B 3615

PhD értekezés

A kalmodulin génexpresszió élettani és kísérleti körülmények közötti összehasonlító vizsgálata patkányagyban

Pálfi Árpád

József Attila Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Állattani és Sejtbiológiai Tanszék

Szeged
1999

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK 3
BEVEZETÉS 6
A kálciumion és a kálciumion-kötő fehérjék szerepe a szignáltranszdukcióban 6
A Ca^{2+} élettani és kórélettani szerepe az idegsejtek működésében 7
A kalmodulin (CaM) szerepe az emlős idegrendszer működésében 8
A CaM gének és expressziójuk az emlős idegrendszerben 10
A génexpresszió szabályzása az idegsejtekben célzott mRNS transzlokáció révén 11
Kvantitatív autoradiográfia 12
Összefoglalás 14
CÉLKITŰZÉSEK 15
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 16
Anyagok és eszközök 16
Kísérleti állatok és szövet előkészítés 16
Sejtkultúra 17
cRNS próbák 18
In situ hibridizáció 18
RNS tisztítás és Northern blot analízis 19
Szövetpaszta standard 19
Membrán standard 20
A film autoradiográfiát leíró modell 20
A matematikai modell általánosítása 22
A membrán standard sorozat kalibrálása szövet-ekvivalens radioaktivitásra 22
Autoradiográfia 23
Film denzitometria 23
Adatkezelés, statisztika és mikroszkópia 24
EREDMÉNYEK 25
A [^{35}S]-membrán standard sorozat kalibrálása szövet-ekvivalens radioaktvitásra és felhasználása a CaM in situ hibridizáció kvantifikálására 25
A CaM in situ hibridizáció kontroll kísérletei 27
A CaM mRNS-ek kvantitatív megoszlása a felnőtt patkányagyban 28
A CaM mRNS-ek sejt-specifikus előfordulása a felnőtt patkányagyban 39
A CaM mRNS-ek in vivo intracelluláris lokalizációja a felnőtt patkányagyban 40
A CaM mRNS-ek detektálása és intracelluláris lokalizációja embrionális patkány striatum immortalizált sejtvonala (M26-1F) sejtjeiben 44
A CaM génexpresszió szabályozása a hypothalamikus magnocelluláris magokban 10 napos vízmegvonást követően 45
MEGBESZÉLÉS 48
A film autoradiográfia modellje és alkalmazása 48
A CaM mRNS-ek régió- és sejtspecifikus megoszlása a felnőtt patkányagyban. A CaM mRNS-ek in vivo és in vitro intracelluláris lokalizációja 49
A CaM génexpresszió szabályozása a hypothalamikus magnocelluláris magokban 10 napos vízmegvonást követően 52
Összefoglalás 53
FELHASZNÁLT IRODALOM 55
A PHD ÉRTEKEZÉS ÖSSZEFOGLALÁSA 66
SUMMARY OF PHD THESIS 69
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 72

Az agyterületek elnevezése Palkovits (1980), az agyterületek nevének rövödítése Paxinos és Watson (1998) alapján történt.

[^{35}S]UTPαS	α-helyzetű foszforhoz kapcsolt 35-ös tömegszámú kénnel szubsztituált uridin trifoszfát
ac	commissura anterior
Acb	nucleus accumbens
AHi	amygdalo-hippocampális terület
Al	alumínium
Arc	nucleus arcuatus
BLA	nucleus amygdaloideus basalis lateralis
bp	bázispár
BST	nucleus interstitialis striae terminalis
CA1-3	CA1-3 hippocampális régiók
Ca^{2+}	kálciumion
[Ca^{2+}]	kálciumion koncentráció
CaM	kalmodulin
CaM I	a patkány I-es kalmodulin génje
CaM II	a patkány II-es kalmodulin génje
CaM III	a patkány III-as kalmodulin génje
CbG	granuláris sejt réteg, cerebellum
CbM	molekuláris réteg, cerebellum
Cbw	fehérállomány, cerebellum
cc	corpus callosum
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav
Cg	cinguláris cortex
CG	substantia grisea centralis
ChP	plexus choroideus
Cl 1-6	cortex cerebri 1-6. rétegei
cpm	percenkénti beütésszám (counts per minute)
CPu	nucleus caudatus-putamen
Cr	króm
cRNS	komplementer ribonukleinsav
ctx	cortex cerebri
DG	granuláris sejt réteg, gyrus dentatus
DMH	nucleus dorsomedialis hypothalami
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxinukleotid trifoszfát
dpi	képpontok száma hüvelykenként (dot per inch)
DR	nucleus raphe dorsalis
DTg	nucleus tegmenti dorsalis
DTT	ditio-treitol
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
Ep	ependyma
EPl	külső plexiform réteg, bulbus olfactorius

