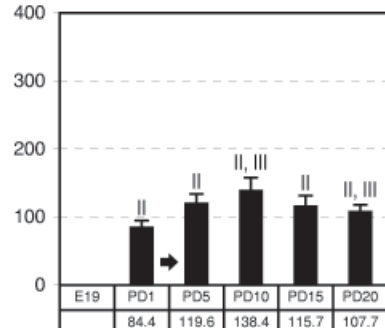
B

CaM I

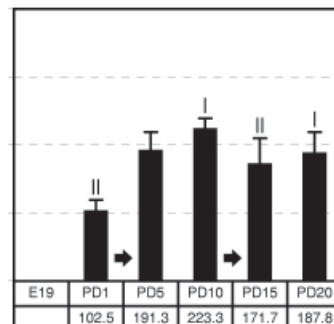
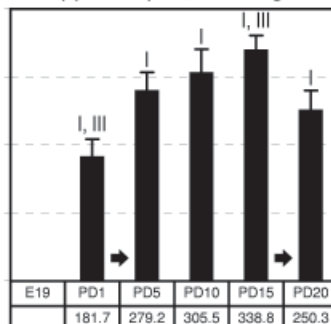
CaM II

CaM III

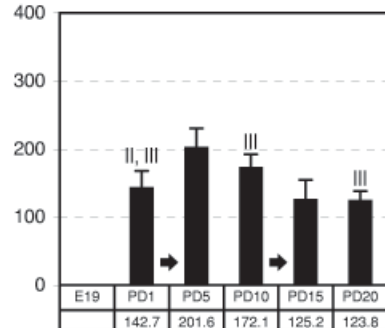
(%)



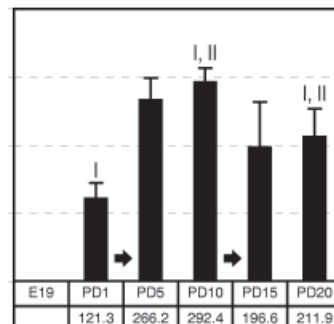
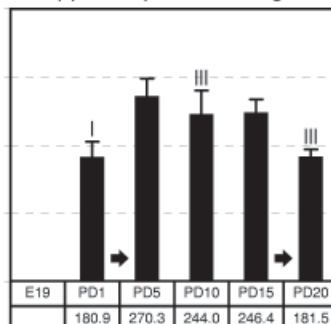
Hippocampus, CA1 region



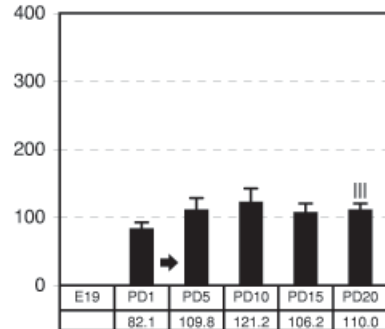
(%)



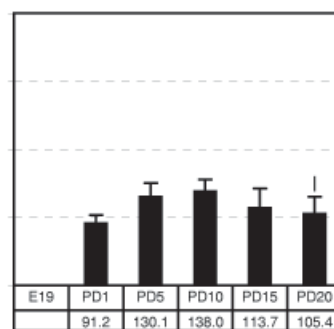
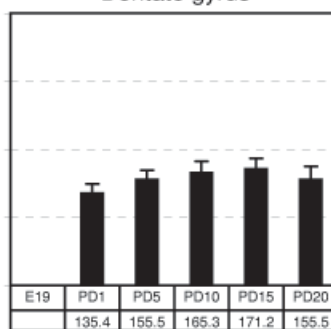
Hippocampus, CA3 region



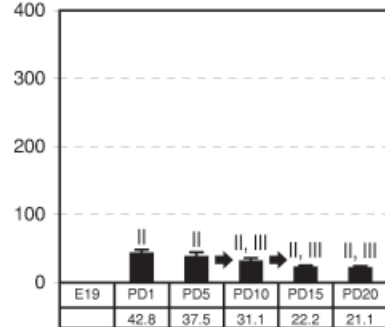
(%)



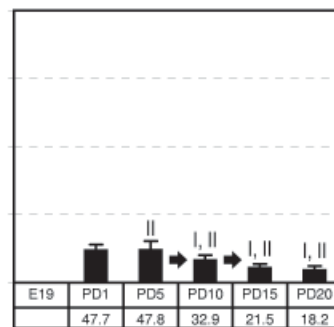
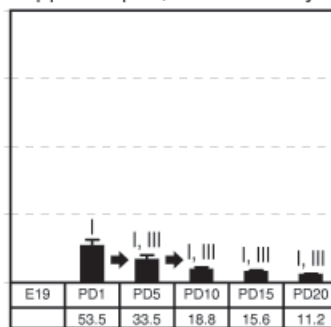
Dentate gyrus