ER	endoplazmatikus retikulum
FBS	fötális borjúsavó (fetal bovine serum)
fi	fimbria hippocampi
Fr	frontális cortex
GABA	gamma-aminovajsav
Gl	glomeruláris réteg, bulbus olfactorius
GP	globus pallidus
Gr	granuláris sejt réteg, bulbus olfactorius
GV	szürke érték (gray value)
Hb	nucleus habenulae
HC	hippocampus
HDB	horizontális kar, nucleus tractus diagonalis
HMol	molekuláris rétegek, hippocampus
ic	capsula interna
IC	colliculus inferior
IO	oliva inferior
IP	nucleus interpeduncularis
IP_3	inozitol (1,4,5)-trifoszfát
kDa	kiloDalton
KKF	kálciumion-kötő fehérje
LHb	nucleus habenulae lateralis
LOT	nucleus tractus olfactorii lateralis
LS	nucleus septalis lateralis
LTD	hosszantartó depresszió (long term depression)
LTP	hosszantartó potenciáció (long term potentiation)
LV	ventriculus lateralis
MAP-2	2-es típusú mikrotubulus-asszociált fehérje (microtubule-associated protein 2)
MG	corpus geniculatum mediale
$MgCl_2$	magnézium klorid
MHb	nucleus habenulae medialis
Mi	mitrális sejt réteg, bulbus olfactorius
MnR	nucleus raphe medialis
MOPS	3-(N-morfolino)propánszulfonsav
mp	másodperc
MPA	nucleus preopticus medialis
mRNS	hírvivő (messenger) ribonukleinsav
Na_2HPO_4	dinátrium hidrogén foszfát
NaCl	nátrium klorid
NMDA	N-metil-D-aszpartát
Oc	occipitális cortex
OD	optikai denzitás
Op	stratum opticum, colliculi superioris
ox	chiasma opticum
Par	parietális cortex
PaV	nucleus paraventricularis hypothalami
PBG	nucleus parabigeminalis
PCR	polimeráz láncreakció (polimerase chain reaction)

PF	nucleus parafascicularis thalami
Pir	cortex piriformis
Pn	nuclei ponti
PnR	nucleus reticularis pontis
PrH	nucleus prepositus hypoglossi
PV	nucleus paraventricularis thalami
Py	piramissejt réteg, hippocampus
R	nucleus ruber
Re	nucleus reuniens thalami
RNS	ribonukleinsav
ROD	relatív optikai denzitás
rRNS	riboszómális ribonukleinsav
Rt	nucleus reticularis thalami
SC	colliculus superior
SCh	nucleus suprachiasmaticus
SD	standard deviáció
SDS	nátrium dodecilszulfát
SN	substantia nigra
SO	nucleus supraopticus
SuG	stratum griseum superficiale colliculi superioris
TC	tuber cinereum
Te	temporális cortex
Th	thalamus
Tr	nucleus trochlearis
tRNS	transzfer ribonukleinsav
TT	tenia tecta
TZ	corpus trapezoideum
3'-, 5'-UTR	3'-, 5'-nemkódoló régió (untranslated region)
VDB	vertikális kar, nucleus tractus diagonalis
VMH	nucleus ventromedialis hypothalami

A kálciumion és a kálciumion-kötő fehérjék szerepe a szignáltranszdukcióban

A kálciumion (Ca^{2+}) a baktériumoktól a legspecializáltabb eukarióta sejtekig a szignáltranszdukció egyik általánosan előforduló másodlagos hírvivője (Clapham, 1995; Kennedy, 1989a; Schulman és Hyman, 1999). Alapvető sejtfunkciókban, mint az izomsejtek ingerelhetősége, a szinaptikus plaszticitás vagy a génexpresszió szabályozása, játszik központi szerepet. A citoplazmikus [Ca^{2+}] értéke igen alacsony (kb. 100 nM), legalább négy nagyságrenddel kisebb az extracelluláris térben jelenlevő kb. 1.5-2 mM-os koncentrációnál. A tartósan magas intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ([Ca^{2+}]) a sejtek halálát eredményezheti, ezért a Ca^{2+} homeosztázis fenntartása létfontosságú. Mivel a Ca^{2+} nem metabolizálható, a sejtek homeosztázisa kialakításában különböző transzport- és kötőmechanizmusok vesznek részt. Az intracelluláris Ca^{2+} specifikus és reverzibilis megkötésére számos fehérje adaptálódott, ezek a Ca^{2+}-kötő fehérjék (KKF-k). Az egyik jól ismert KKF motívum (McPhalen és mtsai., 1991) az "EF hand", amely nevét a parvalbumin E és F régiói után kapta (Heizmann, 1988; Persechini és mtsai., 1989). Ez a motívum 2 α helixből és a közöttük elhelyezkedő Ca^{2+}-kötő hurokból épül fel. A KKF-k sokféleségét jellemzi, hogy csak az "EF hand" családba több, mint 200 fehérje tartozik (Andressen és mtsai., 1993; Heizmann, 1992; Weinman, 1991). A KKF-k működésük alapján két csoportra oszthatók (Baimbridge és mtsai., 1992; Clapham, 1995; Heizmann és Hunziker, 1991). Az egyik csoportot ún. "puffer" fehérjék alkotják, amelyek megkötik a Ca^{2+}-t, amint annak intracelluláris koncentrációja egy adott érték fölé emelkedik; e kötésnek azonban nincs közvetlen hatása a sejtben. A másik csoportot az ún. "trigger" fehérjék alkotják, ezek a Ca^{2+}-kötés során konformáció változásuk révén más effektor molekulák működését szabályozzák.