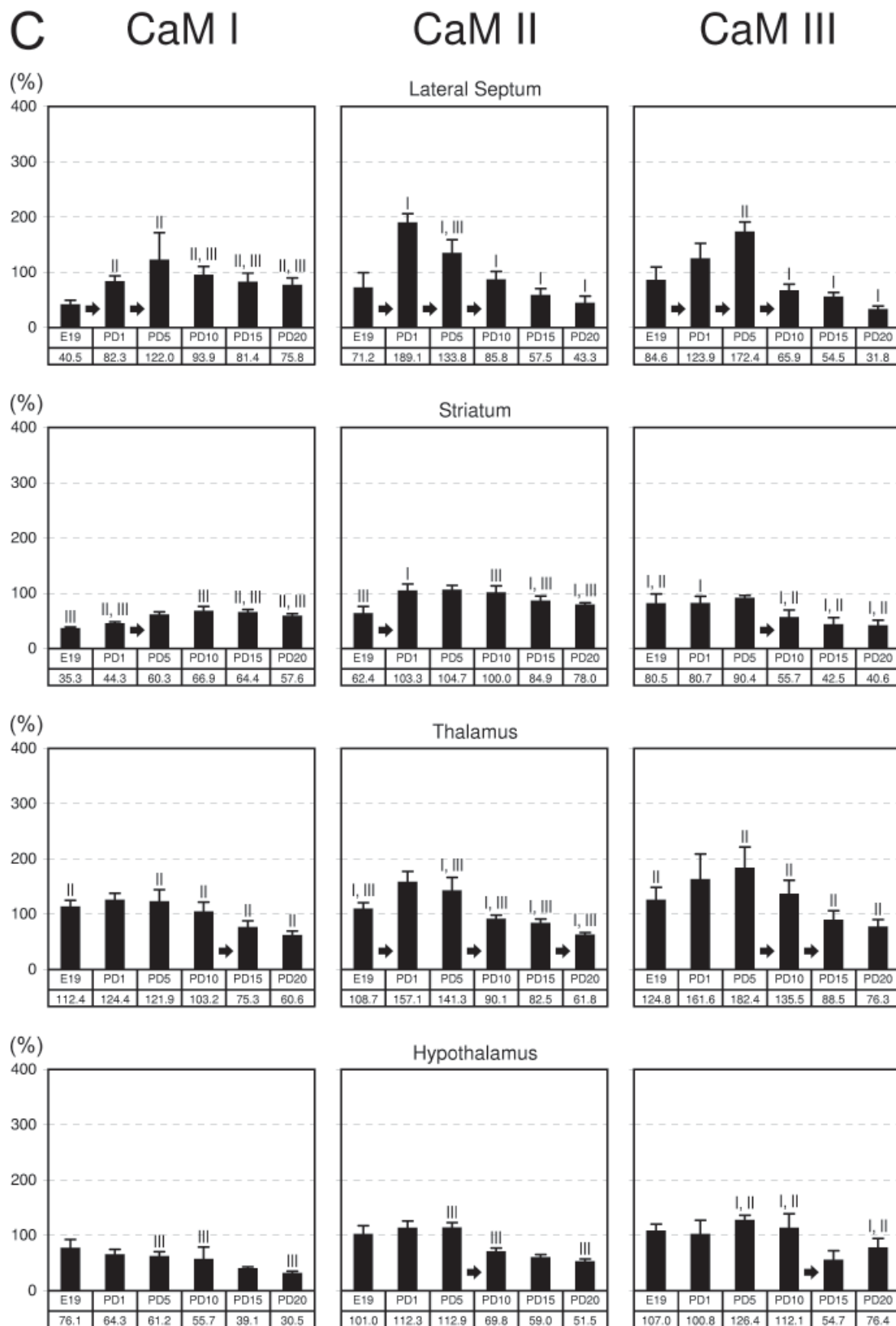


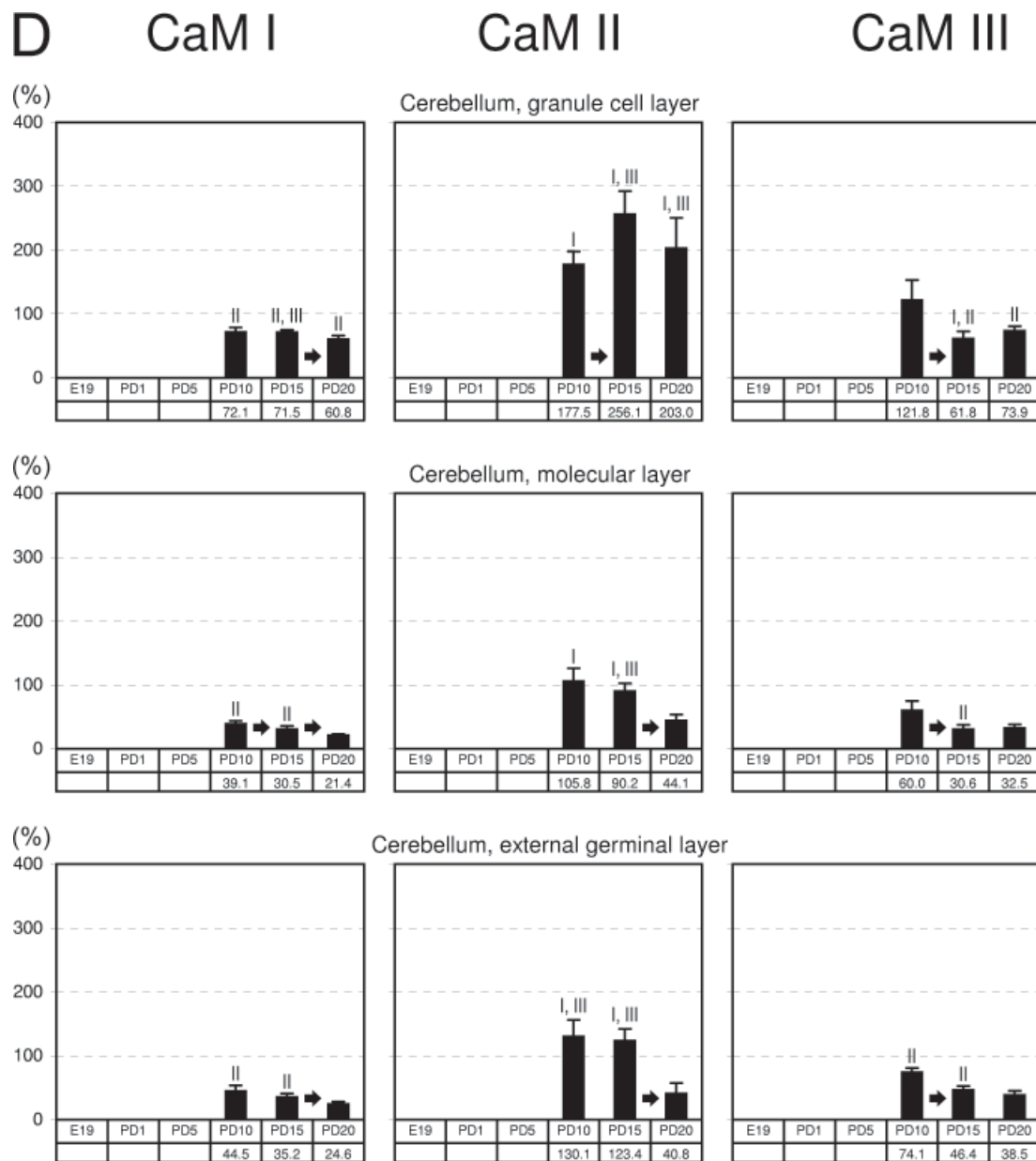
(%)



Hippocampus, molecular layer







(104,7%) emelkedett, majd 78%-ra csökkent a PD20-ra. A CaM III gén expressziójának a szintje alig változott az E19 – PD5 közötti időszakban, ezt követően pedig mintegy 50%-os csökkenést lehetett megfigyelni.

Limbikus területek. Közepestől nagyon erősig terjedő, mindhárom gén esetében hasonló profilú szignálintenzitások jellemezték a hippocampus-gyrus dentatus komplex sejtesteket tartalmazó rétegét (7. B ábra). A CA1-es szubrégió piramisisejtes rétegében például PD10-ig

(CaM I, 138,4%; CaM III, 223,3%), illetve PD15-ig emelkedett a mérhető jel erőssége, majd a csúcsot enyhe fokú csökkenés követte valamennyi esetben. A CA1-es és a CA3-as szubrégió piramissejteket tartalmazó rétegét összevetve megállapítható, hogy a CaM I és II esetében a CA3 sejtei korábban érik el a maximális szignálértéket, mint a CA1 sejtei. A CaM III esetében mindkét szubrégióban PD10-on mérhető a legerősebb szignál. Átlagok tekintetében a CaM I-re vonatkoztatva 35%-kal, a CaM III-ra vonatkoztatva 20%-kal magasabb szignálértékek jellemezték a CA3 szubrégiót, mint a CA1-et, ugyanakkor a CaM II génre vonatkoztatott átlag a CA1 szubrégió esetében volt magasabb, mintegy 20%-kal.

Noha a hippocampus molekuláris rétegében csak alacsony szignálértékek mérhetők, a nagyagykéreg molekuláris rétegéhez hasonló trendet lehetett megfigyelni ezen a területen is (7. B ábra). A II. típusú expressziós profil legmagasabb értékét a legkorábban vizsgálható életkorban (PD1) lehetett mérni, amelyet később jelentős mértékű csökkenés követett. A PD20-on mérhető jelerősség egyértelműen a CaM I gén esetében volt a legnagyobb (21,1%). A gyrus dentatusban, mindhárom CaM génre vonatkoztatva, egy viszonylag állandó, közepes erősségű, I-es típusú expressziót lehetett detektálni (7. B ábra). A septum laterale esetében azonban az expresszió erőssége nagyban függött az életkortól, és jelentős, génspecifikus különbségeket mutatott. A CaM II gén esetében például a legmagasabb szignálértéket (189,1%) a PD1-on lehetett mérni, így ez a profil a II. típusra hasonlít (7. C ábra).

Thalamus. A thalamicus magvak gyenge vagy közepes, I. típusú expresszióval jellemezhetők (7. C. ábra). A legerősebb szignálokat a PD1-on (CaM I: 124,4%; CaM II: 157,1%) illetve a PD5-on (CaM III: 182,4%) lehetett rögzíteni. Valamennyi expressziós profil erős aszimmetriát mutatott, a szignálértékek a korábbi életkorokban magasabbak, a későbbiekben alacsonyabbak voltak.

Hypothalamus. Ezt az agyterületet gyengétől közepes erősségig terjedő szignálok jellemezték (7. C ábra). A három CaM gén eltérő expressziós profilt mutatott. A CaM I gén II. típusú profilja az E19-on 76,1%-os értékkel rendelkezett. A CaM II gén I. típusú profilja PD5-on érte el maximumát. A csúcs előtti értékek magasabbak, mint a csúcsot követők, így az illeszthető görbe erősen aszimmetrikus. A CaM III gén esetében a mért értékek nem követtek

semmilyen nyilvánvaló trendet (III. típusú profil).

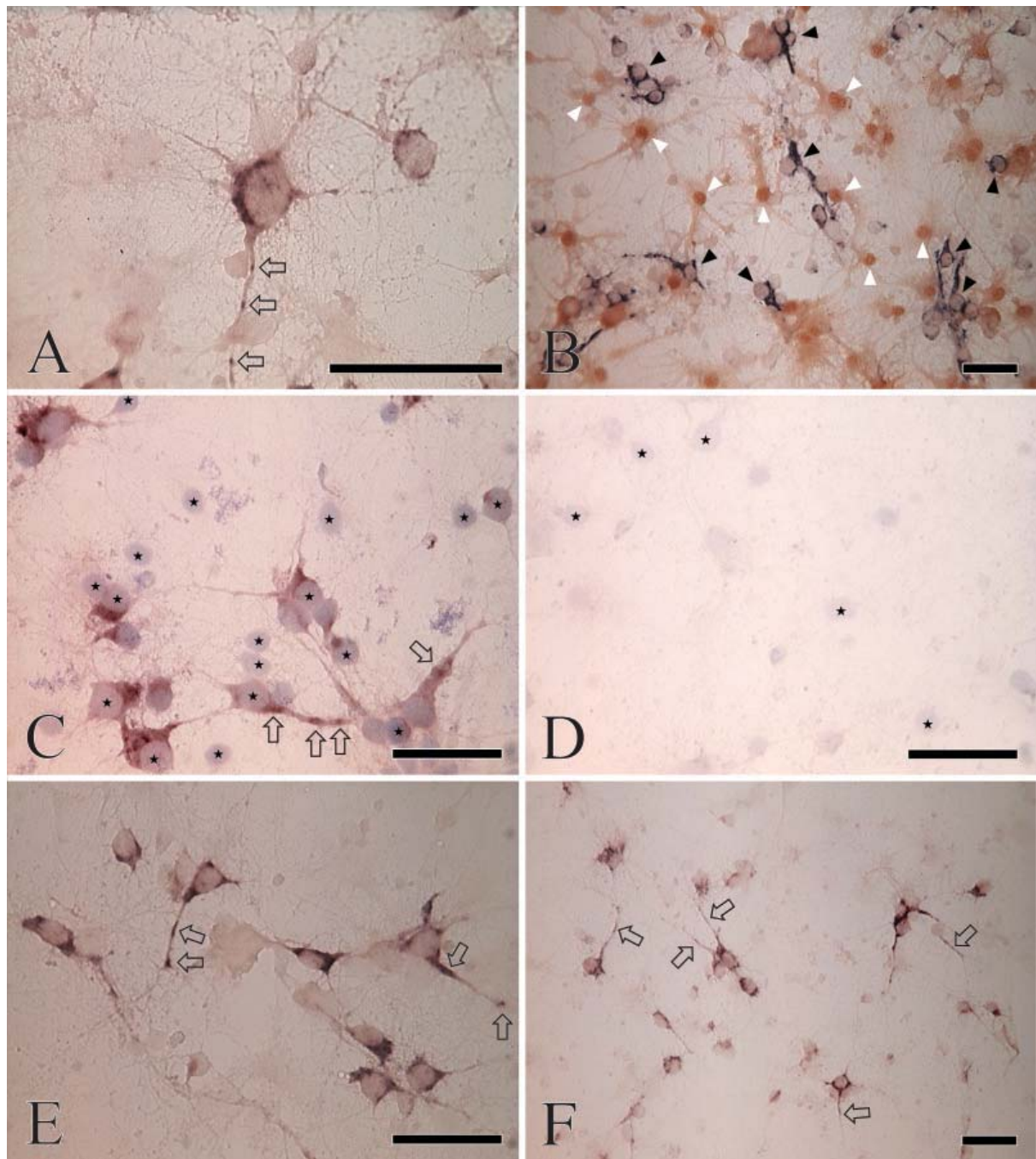
Cerebellum. A cerebellum viszonylag késői kifejlődésének következtében a kérgi rész rétegeinek elkülönítése megvalósíthatatlan E19 és PD5 között. PD10-on a CaM I és III gén viszonylag gyenge expressziót mutatott a szemcses sejtek rétegében. Ezzel éles ellentétben, a CaM II mRNS-ek aránya igen jelentős volt ebben a rétegben és életkorban. Összehasonlításképpen a CaM I, II és III génekre jellemző csúcserőterek rendre 72,1%-nak (PD10-on), 256,1%-nak (PD15-on) és 121,8%-nak (PD10-on) adódtak (7. D ábra).

Fehérállomány. A CaM gének expressziója egyértelműen dominált a szürkeállományban. A főként axonokat és gliasejteket tartalmazó fehérállományban mért jel erőssége alig tért el a háttér szintjétől.

A CaM gének kifejeződése primer hippocampalis sejt kultúrában

Génspecifikus ribopróbák használatával megvizsgáltuk a CaM I, II és III génekhez rendelhető mRNS-ek sejten belüli eloszlását patkány hippocampusából készített primer kultúrákban. A tenyésztett sejtek többsége jelentős mértékben kifejezte mindhárom CaM gént, míg a fennmaradó sejtek gyakorlatilag nem jelölődtek (8. ábra). A jelölt/nemjelölt sejtek aránya azonos volt a három CaM gén esetében. Intenzív jelölődést lehetett megfigyelni a teljes citoplazmában, ugyanakkor a sejtmag nem festődött. A dendritok, beleértve disztális szegmensüket, szintén erősen jelölődtek, valamennyi CaM próba esetén. A dendritikus jel erőssége hasonló volt a citoplazmatikuséhoz. Nagyobb nagyításon a hibridizációs szignál jellegzetesen rögzös megjelenésű volt. A szensz próbával végzett hibridizációt követően csak nagyon gyenge háttérfestődést tapasztaltunk.

Az immuncitokémia és az *in situ* hibridizációs módszerek együttes alkalmazása igazolta azt a feltételezést, miszerint az S100 gliális markerrel jelölt sejtek azok, amelyekben csak nagyon csekély CaM expresszió mutatható ki (8. ábra). Az S100 immunpozitív és a CaM-ot erősen kifejező sejtek halmaza egymást kölcsönösen kizárja, azaz a CaM expresszáló sejtek S100 negatívnak bizonyultak. Mindezek mellett egy harmadik sejtpopuláció is körülhatárolható, amelyekben nem mutatható ki sem az S100 fehérje, sem a CaM mRNS-ek.



8. ábra A CaM mRNS megoszlása primer hippocampális tenyészetben. Színes *in situ* hibridizációt végeztünk CaM I (A, B), CaM II (C) és CaM III (E, F) génekre specifikus dig-jelölt ribopróbákkal. A szensz próbával végzett hibridizáció (D) nem jelölte a sejteket. Egyes preparátumokat (C, D) hematoxilinnal festettük felül; a jelölt sejtmagok közül néhányon csillag látható. Az A, C, E és F részleten látható nyilak a dendritek lefutásában megfigyelhető pontszerű festődésre mutatnak. A B részleten lévő tenyészet sejtjein S100 specifikus immunhisztokémiát is végeztünk (barna festődés, Várszegi Szilvia munkája). Itt a fehér nyílhegyek S100 immunpozitív, a feketék CaM I mRNS pozitív sejtekre mutatnak. Kiemelendő, hogy nincsenek kettősen jelölt sejtek. Skála: 50 μ m. (Forrás: Körtvély és mtsai., 2003)

MEGBESZÉLÉS

A CaM gének és cDNS-ek számítógépes nukleinsavsorrend-vizsgálata

Számítógépes vizsgálataink során számos, a CaM gének kifejeződését feltételezhetően befolyásolni képes szabályozóelemet azonosítottunk e gének mRNS-eiben, amelyek az alábbi – egymással átfedő – csoportokba sorolhatók: 1) nukleáris poliadenilációt irányító szignálok, 2) citoplazmatikus poliadenilációt érintő elemek, 3) lokalizációs szignálok, 4) a stabilitást befolyásoló faktorok, 5) transzlációt szabályozó elemek.

A tandem elhelyezkedésű, többszörös poliadenilációs szignálok differenciált használata a CaM I és III gén esetében egyszerű lehetőséget teremtenek arra, hogy bizonyos szabályozó elemek bekerüljenek az érett transzkriptumba. Különösen feltűnő a CaM I gén 4,2 kb-os transzkriptumának 3'-végén csoportosuló ARE, amelyek csak a disztális poliadenilációs szignálok használata esetén válhat a mRNS részévé.

A CPE-k egységesen megtalálhatók valamennyi, 1,0 kb-nál hosszabb CaM transzkriptumban. Ez az elem a dendritikus lokalizáció meghatározója is lehet, ami magyarázhatja azt az elsőként munkacsoportunk által leírt jelenséget, hogy valamennyi CaM gén rendelkezik a dendritekbe irányított transzkriptummal. Ugyanakkor a citoplazmatikus poliadeniláció előfeltétele lehet egy poli(A) farokkal nem rendelkező mRNS transzlációjának. Ezen a módon tehát meggátolható a szállítás alatt álló transzkriptum riboszómákhoz kötődése.

A CPE-k mellett a 4,2 kb-os és az 1,7 kb-os CaM transzkriptumban fellelhető egy olyan régió, amely nagyfokú hasonlóságot mutat más mRNS-ekben bizonyítottan funkcionáló lokalizációs szignállal. Kísérletes adatok hiányában ennek az elemnek az élettani jelentősége nem ítéltető meg. Az intracelluláris szállítás útvonalának meghatározóiként az ARE-k szerepe is ismert más transzkriptumokban.

Az ARE-k sűrű előfordulását korábban egyértelműen a mRNS rövid fél-életidejével hozták összefüggésbe (Tebo és mtsai., 2003). Azoknak a géneknek az mRNS-ei, amelyek

fehérjetermékeinek csak impulzusszerűen kell megjelennie a citoplazmában, különösen gyakran tartalmazzák ezeket az elemeket. Az utóbbi években számos, az ARE-hez kötődő transz-ható faktort azonosítottak (Brennan és Steitz, 2001; Gorospe 2003). Ezek közé tartozik többek között az ELAV/Hu vagy az AUF1 fehérjecsald számos tagja. Utóbbiak megkötődése valóban a mRNS gyors elbontását idézi elő, az ELAV/Hu család tagjai azonban éppen stabilizálni képesek a transzkriptumot. Így egyetlen mRNS sorsa nagyon különböző lehet sejttípusonként, attól függően, hogy az adott sejt a transz-ható faktorok milyen készletével rendelkezik. Szintén ARE-k felismerését végzi el a transzport részecskékben azonosított FMRP is (Denman, 2003). A 2,3 kb-os és az 1,9 kb-os CaM III mRNS-ekben található, guaninban és uridinben gazdag szabályozóelem jelentősen megnövelheti élettartamukat. Ugyanakkor a DICE-k funkcionalitása megkérdőjelezhető, mivel a kísérletekkel is alátámasztott esetekben ezek az elemek szorosan egymás mellett, tulajdonképpen átfedésben helyezkedtek el (Ostareck és mtsai., 2001). Összegezve megállapítható, hogy a számítógépes analízis alapján a CaM I mRNS feltételezhetően rövid, míg a CaM III mRNS hosszú fél-életidővel rendelkezik. A CaM I esetében ezt a feltételezést kísérleti eredmények is alátámasztják. Az IMR-32 neuroblastoma sejt vonal sejtjeinek differenciálódásakor a 4,2 kb-os CaM I mRNS mennyisége szelektív módon megnő, és ez a változás nem a fokozott génexpresszióval, hanem a mRNS stabilitásának megnövekedésével hozható összefüggésbe (Toutenhoofd és Strehler, 2002).

Az IRES előfordulása a CaM I transzkriptumokban nem meglepő, figyelembe véve az ezen mRNS-ek dendritikus transzlációját alátámasztó bizonyítékok számát. Több, dendritikusan elhelyezkedő mRNS esetében már igazolták ennek a szabályozóelemnek a működését (Pinkstaff és mtsai., 2001). Mivel a CaM II mRNS-ben az IRES a kódoló régiót követően, közvetlenül a poli(A) farok előtt helyezkedik el, jelen ismereteink szerint ebben az esetben nem szolgálhatja az alternatív transzlációt. Az elem méretéből és szerkezetéből adódóan a véletlen előfordulás esélye nagyon alacsony. Nem zárható ki, hogy hasonlóan más elemekhez, az IRES is rendelkezik a transzlációt elindító funkciója mellett más, ma még nem ismert szerepekkel.

A CaM gének kifejeződése a fejlődő patkányagyban

A CaM génexpresszió ontogenetikus vizsgálatának céljából kvantitatív *in situ* hibridizációt végeztünk, amely 15 agyterületre és 6 életkorra terjedt ki. A munkacsoportunk által korábban végzett, felnőtt állatok 70 agyterületét magábanfoglaló hasonló kísérletek számos eltérést mutattak a CaM gének kifejeződésének tekintetében (Palfi és mtsai., 1999). Ebből a 70 agyterületből választottuk ki azt a 15-öt, amelyek már a késői embrionális kortól alkalmasak a vizsgálatra. Vizsgálataink azt mutatták, hogy valamennyi CaM gén intenzíven működik a korai posztnatális életszakaszban. A génexpressziós profilok meghatározásában nyilvánvaló szerepet játszik a CaM gének egyedfejlődés-függő szabályozása. Ugyanakkor az idegrendszer sejtszámának változása, e sejtek vándorlása önmagában is alapvetően befolyásolhatja egy területen kimutatható mRNS mennyiségét.

Az időbeni szignálérés-változások jellemzésére mesterséges kategóriákat állítottunk fel. Egy adott agyterület esetében általában ugyanolyan expressziós profilt mutatott valamennyi CaM gén, míg az eltérő agyterületek profiljai jelentősen különbözhetnek. A régióon belüli azonos lefutású profilok esetében is gyakran előfordult, hogy a szignálintenzitások eltértek egymástól.

Míg a CaM gének expressziójának korábbi, elsősorban minőségi vizsgálatai leginkább csak a hasonlóságok feltárására voltak alkalmasak, addig az általunk használt mennyiségi analízis számos különbséget mutatott ki. Kiszámítva például a nagyagykéreg molekuláris rétegében valamennyi CaM génre vonatkoztatva a legnagyobb és a legkisebb szignálértékekből képzett hányadost, látható, hogy a CaM II gén expressziója nyolcadrészére csökkent PD1 és PD20 között. A CaM III esetében négyszeres, a CaM I esetében pedig mindössze 1,7-szeres csökkenés tapasztalható ugyanezen a területen és ugyanezen életkorok között. Ugyanígy a CaM II gén expressziója csökkent a legerősebben és a CaM I géné őrződött meg a legnagyobb mértékben a hippocampus molekuláris rétegében. A szomszédos életkorok szignálértékeiből képzett hányados pedig az expresszió változásának sebességére utal. Ez az érték a CaM III gén esetében volt a legmagasabb. Általánosságban megállapítható, hogy a fiatalabb életkorokban a későbbiekénél gyorsabb változások voltak mérhetők.