Minden eukarióta sejt plazmamembránjában található olyan Ca^{2+}-ATPáz, amely a Ca^{2+}-t a citoplazmából az extracelluláris térbe pumpálja; ideg- és izomsejtek plazmamembránja egy további, Na^{+}-hajtotta antiporthoz kapcsolt Ca^{2+}-pumpával is rendelkezik (Clapham, 1995; Schulman és Hyman, 1999). Az intracelluláris szabad [Ca^{2+}] szabályozásának további lehetősége a Ca^{2+}-nak a citoszolban magas koncentrációban (kb. 300 μM) jelenlévő, nagy affinitású KKF-khez történő kötődése. A legfontosabb intracelluláris Ca^{2+} raktár az endoplazmatikus retikulum (ER; Clapham, 1995), az ennek membránjában található Ca^{2+}-ATPáz a Ca^{2+}-t a citoplazmából az ER lumenébe transzportálja. Szélsőségesen magas intracelluláris [Ca^{2+}] esetében (kb. 10 μM; pl. a sejt sérülésekor) a mitokondriumok is részt vesznek a Ca^{2+} alacsony affinitású, de nagy kapacitású felvételében.

Nem ingerelhető sejtekben (pl. vérsejtek, májsejtek) a viszonylag lassú inozitol (1,4,5)-trifoszfát (IP_3) szignalizációs út működése révén a citoplazmában IP_3 szabadul fel (Berridge, 1993; Clapham, 1995; Pozzan és mtsai., 1994). Az IP_3 az ER membránjában elhelyezkedő IP_3

receptor/ioncsatorna komplexhez kötődik, s ennek eredményeként az ER lumenéből Ca^{2+} szabadul fel. Az ER Ca^{2+}-raktárának kimerítése másodlagosan aktiválhatja a plazmamembránon keresztül történő Ca^{2+} beáramlást; ez a "kapacitatív belépés" (Clapham, 1995; Lechleiter és mtsai., 1991; Niemeyer és mtsai., 1996; Putney, 1990; Schulman és Hyman, 1999). Az idegsejtekben a Ca^{2+} belépésének további mechanizmusai is ismertek. Ezek közé tartoznak a különböző (L-, N-, P- és T-típusú) feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornák (Llinas és mtsai., 1992a; McCormick, 1999; Miljanich és Ramachandran, 1995; Nowycky és mtsai., 1985; Schulman és Hyman, 1999; Tsien és mtsai., 1988), valamint bizonyos ligandfüggő kationcsatornák is. Ez utóbbiak közül az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor/ioncsatorna a legfontosabb (Schulman és Hyman, 1999), de más csatornák, így a nikotinerg acetilkolin receptor aktivációja is eredményezhet Ca^{2+} beáramlást. Az idegsejtek ER membránjában az IP_3 receptorhoz hasonló, ún. ryanodin receptor/Ca^{2+}-ioncsatorna is megtalálható (Clapham, 1995; Schulman és Hyman, 1999), ennek nyitása Ca^{2+}-kötés révén történik.

Az aktivált Ca^{2+}-csatornákon keresztül a jelentős koncentrációgrádiens következtében kb. 10^6 db/mp Ca^{2+} lép a citoplazmába. A citoszolban a KKF-k működésének köszönhetően a Ca^{2+} diffúziója igen lassú (Allbritton és mtsai., 1992). A KKF-k által történő megkötésig a Ca^{2+} nem diffundál 0.1-0.5 μm-nél tovább, ezért, ellentétben a többi másodlagos hírvivővel, a Ca^{2+} közvetlen hatása nagyon fókuszált. A citoszolnak azt a térfogatát, amelyben egy adott Ca^{2+}-forrásból felszabaduló Ca^{2+}-ok kifejtik hatásukat, Ca^{2+}-"microdomain"-nek nevezzük. Az axonterminális aktív zónájában például a Ca^{2+} hatása gyakorlatilag a csatornák 10-50 nm-es környezetére korlátozódik; azokon a helyeken, ahol a neurotranszmitter felszabadulás bekövetkezik, a [Ca^{2+}] elérheti a 100-200 μM-t is (Adler és mtsai., 1991; Llinas és mtsai., 1992b; Roberts, 1994; Roberts és mtsai., 1990). A kezdeti Ca^{2+}-jel gyakran a sejt egy pontjából kiindulva Ca^{2+}-hullámként terjed tovább. A gyors lefutású [Ca^{2+}] növekedést további [Ca^{2+}]-csúcsok követhetik, ez az oszcilláció percekig is eltarthat. Noha a Ca^{2+}-hullámok és oszcillációk kialakulásának pontos mechanizmusa és jelentősége kevéssé ismert (Clapham, 1995; Schulman és Hyman, 1999), könnyen belátható, hogy ezek tér- és időbeli varianciája sokkal több információt hordozhat, mint a statikus Ca^{2+}-szint egyszerű megváltozásai.