Noha a CaM gének expressziója intenzíven kutatott terület, ontogenezisükkel csak

kevesen foglalkoztak. A korábbi tanulmányok elsősorban a CaM fehérje agyon belüli megoszlását írták le fejlődő patkány agyában és újszülöttekben. Caceres és mtsai. (1983) például a fejlődő agyban vizsgálták a CaM fehérje eloszlását, elsősorban a cerebellumban. Seto-Oshima és mtsai. (1984) pedig korán megjelenő CaM immunpozitivitást talált az agytörzsben és a cerebellaris magvakban, amit csak késve követett a cerebralis és cerebellaris cortex, valamint a hippocampus. Ugyanakkor a korai egyedfejlődés alatt jelenlévő legfőbb osztódási zónákban nem detektált immunreaktív sejteket. A hivatkozott szerzők eredményeit összevetve a sajátjainkkal megállapítható, hogy a CaM gének transzkripciója számos agyterületen jelentősen megelőzi transzlációjukat. Mivel a sokféle CaM mRNS egyazon fehérjét kódol, technikailag nagyon nehéz megközelíteni a transzláció génfüggő szabályozásának kérdését. Módszertani különbségek miatt (próbák specifitása, a mennyiségi vizsgálat kivitelezése) csak fenntartásokkal interpretálhatók Cimino és mtsai. (1990) eredményei, amelyet CaM-specifikus (de nem génspecifikus) próba használatával kaptak. Megállapításaik szerint a CaM expresszió a születést követően PD8-ig nő az agyban, majd csökken. Ez az eredmény egybevág sajátjainkkal, mivel a CaM-ot legnagyobb mennyiségben tartalmazó agyterületekben (piriform kéreg, hippocampus) mi is PD10 körül mértük a legmagasabb szignálértékeket. Hasonlóan egybevágunk eredményeink a thalamicus és striatalis területeket illetően. A cerebellumban Cimino és mtsai. (1990) növekvő génexpressziót állapítottak meg PD1 és PD32 között. Saját vizsgálataink ennél lényegesen összetettebb képet mutatnak, amelyet rendkívül ingadozó expressziós aktivitás jellemez. Ez a terület patkányban jelentős posztnatális fejlődésen megy keresztül, ami magyarázatul szolgálhat a megfigyelt fluktuációra.

Különösen fontos lenne annak vizsgálata, hogy vajon a CaM elsődleges célfehérjéit kódoló gének expressziós aktivitása egybeesik-e a CaM génekével. Polli és mtsai. (1990) megvizsgálták a CaM-kötő fehérjék expressziós változását az egyedfejlődés során. Eszerint a hippocampusban jelennek meg elsőként CaM-kötő fehérjék (PD5), majd a cerebralis cortexben, a striatumban, és legvégül a cerebellumban. Ráadásul a fejlődő cerebellum által kifejezett CaM-kötő fehérjék különböztek az agy többi területén találhatóiktól. Saját eredményeink szerint az agykéregben és a hippocampusban PD5 és PD10 között mérhető a CaM gének expresszió, azaz a CaM és a fő CaM-kötő fehérjék egyidejűleg fejeződnek ki.

Leszűkítve a CaM-kötő fehérjék halmazát, a CaM kiemelkedő jelentőségű célfehérjéjét, a Ca^{2+} /CaM-függő kináz II-t illetően önálló vizsgálati eredmények is ismertek. Eszerint ennek a több alegységből álló kináznak az alegységeit kódoló gének az egyedfejlődés alatt eltérő módon szabályozottak (Burgin és mtsai., 1990; Bayer és mtsai., 1999).

A molekuláris rétegekben található CaM I mRNS-ről korábban kimutatták, hogy corticalis, hippocampalis és Purkinje-sejtekhez tartozó apikális dendritekben helyezkednek el PD5 és PD20 között (Berry és Brown, 1996). A CaM I és II mRNS szintén megtalálható PC12 sejtek sejtestájában valamint nyúlványaiban, míg a CaM III mRNS itt kizárólag perinukleáris elhelyezkedést mutatott (Zhang és mtsai., 1993). Felnőtt agy molekuláris rétegeiben munkacsoportunk korábban már kimutatta CaM mRNS-ek jelenlétét (Palfi és mtsai., 1999). Ezeken a területeken a CaM I mRNS-ekből található a legnagyobb mennyiség, majd a CaM III, végül a CaM II génhez rendelhető mRNS-ek következnek. Mivel a hivatkozott munkákban a CaM mRNS-eket közvetlenül a dendritekben azonosították, ezért feltételezhetjük, hogy az általunk a molekuláris rétegekben mérhető jel szintén dendritikus CaM mRNS-ekből származik. A fejlődő agyban végzett vizsgálatok szintén alátámasztják a CaM mRNS-ek kollektív dendritikus transzportját. Utóbbi esetben, a legkorábbi mért életkorban a CaM II génhez tartozó mRNS-ek fordultak elő a legnagyobb mennyiségben, ezt követte a CaM III, majd a CaM I gén. Ugyanakkor, míg a CaM II és a CaM III mRNS-ek mennyisége meredeken csökkent az életkor előrehaladtával, a CaM I mRNS-ek esetében sokkal inkább megőrződött a dendritikus elhelyezkedés. Kiemelendő, hogy valamennyi CaM génre vonatkoztatva a legutolsó mért életkorban is messze meghaladta a háttér a molekuláris rétegekben mérhető szignál.

A CaM fehérje számos alapvető idegrendszeri folyamat résztvevője. Mivel a többszörös CaM gének a gerinces törzsfa minden ágán megmaradtak, nagyon valószínű, hogy valamennyien rendelkeznek önálló, génspecifikus funkcióval. Az egyes CaM gének eltérő szabályozása biztosítja, hogy térben és időben mindig a megfelelő mennyiségű CaM fehérje álljon valamennyi szubcelluláris domain rendelkezésére. A sejtestől távoli mikrodomainek, mint amilyenek például a posztzinaptikus zónák, CaM szükségletét a célzott, dendritekbe irányuló mRNS transzportot követő lokális transzláció elégítheti ki. A többszörös CaM gének létezésének másik indoka lehet az egyedfejlődés alatti eltérő kifejeződésük, ami

alapvető jelentőségű lehet olyan idegrendszeri folyamatokban, mint a sejtjárási, érési, elköteleződési és az idegi hálózatok kialakítása.

A CaM gén kifejeződése primer hippocampalis sejt kultúrában

Mint ahogy az már az előzőekben szerepelt, a CaM fehérje számos fiziológiai folyamat résztvevője. Bonyolult mechanizmusok szabályozzák a célfehérjék számára aktuálisan elérhető CaM készlet mennyiségét, valamint a mikrodomáinokban zajló, *de novo* CaM protein szintézist. Az utóbbi, a lokális CaM szintet meghatározó folyamat előfeltétele a CaM mRNS-ek irányított intracelluláris szállítása. Ugyanakkor a CaM mRNS-ek dendritbe történő szállítására csak kevés közvetlen bizonyítékkal rendelkezünk. Berry és Brown színes *in situ* hibridizációs módszerekkel kimutatta, hogy a CaM I mRNS-ek a korai posztnatális életszakaszban jelen vannak a piramis és Purkinje sejtek apikális dendritjeiben (1995; 1996). Ezt leszámítva, minden egyéb kísérlet tenyésztett perifériás idegsejteket és/vagy radioaktívan jelölt próbákat használt (Zhang és mtsai., 1993; Palfi és mtsai., 1999; Kortvely és mtsai., 2002). A radioaktív próbákat használó módszer – természetéből adódóan – csak közvetett adatokat szolgáltat a jel intracelluláris forrásának helyéről. Saját kísérleteinkben a CaM génekre specifikus, nemradioaktív *in situ* hibridizációt végeztünk primer hippocampalis kultúrákon. Ezt a kísérleti rendszert az alábbi szempontok figyelembevételével választottuk: 1) a primer kultúrák a központi idegrendszer *in vivo* viszonyait jobban megközelítik, mint az immortalizált sejt vonalak, 2) az idegsejtek *in vivo* jellegzetességei közül számos megőrződik (polaritás, dendrit, axon jelenléte, szinapszisok kialakulása), 3) mivel a sejtek egyetlen rétegben helyezkednek el, morfológiájuk jól vizsgálható, 4) noha a tenyésztési körülmények neuronok számára optimalizáltak, emellett gliasejteket (és egyéb sejt típusokat is) tartalmaz, 5) a hippocampus piramissejtjeiről ismert, hogy *in vivo* körülmények között dendritikusan lokalizált CaM I mRNS-ekkel rendelkeznek.

A tenyésztett sejtek többsége intenzíven kifejezte valamennyi CaM gént. Mind a korábbi adatok, mind jelen eredményeink arra utalnak, hogy a CaM gént fokozottan átíró sejtek neuronok (Ikeshima és mtsai., 1993; Palfi és mtsai., 1999; Sola és mtsai., 1999). Ezekben a sejtekben erős dendritikus jelölődést találtunk függetlenül attól, hogy a próba melyik CaM gént specifikus. Ez az első közvetlen bizonyíték arra, hogy a központi

idegrendszer neuronjainak dendritjeiben a CaM I mellett megtalálhatók a CaM II és III génről átírt mRNS-ek is, ráadásul hasonló mennyiségben.