A Ca^{2+} élettani és kórélettani szerepe az idegsejtek működésében

Az idegsejtekben a Ca^{2+} élettani hatásai 5 fő célfehérje csoport szabályozásán keresztül valósulnak meg (Heizmann, 1993; Kennedy, 1989a). Ezek közé tartoznak a plazmamembrán egyes ioncsatornái (Marty, 1989), a foszfolipáz A_2 (Irvine, 1982) és C (Majerus és mtsai., 1986), a protein kináz C (Bell, 1986; Huang, 1989; Kennedy, 1989b; Malenka és mtsai., 1986; Nicoll és mtsai., 1988), a kalpain (Siman és mtsai., 1983; Siman és Noszek, 1988) és a kalmodulin (CaM; Andressen és mtsai., 1993; Baimbridge és mtsai., 1992; Kennedy, 1989a). A Ca^{2+} tehát

számos, egymással gyakran szoros kölcsönhatásban álló szignáltranszdukciós úton keresztül szabályozza az idegsejtek működését. A Ca^{2+}-jel, attól függően, hogy hol alakul ki a neuronban, más és más KKF-kel lép kapcsolatba, amelyek így különböző transzdukciós utak aktivációját eredményezhetik. Attól függően például, hogy a Ca^{2+} az L-típusú feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornán vagy az NMDA receptor/ioncsatornán keresztül lép az idegsejtbe, különböző génexpressziós változásokat indukálhat (Gallin és Greenberg, 1995).

A szignáltranszdukció során bekövetkező [Ca^{2+}] növekedés reverzibilis és általában rövid ideig tart; ha időben elhúzódik, kis koncentráció emelkedést eredményez, vagy [Ca^{2+}]-csúcsokra bomlik (oszcilláció). A drámai [Ca^{2+}] változások leggyakrabban a Ca^{2+}-"microdomain"-ekben következnek be. Bármilyen, a Ca^{2+} homeosztázisban fellépő zavar (a sejt teljes vagy jelentős térfogatában megnyilvánuló, tartós és jelentős [Ca^{2+}] emelkedés) neuropatológiai és neurotoxikológiai folyamatok kialakulását eredményezi (Nicotera és mtsai., 1992; Orrenius és Nicotera, 1994). A serkentő aminosavak túlzott felszabadulása által indukált neurotoxicitás (excitotoxicitás) eredményeként bekövetkező fokozott Ca^{2+} beáramlás döntő szerepet játszik a központi idegrendszer sejtpusztulással járó akut sérüléseinek (pl. hipoxia-ischemia; Choi, 1988; Kristian és Siesjo, 1996), valamint neurodegeneratív folyamatainak (Huntington kór, Parkinson betegség és Alzheimer kór; Choi, 1992; Doble, 1995) kialakulásában.

A kalmodulin (CaM) szerepe az emlős idegrendszer működésében

A CaM az "EF hand" családba tartozó (Andressen és mtsai., 1993; Heizmann, 1992), molekulánkként 4 Ca^{2+}-kötő helyet tartalmazó (Lin és mtsai., 1974), "trigger"-típusú KKF (Teo és Wang, 1973). A CaM minden eddig vizsgált eukarióta sejtben megtalálható konzervatív fehérje (Cheung, 1980; Chien és Dawid, 1984; Putkey és mtsai., 1983). Mennyiségére jellemző, hogy egy tipikus állati sejtben a teljes fehérjetartalom 1%-át is kiteheti. Gerincesekben 148 aminosavból felépülő (Watterson és mtsai., 1980), 16.7 kDa molekulatömegű fehérje, amelynek térszerkezete is ismert (Babu és mtsai., 1985). Működését tekintve sokfunkciós, intracelluláris receptor (Cheung, 1980; Ghosh és Greenberg, 1995; Means és mtsai., 1991), amelynek azonban újabban extracelluláris szerepet is tulajdonítanak (Crocker és mtsai., 1988; Goberdhan és mtsai., 1993; MacNeil és mtsai., 1988; Remgard és mtsai., 1995).