Ezek az eredmények bizonyos szempontból ellentmondanak a korábbi irodalmi adatoknak, amelyeket PC12 sejtek vizsgálatából származnak. Ezekben a sejtekben csak a CaM I és II mRNS-ek jelenlétét igazolták a nyúlványokban (a sejttest mellett), míg a CaM III mRNS-t kizárólag a sejttestben detektálták (Zhang és mtsai., 1993). Az eltérést magyarázhatja, hogy a PC12 sejtek perifériás neuronok származékai, amelyek jelentősen különböznek a központi idegrendszer neuronjaitól. Munkacsoportunk korábbi radioaktív *in situ* hibridizációs vizsgálatai jelentős mennyiségű mRNS-t mutattak ki mind a fejlődő, mind a kifejezett agy elsősorban dendriteket tartalmazó régióiban, valamennyi CaM gén esetében (Palfi és Gulya, 1999; Kortvely és mtsai., 2002). Valamennyi adatot összevéve, nagyon valószínű, hogy számos, különböző génekhez rendelhető CaM transzkriptum alanya a dendritbe irányuló mRNS szállításnak, ahol részesei lehetnek a szinaptikus aktivitás-függő, helyben megvalósuló transzlációnak. Emellett kimutattuk, hogy a CaM mRNS-ek szemcséket formálnak a nyúlványokban, ami minden valószínűség szerint megfeleltethető a mások által leírt transzport egységeknek (Crino és Eberwine, 1996; Mohr és Richter, 2001).

Annak bizonyítására, hogy a magas CaM-tartalmú sejtek neuronok, míg a fennmaradó sejtek főként gliasejtek, az *in situ* hibridizációt követően gliaspecifikus immunhisztokémiát végeztünk.

Eredményeinket összegezve megállapítható, hogy mind az *in silico*, mind az *in vivo* vizsgálataink jelentős eltéréseket tártak fel a három CaM gén esetében. *In vitro* vizsgálataink ugyanakkor mindhárom CaM gén esetében igazolták a dendritikus mRNS transzport meglétét, amelyet korábban csak a CaM I transzkriptumokról írtak le.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- Agell N, Aligue R, Alemany V, Castro A, Jaime M, Pujol MJ, Rius E, Serratosa J, Taules M, Bachs O (1998) New nuclear functions for calmodulin. *Cell Calcium* 23:115-121.
- Augustine GJ, Santamaria F, Tanaka K (2003) Local calcium signaling in neurons. *Neuron* 40:331-346.
- Bachs O, Agell N, Carafoli E (1994) Calmodulin and calmodulin-binding proteins in the nucleus. *Cell Calcium* 16:289-296.
- Bai G, Weiss B (1991) The increase of calmodulin in PC12 cells induced by NGF is caused by differential expression of multiple mRNAs for calmodulin. *Journal of Cellular Physiology* 149:414-421.
- Bai G, Nichols RA, Weiss B (1992) Cyclic AMP selectively up-regulates calmodulin genes I and II in PC12 cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1130:189-196.
- Bakheet T, Williams BR, Khabar KS (2003) ARED 2.0: an update of AU-rich element mRNA database. *Nucleic Acids Research* 31:421-423.
- Barron S, Tusell JM, Serratosa J (1995) Effect of hexachlorocyclohexane isomers on calmodulin mRNA expression in the central nervous system. *Molecular Brain Research* 30:279-286.
- Bayer KU, Lohler J, Schulman H, Harbers K (1999) Developmental expression of the CaM kinase II isoforms: ubiquitous gamma- and delta-CaM kinase II are the early isoforms and most abundant in the developing nervous system. *Molecular Brain Research* 70:147-154.
- Beaudoing E, Gautheret D (2001) Identification of alternate polyadenylation sites and analysis of their tissue distribution using EST data. *Genome Research* 11:1520-1526.
- Beaudoing E, Freier S, Wyatt JR, Claverie JM, Gautheret D (2000) Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Research* 10:1001-1010.
- Benaïm G, Villalobo A (2002) Phosphorylation of calmodulin. Functional implications. *European Journal of Biochemistry* 269:3619-3631.
- Berchtold MW, Egli R, Rhyner JA, Hameister H, Strehler EE (1993) Localization of the human calmodulin genes CALM1, CALM2, and CALM3 to chromosomes 14q-24-q31, 2p21.1-p21.3, and 19q13.2-q13.3. *Genomics* 16:461-465
- Berry F, Brown IR (1995) Developmental expression of calmodulin mRNA and protein in regions of the postnatal rat brain. *Journal of Neuroscience Research* 42:613-622.
- Berry FB, Brown IR (1996) CaM I mRNA is localized to apical dendrites during postnatal development of neurons in the rat brain. *Journal of Neuroscience Research* 43:565-575.
- Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (1997) Ca²⁺-dependent regulation in neuronal gene expression. *Current Opinion in Neurobiology* 7:419-429.

- Brennan CM, Steitz JA (2001) HuR and mRNA stability. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58:266-77.
- Burgin KE, Waxham MN, Rickling S, Westgate SA, Mobley WC, Kelly PT (1990) In situ hybridization histochemistry of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *Journal of Neuroscience* 10:1788-1798.
- Caceres A, Bender P, Snavely L, Rebhun LI, Steward O (1983) Distribution and subcellular localization of calmodulin in adult and developing brain tissue. *Neuroscience* 10:449-461.
- Chin D, Means AR (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor.[erratum appears in *Trends Cell Biol* 2000 Oct;10(10):428]. *Trends in Cell Biology* 10:322-328.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159.
- Chrzanowska-Lightowlers Z, Lightowlers RN (2001) Fending off decay: a combinatorial approach in intact cells for identifying mRNA stability elements. *Rna* 7:435-444.
- Cimino M, Chen JF, Weiss B (1990) Ontogenetic development of calmodulin mRNA in rat brain using in situ hybridization histochemistry. *Brain Research Developmental Brain Research* 54:43-49.
- Crino PB, Eberwine J (1996) Molecular characterization of the dendritic growth cone: regulated mRNA transport and local protein synthesis. *Neuron* 17:1173-1187.
- DeLorenzo RJ (1980) Role of calmodulin in neurotransmitter release and synaptic function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 356:92-109.
- Denman RB (2003) Deja vu all over again: FMRP binds U-rich target mRNAs. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 310:1-7.
- Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392:933-936.
- Gallin WJ, Greenberg ME (1995) Calcium regulation of gene expression in neurons: the mode of entry matters. *Current Opinion in Neurobiology* 5:367-374.
- Gannon MN, McEwen BS (1994) Distribution and regulation of calmodulin mRNAs in rat brain. *Molecular Brain Research* 22:186-192.
- Ghosh A, Greenberg ME (1995) Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268:239-247.
- Gilbert W (1987) The exon theory of genes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 52:901-905.
- Glanzer JG, Eberwine JH (2003) Mechanisms of translational control in dendrites. *Neurobiology of Aging* 24:1105-1111.
- Gorospe M (2003) HuR in the mammalian genotoxic response: post-transcriptional multitasking. *Cell Cycle* 2:412-4.

- Hoefflich KP, Ikura M (2002) Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* 108:739-742.
- Holcik M, Korneluk RG (2000) Functional characterization of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: role of La autoantigen in XIAP translation. *Molecular & Cellular Biology* 20:4648-4657.
- Huang YS, Carson JH, Barbarese E, Richter JD (2003) Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. *Genes & Development* 17:638-653.
- Ikeshima H, Yuasa S, Matsuo K, Kawamura K, Hata J, Takano T (1993) Expression of three nonallelic genes coding calmodulin exhibits similar localization on the central nervous system of adult rats. *Journal of Neuroscience Research* 36:111-119.
- Ikeshima H, Shimoda K, Matsuo K, Hata J, Maejima K, Takano T (1994) Spermatocyte-specific transcription by calmodulin gene II promoter in transgenic mice. *Molecular & Cellular Endocrinology* 99:49-53.
- Jacobs GH, Rackham O, Stockwell PA, Tate W, Brown CM (2002) Transterm: a database of mRNAs and translational control elements. *Nucleic Acids Research* 30:310-311.
- Karkera JD, Friedberg F (1998) Sequence of the human CALM II calmodulin gene promoter region. *Molecular Biology Reports* 25:193-195.
- Kawasaki H, Nakayama S, Kretsinger RH (1998) Classification and evolution of EF-hand proteins. *BioMetals* 11:277-295.
- Kennedy MB (1989) Regulation of neuronal function by calcium. *Trends in Neurosciences* 12:417-420.
- Kloc M, Zearfoss NR, Etkin LD (2002) Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell* 108:533-544.
- Kortvely E, Gulya K (2004) Calmodulin, and various ways to regulate its activity. *Life Sciences* 74:1065-1070.
- Kortvely E, Palfi A, Bakota L, Gulya K (2002) Ontogeny of calmodulin gene expression in rat brain. *Neuroscience* 114:301-316.
- Kortvely E, Varszegi S, Palfi A, Gulya K (2003) Intracellular targeting of calmodulin mRNAs in primary hippocampal cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 51:541-544.
- Kretsinger RH, Nakayama S (1993) Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. IV. Exon shuffling did not determine the domain compositions of EF-hand proteins. *Journal of Molecular Evolution* 36:477-488.
- Legendre M, Gautheret D (2003) Sequence determinants in human polyadenylation site selection. *BMC Genomics* 4:7.
- Luk SC, Ngai SM, Tsui SK, Fung KP, Lee CY, Waye MM (1999) In vivo and in vitro association of 14-3-3 epsilon isoform with calmodulin: implication for signal transduction and cell proliferation. *Journal of Cellular Biochemistry* 73:31-35.

- MacManus JP, Gillen MF, Korczak B, Nojima H (1989) Differential calmodulin gene expression in fetal, adult, and neoplastic tissues of rodents. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 159:278-282.
- Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Mauk MD, Kelly PT, Nicoll RA, Waxham MN (1989) An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* 340:554-557.
- Matsuo K, Sato K, Ikeshima H, Shimoda K, Takano T (1992) Four synonymous genes encode calmodulin in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): conservation of the multigene one-protein principle. *Gene* 119:279-281
- Matsuo K, Ikeshima H, Shimoda K, Umezawa A, Hata J, Maejima K, Nojima H, Takano T (1993) Expression of the rat calmodulin gene II in the central nervous system: a 294-base promoter and 68-base leader segment mediates neuron-specific gene expression in transgenic mice. *Molecular Brain Research* 20:9-20.
- Mayford M, Baranes D, Podsypanina K, Kandel ER (1996) The 3'-untranslated region of CaMKII alpha is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:13250-13255.
- Means AR, VanBerkum MF, Bagchi I, Lu KP, Rasmussen CD (1991) Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacology & Therapeutics* 50:255-270.
- Mohr E, Richter D (2001) Messenger RNA on the move: implications for cell polarity. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33:669-679.
- Moorthy AK, Murthy MR (2001) Conformation and structural transitions in the EF-hands of calmodulin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 19:47-57
- Murtaugh TJ, Wright LS, Siegel FL (1986) Posttranslational modification of calmodulin in rat brain and pituitary. *Journal of Neurochemistry* 47:164-172.
- Nelson MR, Chazin WJ (1998) Structures of EF-hand Ca^{2+} -binding proteins: diversity in the organization, packing and response to Ca^{2+} binding. *BioMetals* 11:297-318.
- Nojima H (1989) Structural organization of multiple rat calmodulin genes. *Journal of Molecular Biology* 208:269-282
- Nowycky MC, Thomas AP (2002) Intracellular calcium signaling. *Journal of Cell Science* 115:3715-3716.
- Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Shatsky IN, Hentze MW (2001) Lipxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell* 104:281-290.
- Palfi A, Gulya K (1999) Water deprivation upregulates the three calmodulin genes in exclusively the supraoptic nucleus of the rat brain. *Molecular Brain Research* 74:111-116.

- Palfi A, Hatvani L, Gulya K (1998) A new quantitative film autoradiographic method of quantifying mRNA transcripts for in situ hybridization. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 46:1141-1149.
- Palfi A, Vizi S, Gulya K (1999) Differential distribution and intracellular targeting of mRNAs corresponding to the three calmodulin genes in rat brain. A quantitative in situ hybridization study. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 47:583-600.
- Palfi A, Kortvely E, Fekete E, Kovacs B, Varszegi S, Gulya K (2002) Differential calmodulin gene expression in the rodent brain. *Life Sciences* 70:2829-2855.
- Palfi A, Simonka JA, Pataricza M, Tekulics P, Lepran I, Papp G, Gulya K (2001) Postischemic calmodulin gene expression in the rat hippocampus. *Life Sciences* 68:2373-2381.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Pesole G, Liuni S, Grillo G, Licciulli F, Mignone F, Gissi C, Saccone C (2002) UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Update 2002. *Nucleic Acids Research* 30:335-340.
- Pinkstaff JK, Chappell SA, Mauro VP, Edelman GM, Krushel LA (2001) Internal initiation of translation of five dendritically localized neuronal mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:2770-2775.
- Polak KA, Edelman AM, Wasley JW, Cohan CS (1991) A novel calmodulin antagonist, CGS 9343B, modulates calcium-dependent changes in neurite outgrowth and growth cone movements. *Journal of Neuroscience* 11:534-542.
- Polli JW, Patanow CM, Billingsley ML (1990) Developmental expression of neuronal calmodulin-binding proteins in rat brain. *Brain Research Developmental Brain Research* 53:62-70.
- Putney JW (1999) *Calcium Signaling*. CRC Press, London, UK
- Pyronnet S, Pradayrol L, Sonenberg N (2000) A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Molecular Cell* 5:607-616.
- Reimann I, Huth A, Thiele H, Thiele BJ (2002) Suppression of 15-lipoxygenase synthesis by hnRNP E1 is dependent on repetitive nature of LOX mRNA 3'-UTR control element DICE. *Journal of Molecular Biology* 315:965-974.
- Rhyner JA, Ottiger M, Wicki R, Greenwood TM, Strehler EE (1994) Structure of the human CALM1 calmodulin gene and identification of two CALM1-related pseudogenes CALM1P1 and CALM1P2. *European Journal of Biochemistry* 225:71-82.
- Richter JD (1999) Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond. *Microbiology & Molecular Biology Reviews* 63:446-456.
- Ross J (1995) mRNA stability in mammalian cells. *Microbiological Reviews* 59:423-450.

- Senterre-Lesenfants S, Alag AS, Sobel ME (1995) Multiple mRNA species are generated by alternate polyadenylation from the human calmodulin-I gene. *Journal of Cellular Biochemistry* 58:445-454
- Seto-Ohshima A, Kitajima S, Sano M, Kato K, Mizutani A (1983) Immunohistochemical localization of calmodulin in mouse brain. *Histochemistry* 79:251-257.
- Seto-Ohshima A, Kitajima S, Sano M, Kato K, Mizutani A (1984) Immunohistochemical appearance of calmodulin in the developing brain: a comparison with neuron specific enolase. *Cell Structure & Function* 9:337-344.
- Shimoda K, Ikeshima H, Matsuo K, Hata J, Maejima K, Takano T (1995) Spatial and temporal regulation of the rat calmodulin gene III directed by a 877-base promoter and 103-base leader segment in the mature and embryonal central nervous system of transgenic mice. *Molecular Brain Research* 31:61-70.
- Skinner TL, Kerns RT, Bender PK (1994) Three different calmodulin-encoding cDNAs isolated by a modified 5'-RACE using degenerate oligodeoxyribonucleotides. *Gene* 151:247-251
- Slaughter GR, Means AR (1989) Analysis of expression of multiple genes encoding calmodulin during spermatogenesis. *Molecular Endocrinology* 3:1569-1578.
- Sola C, Tusell JM, Serratosa J (1996) Comparative study of the pattern of expression of calmodulin messenger RNAs in the mouse brain. *Neuroscience* 75:245-256.
- Sola C, Tusell JM, Serratosa J (1997) Calmodulin is expressed by reactive microglia in the hippocampus of kainic acid-treated mice. *Neuroscience* 81:699-705.
- Sola C, Barron S, Tusell JM, Serratosa J (1999) The Ca²⁺/calmodulin signaling system in the neural response to excitability. Involvement of neuronal and glial cells. *Progress in Neurobiology* 58:207-232.
- Sweitzer TD, Hanover JA (1996) Calmodulin activates nuclear protein import: a link between signal transduction and nuclear transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:14574-14579.
- Tebo J, Der S, Frevel M, Khabar KS, Williams BR, Hamilton TA (2003) Heterogeneity in control of mRNA stability by AU-rich elements. *Journal of Biological Chemistry* 278:12085-12093.
- Thomas AP, Bird GS, Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Putney JW, Jr. (1996) Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB Journal* 10:1505-1517.
- Toutenhoofd SL, Strehler EE (2000) 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* 28:83-96.
- Toutenhoofd SL, Strehler EE (2002) Regulation of calmodulin mRNAs in differentiating human IMR-32 neuroblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1600:95-104.

- Toutenhoofd SL, Foletti D, Wicki R, Rhyner JA, Garcia F, Tolon R, Strehler EE (1998) Characterization of the human CALM2 calmodulin gene and comparison of the transcriptional activity of CALM1, CALM2 and CALM3. *Cell Calcium* 23:323-338.
- Tran QK, Black DJ, Persechini A (2003) Intracellular coupling via limiting calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* 278:24247-24250.
- Vagner S, Galy B, Pyronnet S (2001) Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Reports* 2:893-898.
- Veyrune JL, Campbell GP, Wiseman J, Blanchard JM, Hesketh JE (1996) A localisation signal in the 3' untranslated region of c-myc mRNA targets c-myc mRNA and beta-globin reporter sequences to the perinuclear cytoplasm and cytoskeletal-bound polysomes. *Journal of Cell Science* 109:1185-1194.
- Vizi S, Gulya K (2000) Calculation of maximal hybridization capacity (Hmax) for quantitative in situ hybridization: a case study for multiple calmodulin mRNAs. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 48:893-904.
- Vizi S, Palfi A, Gulya K (2000) Multiple calmodulin genes exhibit systematically differential responses to chronic ethanol treatment and withdrawal in several regions of the rat brain. *Molecular Brain Research* 83:63-71.
- Watterson DM, Sharief F, Vanaman TC (1980) The complete amino acid sequence of the Ca²⁺-dependent modulator protein (calmodulin) of bovine brain. *Journal of Biological Chemistry* 255:962-975.
- West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:11024-11031.
- Wu L, Wells D, Tay J, Mendis D, Abbott MA, Barnitt A, Quinlan E, Heynen A, Fallon JR, Richter JD (1998) CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. *Neuron* 21:1129-1139.
- Xu N, Chen CY, Shyu AB (1997) Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Molecular & Cellular Biology* 17:4611-4621.
- Zhang SP, Natsukari N, Bai G, Nichols RA, Weiss B (1993) Localization of the multiple calmodulin messenger RNAs in differentiated PC12 cells. *Neuroscience* 55:571-582.
- Zhao J, Hyman L, Moore C (1999) Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiology & Molecular Biology Reviews* 63:405-445.
- Zhou LW, Moyer JA, Muth EA, Clark B, Palkovits M, Weiss B (1985) Regional distribution of calmodulin activity in rat brain. *Journal of Neurochemistry* 44:1657-1662.

A PhD ÉRTEKEZÉS ÖSSZEFOGLALÁSA

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

A kalmodulin (CaM) egy erősen konzervált, multifunkciós fehérje, amely valamennyi eukarióta sejtben megtalálható. Változatos célfehérjéin keresztül olyan alapvető sejtélettani folyamatokat szabályoz, mint a sejtosztódás, a differenciálódás, a szignáltranszdukció stb. Különösen nagy mennyiségben van jelen a központi idegrendszerben. Noha egyes gliasejtek számottevő mennyiségű CaM-ot tartalmazhatnak, ebben a szövetben a fehérje zömét neuronok szintetizálják.