A CaM különösen nagy mennyiségben fordul elő az emlős idegszövetben (Caceres és mtsai., 1983; Hoskins és mtsai., 1986; Zhou és mtsai., 1985). Erős immuncitokémiai jel detektálható az idegsejtek perikarionjában, sejtmagjában, a nyúlványokban (dentritek, mielinizált axonok), valamint néha a gliasejtekben is (Bachs és mtsai., 1994; Caceres és mtsai., 1983; Seto-Ohshima és mtsai., 1983; Sola és mtsai., 1996; Sola és mtsai., 1997a; Vendrell és mtsai., 1991). A jelölődés a citoplazmában jellegzetes granuláris elhelyezkedést mutat, amely az ER membránjához, a mitokondriumok külső felszínéhez, a posztszinaptikus denzitáshoz, a szinaptikus és burkolt

vezikulákhoz, valamint a mikrotubulusokhoz kapcsolódik (Caceres és mtsai., 1983; DeLorenzo és mtsai., 1979; Goldenring és mtsai., 1984; Grab és mtsai., 1980; Lin és mtsai., 1980; Linden és mtsai., 1981; Sobue és mtsai., 1982; Wood és mtsai., 1980).

Mivel a CaM nem rendelkezik saját enzimaktivitással, a Ca^{2+}-jel CaM-on keresztül történő transzdukciója magába foglalja a Ca^{2+}/CaM komplex specifikus fehérjékkel történő interakcióját is. Több, mint húszféle eukarióta enzim ismert, amelyet a Ca^{2+}/CaM aktivál (Cheung, 1980; Kennedy, 1989a; Klee és mtsai., 1980; Schulman és Hyman, 1999). Ezek közül a ciklikus (3',5')-nukleotid foszfodiészterázok (Kakiuchi és Yamazaki, 1970; Kakiuchi és mtsai., 1975), az adenilil ciklázok (Brostrom és mtsai., 1975), a nitrit oxid szintázok (Oh, 1995), a Ca^{2+}-ATPázok (Cheung, 1980; Sobue és mtsai., 1979) és a protein kinázok (Kennedy, 1989a; Kennedy és Greengard, 1981) bizonyos formái az agyban is megtalálhatók.

Idegsejtekben a Ca^{2+}/CaM talán legfontosabb célpontja a széles szubsztrátspektrummal rendelkező II-es típusú CaM kináz (Kennedy, 1989a; Ouimet és mtsai., 1984). A kináz a preszinaptikus terminálban a szinaptikus vezikulákhoz (Greengard és mtsai., 1993), míg a dendritekben a posztszinaptikus denzitásokhoz kapcsolódik (Kelly és mtsai., 1984; Kennedy és mtsai., 1983); ez utóbbiban a teljes fehérjetartalom 25-50%-át is kiteheti (Miller és Kennedy, 1985). Az enzim szubsztrátjai közé tartoznak többek között a tirozin hidroxiláz, a különböző monooxigenázok, a tubulin, a MAP2 (Kuhn és Lovenberg, 1982), a szinapszin I (Greengard és mtsai., 1993; Huttner és mtsai., 1983), a különböző Ca^{2+}-csatornák, a Ca^{2+}-ATPázok, a glutamát receptorok (Kitamura és mtsai., 1993; McGlade-McCulloh és mtsai., 1993) és a transzkripciós faktorok (Schulman és Hyman, 1999). Noha a kináz által szabályozott funkciók szerteágazók (DeLorenzo, 1982), az enzim legfontosabb szerepe minden bizonnyal a neurotranszmitterek (pl. katekolaminok, szerotonin) szintézisében (DeLorenzo, 1982; Fujisawa és mtsai., 1984; Griffith és Schulman, 1988; Kuhn és Lovenberg, 1982) és felszabadításában van (DeLorenzo, 1980; DeLorenzo és mtsai., 1979; Nichols és mtsai., 1990). Befolyásolja a citoszkeleton működését is, mivel mind in vitro (Marcum és mtsai., 1978), mind in vivo (Burke és DeLorenzo, 1981; Burke és DeLorenzo, 1982; Burke és Delorenzo, 1982) körülmények között szabályozza a mikrotubulusok felépülését és lebomlását. Részt vesz a szinaptikus vezikula és a preszinaptikus membrán közötti interakcióban (DeLorenzo, 1982; DeLorenzo és mtsai., 1979), s szerepet játszik a Ca^{2+}-áramok, a Ca^{2+}-homeosztázis és az LTP kialakulásában is (Lisman, 1994; Malenka és mtsai., 1989; Nicoll és mtsai., 1988).

Az idegsejtekben a CaM másik fontos célfehérjéje az egyetlen ismert CaM-aktivált protein foszfatáz, a kalcineurin (Manalan és mtsai., 1984; Price és Mumby, 1999; Stewart és mtsai., 1982). Noha nagyon szűk szubsztrátspecificitással rendelkezik, egy proteinfoszfatáz kaszkád aktiválása révén mégis számos szubsztrát defoszforilációjában játszik közvetett szerepet (Braun és Schulman, 1995; Klee, 1991; Klee és mtsai., 1998). Befolyásolja az L-típusú feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornák (Armstrong, 1989) és a pre- és posztszinaptikus ligandfüggő ioncsatornák Ca^{2+}-függő defoszforilációját (Lieberman és Mody, 1994; Swope és mtsai., 1999; Tong és mtsai.,

1995; Victor és mtsai., 1995), valamint az LTP (Lu és mtsai., 1996; Wang és Stelzer, 1994) és az LTD kialakulását (Mulkey és mtsai., 1994).