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

Az elmúlt évtizedekben jelentős erőfeszítések történtek a CaM gének expressziós mintázatának pontos leírására. Ennek során élettani és kísérletesen módosított körülmények között vizsgálták a CaM gének kifejeződését mind felnőtt, mind újszülött állatokban, illetve *in vitro* rendszerekben is. Ezen vizsgálatok zöme azonban vagy csak minőségi analízist jelentett, vagy csak egy adott CaM génre szűkítette a kísérleteket. Bár a mindenkori CaM fehérje szint precíz térbeli és időbeli szabályozásához minden valószínűség szerint eltérő módon járulnak hozzá a CaM gén család látszólag redundáns tagjai, a beavatkozásokat követő, a génexpressziós intenzitásokban megfigyelhető változások háttere még ma sem ismert. A CaM multigén család élettani szerepének, valamint az egyedi CaM gének kifejeződését szabályozó mechanizmusok jobb megértése céljából különféle vizsgálatokat

végeztünk:

1. *In silico* analízis. Bármilyen génexpresszió-szintű jelenség megértésének előfeltétele az átíró e gének nukleinsav-sorrendjének megismerése. A CaM gének kifejeződését célzó vizsgálatokban jobbra rágesálókát használtak, de ezen fajok esetében nem volt ismert az átírt mRNS-ek teljes bázissorrendje. Éppen ezért első lépésként 3'-RACE módszer használatával meghatároztuk a patkány CaM I gén cDNS-ének hiányzó darabját. Ezt követően, valamennyi, immár teljes hosszúságú CaM cDNS szekvencia felhasználásával cisz-ható szabályozó elemeket kerestünk különböző adatbázisokban (TransTerm, UTRdb). Egyidejűleg jellemeztük a CaM transzkriptumok poliadenilációs szignálhasználatát. Eredményeink azt mutatják, hogy a CaM gének gyakran használnak a szokásostól eltérő szignált. A szövetspecifikus poliadeniláció az egyik lehetséges magyarázata annak, hogy a CaM transzkriptumok egymáshoz viszonyított mennyisége szövetről szövetre más. A másik lehetőség, hogy e transzkriptumok eltérő, szövetspecifikus fél-életidővel rendelkeznek. A CaM I 4,2 kb-os transzkriptumának 3'-nemtranszlálódó régiójában azonosított 13 ARE ez utóbbi lehetőséget támasztja alá. Ezen kívül, egyes ARE-kről igazolták, hogy részt vesznek a mRNS-ek célzott transzportjában; utóbbi jelenséget saját *in vivo* és *in vitro* kísérleteinkben is megfigyeltük. A patkány CaM transzkriptumok, akárcsak humán megfelelőik, számos CPE-t is tartalmaznak, amelyekről ismert, hogy kihatnak a dendritikus transzlációs hatékonyságra, ezáltal a szinaptikus plaszticitásra is. A CPE által megvalósított transzlációs kontroll a poli(A) farok meglététől függ, de létezik ettől független szabályozás is. Utóbbira példa a CaM I és III gének transzkriptumaiban fellelhető DICE; ennek jelenlétekor az ide kötődő transz-ható faktorok akadályozzák meg a fehérjeszintézist. A CaM mRNS-ek azok közé a transzkriptumok közé tartoznak, amelyek szelektíven elszállítód(hat)nak a sejt egy adott mikrodomainjébe. A lokalizációs szignálokhoz ("irányítószámok") szintén transz-ható fehérjék kötődnek, így hozva létre a citoszkeleton mentén szállítható transzport komplexet. Mostanáig csak kevés olyan lokalizációs szignált azonosítottak, amelyek a dendritekbe irányítják az adott mRNS-t. A 4,2 kb-os és az 1,7 kb-os transzkriptum is tartalmazza azt a 70 nukleotid hosszúságú elemet, amelyhez nagyon hasonlót írtak le a β -aktin és az angiotenzin II receptor mRNS-e esetében. Ráadásul a megfelelő humán CaM transzkriptumok ebben a 70 nukleotidnyi szakaszban 91%-os homológiát mutatnak a patkánnyal. Noha szerepét még

nem bizonyították, ez az elem valószínűleg szerepet játszik a CaM I mRNS-ek dendritekbe juttatásában. Ugyanakkor, ahogy arról még lesz szó, a másik két CaM génhez tartozó mRNS-ek is alanyai a dendritekbe irányuló transzportnak. Mivel az összes CaM transzkriptumot tekintve a kódoló régió az egyedüli konzervált részlet, szerepe a célzott transzportban előre megjósolható. Ennek értelmében a 70 nukleotid hosszúságú szakasz kizárólag felnőtt életkorban működik, miközben a fejlődő agyban más mechanizmusok biztosítják a transzkriptum szállítását.

2. *In vivo* analízis. Annak kiderítésére, hogy a fejlődő patkány agyban különböző-e a CaM gén expressziója 15 agyterületet átfogó kvantitatív *in situ* hibridizációt végeztünk 6 eltérő életkorban a 19. embrionális életnap (E19) és a 20. posztembrionális életnap (PD20) között. Intenzív, fejlődési állapotra jellemző és differenciált transzkripciót figyeltünk meg. A vizsgált időszakban a CaM mRNS-ek szintje jellegzetes módon változott, ez alapján három csoportot különítettünk el. A legtöbb területen (pl. a CaM III a piriform kéregben) a szignálértékek PD10 körüli maximummal rendelkeztek, és az expressziós profil nagyjából szimmetrikus volt (I. típus). Más területeken (pl. a CaM II a cereberalis cortexben) a legkorábbi vizsgált életkorban mértük a legmagasabb jelet, ami folyamatosan csökkent a későbbi életkorokban (II. típus). A III. típusba azokat az agyterületeket soroltuk, amelyekben a szignálértékek nem mutatták a fenti szabályszerűségek egyikét sem (pl. a CaM III a hipothalamusban). Valamennyi CaM gén esetében magas szignálértékeket mértünk a kis- és nagyagykéreg, valamint a hippocampus molekuláris rétegében, ami ezen mRNS-ek dendritikus feldúsulására utal. Ezeken a területeken a legmagasabb szignálértékkel a CaM II gén rendelkezett PD1 életkorban, majd a CaM III, végül a CaM I következett. Míg azonban a CaM II és III mRNS-ek szintje meredeken zuhant az életkor előrehaladtával, addig a CaM I szintje viszonylag magas szinten megőrződött egészen PD20-ig. Eredményeink azt mutatják, hogy 1) a CaM gének eltérően, area-specifikus módon szabályozódnak, 2) a CaM mRNS-ek széles köre részese a dendritekbe irányuló transzportfolyamatoknak.

2. *In vitro* analízis. A CaM mRNS-ek dendritikus lokalizációjára csak a fejlődő patkány CaM I expressziója esetében rendelkezünk közvetlen bizonyítékokkal. Ugyanakkor az előzőekben leírt *in vivo* eredményeink, valamint a PC12 sejtek *in vitro* vizsgálata azt mutatták, hogy a másik két CaM génről átírt mRNS-ek is részesei a

dendritikus transzportnak. Emellett a CaM mRNS-ek célzott szállítását korábban nem vizsgálták primer neuronális kultúrákban, noha talán ez az *in vitro* rendszer nyújtja a fejlődő központi idegrendszer legjobb modelljét, kiváló lehetőséget biztosítva a neuronok intracelluláris tulajdonságainak vizsgálatához. Ezekben a kísérleteinkben nem-radioaktív *in situ* hibridizációval bizonyítottuk, hogy primer hippocampalis neuronokban valamennyi CaM génről átíródó mRNS kiszállítható a dendritikus kompartmentbe. Kettős jelölést alkalmazó kísérleteink ezen túlmenően azt is bizonyították, hogy a tenyésztett sejtek három diszkrét kategóriát formálnak: 1) CaM mRNS-pozitív neuronok, 2) S100-immunpozitív gliasejtek, és 3) mindkét markerre negatív sejtek.

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

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

b) A CaM mRNS-ekben azonosított számos cisz-ható szabályozóelem arra utal, hogy az egyedi transzkriptumok egyedi intracelluláris szerepkörrel rendelkeznek. A vizsgált elemek a következő csoportokba sorolhatók: 1) nukleáris poliadenilációt irányító szignálok, 2) citoplazmatikus poliadenilációt érintő elemek, 3) lokalizációs szignálok, 4) a stabilitást befolyásoló faktorok és 5) transzlációt szabályozó elemek. A 2. és a 3. csoportba is beletartozó CPE-k egységesen megtalálhatók valamennyi, 1,0 kb-nál hosszabb CaM transzkriptumban. Ez lehet a magyarázata annak, hogy valamennyi CaM gén rendelkezik a dendritekbe irányított transzkriptummal. Ugyanakkor a citoplazmatikus poliadeniláció előfeltétele lehet egy poli(A) farokkal nem rendelkező mRNS transzlációjának. Ezen a módon tehát meggátolható a szállítás alatt álló transzkriptum riboszómákhoz kötődése. A 4. kategóriába tartozó elemek feltűnő, CaM génenként különböző megoszlása alapján feltételezhető, hogy a CaM I mRNS-ek rövid, míg a CaM III mRNS-ek hosszú fél-életidővel rendelkeznek.

c) Az ontogenezis alatti CaM expresszió változásának kvantitatív nyomonkövetése génspecifikus különbségeket tárt fel. A legszembetűnőbb eltéréseket az elsősorban dendriteket tartalmazó molekuláris rétegekben tapasztaltuk. A nagyagykéreg 1. rétegében

például a CaM II gén expressziója nyolcadrészére csökkent PD1 és PD20 között. A CaM III esetében négyszeres, a CaM I esetében pedig mindössze 1,7-szeres csökkenés tapasztalható.

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

SUMMARY

In silico, in vivo and in vitro analysis of the calmodulin gene expression in the central nervous system of the rat

Calmodulin (CaM) is a multifunctional, highly conserved calcium-ion binding protein found in all eukaryotic cells. It regulates several basic cellular functions, including cell division, differentiation, signal transduction, etc. by interacting with a large and heterogeneous array of target proteins. It is particularly abundant in the nervous tissue. Although certain glial cells contain considerable levels of CaM, there is general agreement that the bulk of the protein is synthesized by neurons within the CNS, where it resides in different intracellular pools.

In higher vertebrates, multiple CaM genes encode a single, highly conserved CaM protein. Three bona fide CaM genes (CaM I, II and III) expressed at high levels in the brain have been described in the rat. These three CaM genes transcribe eight major mRNA species of different sizes by means of alternative polyadenylation, i.e. 4.2 kb, 4.1 kb, 1.7 kb and 1.0 kb for CaM I, 1.4 kb for CaM II, and 2.3 kb, 1.9 kb and 0.9 kb for CaM III. Although the coding regions of the transcripts diverge only within the limits of degeneracy of the genetic code, their 5'- and 3'-untranslated regions are markedly different, suggesting a differential regulation for the expression of the three CaM genes.