A CaM – legtöbbször a II-es és a IV-es típusú CaM kinázokon keresztül – a sejtmag működését is szabályozza (Agell és mtsai., 1998). Transzkripciós faktorok és RNS-kötő fehérjék aktivitását befolyásolva (Agell és mtsai., 1998; Means és mtsai., 1991) részt vesz a sejtciklus (Lu és Means, 1993), a sejtosztódás és a génexpresszió Ca^{2+}-mediálta szabályozásában (Corneliussen és mtsai., 1994; Dash és mtsai., 1991; Enslen és Soderling, 1994; Kapiloff és mtsai., 1991; Lerea és McNamara, 1993; Matthews és mtsai., 1994; Sheng és mtsai., 1991). Idegsejtekben hatást gyakorol azok differenciálódására, érésére és a neuritek kinövésére (Liu és Storm, 1990).

A CaM gének és expressziójuk az emlős idegrendszerben

A CaM fehérje szerkezete az evolúció során konzervált; noha gerincesekben több gén is kódolja, a géntermékek aminosav szekvenciája adott fajon belül, sőt, a magasabbrendű gerincesek között is, megegyezik (Chien és Dawid, 1984; Nojima, 1989; Putkey és mtsai., 1983). A patkányban 3 működő CaM gén (CaM I, CaM II és CaM III) és 4 pszeudogén ismert (Nojima, 1989; Nojima és mtsai., 1987; Nojima és Sokabe, 1986; Sherbany és mtsai., 1987). Mindhárom működő gén bazális expressziója igen magas, alátámasztva a CaM-nak a sejtek életében betöltött különösen fontos szerepét. A 3 működő gén kódoló régiói – a genetikai kód degenerációjából következően – nukleotid szinten különböznek ugyan, de ezek a különbségek aminosav szinten nem nyilvánulnak meg. A 3'- és az 5'-nemtranszlálódó régiókban (3'-, 5'-UTR) azonban jelentős szekvenciakülönbségek figyelhetők meg, ezért valószínűsíthető, hogy a 3 CaM gén kifejeződése eltérő szabályozás alatt áll. A patkányban a 3 CaM génről alternatív poliadeniláció révén összesen 7 féle mRNS molekula íródik át (Gannon és McEwen, 1994; Ikeshima és mtsai., 1993; Nojima, 1989). A CaM I transzkriptumai 4.0, 1.7 és 0.8 kb, a CaM II egyetlen transzkriptuma 1.4 kb, a CaM III transzkriptumai 2.3, 1.9 és 0.9 kb hosszúságúak. Egérben a 3 CaM génnek csak a cDNS-e, illetve a CaM II genomikus szekvenciája (Bender és mtsai., 1988; Danchin és mtsai., 1989; Kato, 1992; Matsuo és mtsai., 1993; Skinner és mtsai., 1994), ugyanakkor emberben mindhárom CaM genomikus szekvenciája ismert (Koller és mtsai., 1990; Rhyner és mtsai., 1994; Senterre-Lesenfants és mtsai., 1995; Toutenhoofd és mtsai., 1998).

A CaM gének a patkány fejlődése során szövet- és sejtspecifikus, valamint differenciált expressziót mutatnak (Ikeshima és mtsai., 1993; MacManus és mtsai., 1989; Weinman és mtsai., 1991); a differenciált expresszión ebben a vonatkozásban azt értjük, hogy a 3 CaM gén expressziós szintjei és annak változásai a fejlődési stádiumtól függően vagy valamilyen stimulus hatására különböznek. Az idegrendszerben expressziójuk különösen magas (Ikeshima és mtsai., 1993; Matsuoka és mtsai., 1992; Nojima és Sokabe, 1989; Roberts-Lewis és mtsai., 1990;

Weinman és mtsai., 1991), ahol a CaM elsősorban az idegsejtekben fejeződik ki, noha egyes gliasejtekben is előfordulhat magas koncentrációban (Sola és mtsai., 1997a). Ellentmondásos módon, fiziológiás körülmények között a patkányagyban a 3 CaM gén hasonló (Gannon és McEwen, 1994; Ikeshima és mtsai., 1993), ugyanakkor az egéragyban eltérő, differenciált expresszióját írták le (Sola és mtsai., 1996). A CaM génexpresszió kísérleti körülmények közötti megváltozására számos példa ismert (Gnegy és mtsai., 1994; Landry és mtsai., 1992; Ni és Brown, 1993), ezek közül több in vitro (Bai és mtsai., 1992; Bai és Weiss, 1991) és in vivo kísérletben is az expresszió differenciált szabályozását figyelték meg (Barron és mtsai., 1995; Gannon és McEwen, 1994; Sola és mtsai., 1997b).

A génexpresszió szabályzása az idegsejtekben célzott mRNS transzlokáció révén

A citoplazmában nem egyenletesen, hanem polarizáltan eloszló mRNS fajták létezését először a zsákállat petesejtjében (Jeffery és mtsai., 1983), később számos szomatikus sejttípusban (pl. fibroblaszt, mioblaszt, hámsejt, neuron, oligodendrocita) is leírták (Wilhelm és Vale, 1993). Mi lehet a jelentősége az mRNS molekulák intracellulárisan eltérő megoszlásának? Egyfelől hatékony és energiatakarékos módot teremt a fehérjék szükséges mennyiségének felhasználási helyén való biztosítására (St Johnston, 1995), így a lokalizált mRNS molekulák hozzájárulnak a sejt-aszimmetria kialakításához (Bashirullah és mtsai., 1998), másfelől megteremtik a különböző fehérjék lokális transzlációs szabályozásának lehetőségét is (St Johnston, 1995).

A dendritekben poliszómák (Torre és Steward, 1992) és a transzlációs rendszer egyéb komponensei (tRNS-ek, iniciációs és elongációs faktorok stb.) is megtalálhatók (Tiedge és Brosius, 1996). Az RNS molekulák, valószínűleg külön transzportmechanizmus segítségével, diszkrét granulumok formájában szállítódnak az idegsejtekben. A granulumokban poli(A^+) mRNS-ek, riboszómák és elongációs faktor 1α is lokalizálható (Knowles és mtsai., 1996). Mivel a dendritekben mind durvafelszínű ER, mind Golgi markerek kimutathatók (Torre és Steward, 1996), a fehérjeglikozilációs apparátus működése is feltételezhető. A fentiek alapján a dendritek a fehérjeszintézis aktív kompartmentjeinek tekinthetők. A transzláció a szinaptikus aktivitásnak megfelelően szabályozható (Steward és Banker, 1992), befolyásolva az aktivitásfüggő szinaptikus plaszticitást is. Az eddig megismert dendritikusan lokalizált mRNS-ek (Gao, 1998; St Johnston, 1995; Steward, 1995; Steward, 1997) közé tartoznak a 2-es típusú mikrotubulus-asszociált fehérje (MAP2; Garner és mtsai., 1988), a dendrin (Herb és mtsai., 1997), az NMDA receptor 1 (Gazzaley és mtsai., 1997) és a protein kináz C(γ) is (Moriya és Tanaka, 1994).

Axonban és axonterminálisban is sikerült az mRNS molekulák jelenlétét kimutatni. A tintahal óriásaxonjában 100-200 különböző mRNS fajta jelenlétét feltételezik (Capano és mtsai., 1987; Chun és mtsai., 1996); az axoplazmában az aktív fehérjeszintézist végző poliriboszómák szintén

megtalálhatók (Giuditta és mtsai., 1991). Az axonális mRNS transzlokáció magasabb-rendű gerincesekben is megfigyelhető. A csirke szimpatikus neurontenyészetében poli(A$^+$)RNS (Olink-Coux és Hollenbeck, 1996), a patkány hypothalamo-hypophysealis rendszerében tirozin hidroxiláz (Skutella és mtsai., 1994), vazopresszin és oxitocin mRNS (Jirikowski és mtsai., 1990; Mohr és mtsai., 1991; Trembleau és mtsai., 1995), a patkány bulbus olfactoriusában pedig egy bulbus-marker fehérje mRNS axonális lokalizációja ismert (Wensley és mtsai., 1995).

A CaM szinaptikus transzmisszióban és citoplazmikus működésben betöltött komplex szerepe feltételezi a fehérje precízen szabályozott és célzott intracelluláris transzportját, ami részben mRNS-einek szubcelluláris lokalizációja és lokális transzlációja révén is megvalósulhat. A CaM I mRNS-ek dendritikus lokalizációját a szinaptogenezissel egyidőben a fejlődő agykéregben a posztnatális 5-15. napokon, a Purkinje sejtekben a posztnatális 15-20. napokon mutatták ki (Berry és Brown, 1996). A patkány feokromocitóma sejtvonal (PC12) sejttenyészetében a CaM I mellett a CaM II mRNS transzportja is dendritikusan célzott (Zhang és mtsai., 1993). A CaM szignalizáció idegsejtekben talán legfontosabb közvetlen célfehérjéjének, a II-es típusú CaM kináznak a mRNS-e szintén dendritikusan transzlokált (Burgin és mtsai., 1990).