In recent decades, much effort has gone into describing the exact pattern of expression of the CaM genes. For example, their physiological and experimentally modified expressions have been analyzed in adult and embryonic tissues and in different in vitro systems. A majority of these studies, however, either provided mainly qualitative analyses of the experimental data, or focussed only on the expression of a particular CaM gene. Although the members of the apparently redundant CaM gene family are believed to be regulated in different ways in order to establish the precise spatial and temporal control of the CaM protein level, the mechanisms underlying the alterations in the expression profiles of the CaM genes in response to various stimuli remain unclear. With the aim of a better understanding of the physiological significance of the CaM multigene family and the regulation of the expression of individual CaM genes, we have carried out a series of investigations. Three

different approaches were used, as follows:

1. In silico analysis. A knowledge of the nucleotide sequences of the expressed CaM genes is a prerequisite for an understanding of the phenomena observed at a gene expression level. Most of the experiments addressing the CaM gene expression, however, were carried out in rodents, where information on these sequences was to some extent incomplete. Thus, as a first step, we completed identification of the cDNA sequence of the rat CaM I gene by using 3'-RACE methodology. Thereafter, the full-length cDNA sequences were compared against different databases, including those of the cis-acting regulatory elements (TransTerm, UTRdb). We characterized the alternative polyadenylation of the different CaM transcripts, too. Our results indicate that the CaM transcripts often use noncanonical polyadenylation signals. Tissue-specific polyadenylation might well explain why the relative amounts of the different CaM transcripts vary from tissue to tissue. Alternatively, the individual CaM transcripts possess tissue-specific half-lives. The 13 AREs found in the 3'-UTR of the 4.2 kb CaM I transcripts favor this latter possibility. Additionally, certain AREs appear to be critical parts of some cytoplasmic mRNA localization signals, and therefore might explain what we also observed in our in vivo and in vitro experiments (see below). Moreover, the 3'-UTRs of a number of rat CaM transcripts contain CPEs, as do their human counterparts. These elements have been found to influence the efficiency of dendritic translation and thereby even synaptic plasticity. Translational control may operate in a poly(A) tail-dependent manner, the mechanism used by the CPEs too, or in a poly(A) tail-independent manner. The DICEs found in CaM I and CaM III transcripts are examples of this latter case, where they are recognized by trans-acting factors and the resulting complex then inhibits the initiation pathway of the translation. CaM mRNAs belong in the subset of mRNAs that are targeted to specific intracellular domains. The localization signals (zip codes) are bound by trans-acting factors to form a transport complex, which is then moved along the cytoskeleton. To date, few studies have been carried out to identify dendritic targeting elements in neurons. The 4.2 kb and the 1.7 kb rat CaM I transcripts contain a 70 nucleotide-long stretch highly similar to the zip code occurring in the b-actin and angiotensin II receptor mRNAs. Additionally, a 91% homologous element is present in the corresponding human sequences. Although its role has not yet been proved, this zip code might well be responsible for the prominent dendritic trafficking of the

CaM I mRNAs. On the other hand, as described earlier, the mRNAs of the other two CaM genes are also targeted to dendrites, especially during early development. Since the only region highly conserved among these transcripts is the coding sequence, its role in targeting might be envisaged. Accordingly, the 70 nucleotide-long zip signal may act only in the adult, while other elements are responsible for the CaM mRNA localization in the developing brain.

2. In vivo analysis. To investigate whether differential expression takes place in the developing rat brain, a quantitative in situ hybridization analysis involving 15 brain areas at six ages between embryonic day 19 (E19) and postnatal day 20 (PD20) was carried out with gene-specific [³⁵S]cRNA probes. A widespread, developmental stage-specific and differential expression of the three CaM genes was observed. The characteristic changes in the CaM mRNA levels in the examined time frame allowed the brain regions to be classified into three categories. For a majority of the areas (e.g. the piriform cortex for CaM III), the signal intensities peaked at around PD10 and the expression profile was symmetric (type 1). Other regions (e.g. the cerebral cortex, layer 1 for CaM II) displayed their highest signal intensities at the earliest age measured, followed by a gradual decrease (type 2). The signal intensities in the regions in the third group (e.g. the hypothalamus for CaM III) fluctuated from age to age (type 3). Marked CaM mRNA levels were measured for each transcript corresponding to the three CaM genes in the molecular layers of the cerebral and cerebellar cortices and hippocampus, suggesting their dendritic translocation. The highest signal intensity was measured for CaM II mRNA, followed by those for CaM III and CaM I mRNAs on PD1. However, the CaM II and CaM III mRNAs subsequently decreased steeply, while the CaM I mRNAs were readily detected even on PD20. Our results suggest that, during development, 1) the transcription of the CaM genes is under differential, area-specific control, and 2) a large population of CaM mRNAs is targeted to the dendritic compartment in a gene-specific manner.

3. In vitro analysis. Direct in vivo evidence of the dendritic CaM mRNA pool has been obtained only for the CaM I mRNAs in the developing rat brain. However, our indirect data from quantitative in situ hybridization experiments and in vitro results using PC12 cells suggest that the mRNAs of the other two CaM genes are directed toward the dendritic compartment. Moreover, CaM mRNA targeting has not been explored in primary neuronal

cultures, which are excellent systems for an evaluation of the intracellular properties of neurons, and they are probably the closest in vitro models of the developing CNS. In these experiments, by utilizing nonradioactive in situ hybridization cytochemistry, we demonstrated that mRNAs transcribed from each CaM gene are subject to dendritic translocation in primary hippocampal neurons. Additionally, double-labeling experiments revealed that the cultured cells can be grouped into three discrete categories: 1) CaM mRNA-positive neurons, 2) S100-immunopositive glial cells, and 3) cells negative for both the CaM mRNAs and S100 protein.

For a full understanding of the functions of the CaM gene family much work remains to be done. Our results providing data on this issue may be summarized in the following points:

a) We cloned and sequenced the 3'-end of the 4.2 kb CaM I transcript missing from the genbanks. We also used this information in our in silico experiments.

b) The identification of several putative cis-acting elements in the multiple CaM transcripts hints at their unique intracellular fates. The elements analyzed may be grouped into the following categories: 1) signals driving the nuclear polyadenylation, 2) elements affecting the cytoplasmic polyadenylation, 3) localization signals, 4) factors influencing the stability of the transcript, and 5) elements regulating the translation. The CPEs belonging in both categories 2 and 3 are uniformly found in all CaM mRNAs larger than 1.0 kb. This occurrence may well explain why each CaM gene possesses transcript(s) subject to dendritic targeting. Further, cytoplasmic polyadenylation must precede the translation of a mRNA lacking a poly(A) tail. Accordingly, the binding of such a transcript to ribosomes can be prevented when transport occurs. The elements assigned to category 4 exhibit a striking, gene-specific distribution. As a consequence, a shorter half-life for CaM I and a longer for CaM III might be expected.

c) The quantitative detection of the CaM mRNA levels during ontogeny revealed gene-specific differences. The most prevalent variations were observed in the molecular layers, which mostly consisted of dendritic processes. By comparing the quotients of the highest and lowest signals for each CaM gene within a given region, we observed, for example, that in the molecular layer (layer 1) of the cerebral cortex the signals corresponding to the CaM II mRNAs underwent an 8-fold decrease between PD1 and PD20, whereas the

decrease for CaM III was 4-fold and that for CaM I in the same area during the same period was only 1.7-fold.

d) The in vitro experiments demonstrated that translocation into the dendrites of cultured hippocampal neurons is a general characteristic of the mRNAs derived from different CaM genes. Moreover, the extent of the dendritic distribution of the mRNAs was independent of the CaM genes. Additionally, our present studies has revealed a punctate localization of the CaM mRNAs, which is consistent with previous observations that mRNAs translocate in granular structures. Double-labeling experiments revealed that the cultured cells can be grouped into three discrete categories: 1) CaM mRNA-positive neurons, 2) S100-immunopositive glial cells, and 3) cells negative for both the CaM mRNAs and S100 protein.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton mondok köszönetet dr. Gulya Károly tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy biztosította számomra a kutatás feltételeit, így lehetővé tette doktori disszertációm elkészítését.

Köszönöm egykori és jelenlegi munkatársaimnak, dr. Bagyánszki Máriának, Bakota Lidiának, dr. Fekete Évának, dr. Pálfi Árpádnak, Szigeti Csabának, Várszegi Szilviának és dr. Vízi Sándornak, hogy mindig számíthattam segítségükre.

Köszönöm Ambrus Józsefné szaklaboráns nélkülözhetetlen munkáját.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani Családomnak, mivel szeretetük és megértésük nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Kortvely E, Gulya K (2004) Calmodulin, and various ways to regulate its activity. Life Sciences 74:1065-1070. [1,944]

Kortvely E, Varszegi S, Palfi A, Gulya K (2003) Intracellular targeting of calmodulin mRNAs in primary hippocampal cells. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 51:541-544. [2,408]

Kortvely E, Palfi A, Bakota L, Gulya K (2002) Ontogeny of calmodulin gene expression in rat brain. Neuroscience 114:301-316. [3,601]

Palfi A, Kortvely E, Fekete E, Kovacs B, Varszegi S, Gulya K (2002) Differential calmodulin gene expression in the rodent brain. Life Sciences 70:2829-2855. [1,944]

Összes impakt faktor: 9,897

[Szögletes zárójelben az adott folyóirat 2003. évi impakt faktora.]

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM HASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Szigeti C, Kovacs B, Kortvely E, Gulya K (2003) Comparison of treatment regimens to sensitize in situ hybridization for low-abundance calmodulin transcripts in the white matter of the rat spinal cord. Acta Biologica Szegediensis 47(1-4):1-6.

Szabo G, Katarova Z, Kortvely E, Greenspan R J, Urban Z (1996) Structure and the promoter region of the mouse gene encoding the 67-kD form of glutamic acid decarboxylase. DNA & Cell Biology 15(12):1081-1091. [2,006]

Valamennyi impakt faktor összege: 11,903

[Szögletes zárójelben az adott folyóirat 2003. évi impakt faktora.]