A mRNS-ek célzott intracelluláris transzportjának kialakulása citoplazmikus elemek (RNS-kötő fehérjék, motor proteinek és a citoszkeleton egyes fehérjéi) és a cisz-ható RNS szekvenciák komplex kölcsönhatásának az eredménye (Landry és mtsai., 1994; Wallace és mtsai., 1998). A cisz-ható szignálok elsődlegesen a mRNS 3'-UTR-jén helyezkednek el (Amara és mtsai., 1996; Bashirullah és mtsai., 1998; Mayford és mtsai., 1996), bár egyes esetekben az 5'-UTR (Muslimov és mtsai., 1997), és a kódoló régió (Prakash és mtsai., 1997) szerepére is van bizonyíték.

Kvantitatív autoradiográfia

Állati szövetekből származó metszetekben a radioaktivitás nagy feloldású, kvantitatív nyomonkövetésére több lehetőség is kínálkozik. Ez történhet sugárzásérzékeny emulzióval bevont metszetek esetében az ezüstszemcsék megszámlálásával (Jonker és mtsai., 1997; Lucas és mtsai., 1994), film denzitometriával (Baskin és Stahl, 1993; Ehn és Larsson, 1979; Kuhar és Unnerstall, 1985; Unnerstall és mtsai., 1982) és a foszforernyő rendszer felhasználásával (storage phosphor screen technology; Amemiya és Miyahara, 1988; Ito és mtsai., 1995; Sonoda és mtsai., 1983). Noha a foszforernyő számos előnnyel rendelkezik (ilyen az 5 nagyságrenden keresztül lineáris dinamikus tartomány, a magas szenzitivitás és a rövid expozíciós idő), szöveti metszeteken történő alkalmazását gyengébb feloldása korlátozza. Ennek köszönhetően a tradicionális ezüst halid alapú képalkotó módszerek még mindig széles körben használatosak. Ebben a fejezetben csak a filmalapú denzitometria kvantifikálásával foglalkozunk.

Noha a film autoradiográfia kvantitatív analízisének alapjai régóta ismertek (Baskin és Stahl,

1993; Davenport és mtsai., 1988; Ehn és Larsson, 1979; Kuhar és Unnerstall, 1985; Unnerstall és mtsai., 1982), a receptor ligandok és hibridizált próbák szöveti megoszlását gyakran csak kvalitatív vagy szemikvantitatív módon határozzák meg (Gulya és mtsai., 1993; Matsuoka és mtsai., 1992; Sola és mtsai., 1996). Az autoradiogrammok kvantifikációjának fő problémája, hogy a film sötétségének mértéke (gray level = szürke árnyalat, grayness = szürkeség; leggyakrabban optikai denzitásban, OD, kifejezve) nem egyenesen arányos a mintában levő radioaktivitással (Ehn és Larsson, 1979; Kuhar és Unnerstall, 1985; Unnerstall és mtsai., 1982). Az OD és a radioaktivitás közötti kapcsolat általában olyan, hogy a növekvő radioaktivitással párhuzamosan az OD először igen lassan, majd gyorsan (közel lineárisan) emelkedik, ezt követően a meredekség csökken, végül a film telítődésével az OD már nem emelkedik tovább; ezt a görbét a film szenzitometrikus görbéjének nevezik. A görbe lefutását elsődlegesen a film radioaktív sugárzásra érzékeny emulziója és az alkalmazott radioizotóp határozza meg, azonban egyéb faktorok (pl. az expozíciós idő, a film előhívásának körülményei, a mikrodenzitometriához használt készülék tulajdonságai) is befolyásolják.

A mintához kötött radioaktivitás kvantifikálása radioaktív standard sorozat segítségével történik. Jelenleg két, szövetpaszta- és műgyanta-bázisú, standard használatos. A szövetpaszta a vizsgálni kívánt szövetből homogenizálással készül (Davenport és mtsai., 1988; Unnerstall és mtsai., 1982). Az izotóp hozzáadását követően a pasztát lefagyasztják, majd a vizsgálni kívánt metszetek vastagságával megegyező vastagságú metszeteket készítenek belőle. Így a metszet anyagából, vastagságából, felragasztásából származó kioltás mind a standard sorozat, mind a vizsgált szövet metszeteiben elméletileg azonos. A szövetpaszta standardok használatának azonban többféle technikai eredetű hátránya is van, így a nehézkes készítés, a fagyasztó mikrotóm radioaktív szennyeződése, a jelentős anyagfelhasználás, az egymást követő kísérletekben a standard sorozatok radioaktivitásainak szinte lehetetlen reprodukálása, és a rövid féléletidejű izotópok esetében ([^{32}P], [^{33}P], [^{35}S], [^{125}I]) a gyakori készítés. A másik lehetőség a poli(metil-metakrilát)-alapú standardok használata. Ilyen típusú [^{3}H], [^{14}C] és [^{125}I] standard sorozatok a kereskedelemben is beszerezhetők (Amersham, American Radiolabeled Chemicals). Mivel a műanyag alapú standardok elnyelése nem azonos a szöveti elnyeléssel, a pontos kvantifikációhoz ezeket előzetesen a szövet-ekvivalens radioaktivitásra kalibrálni kell (Baskin és Stahl, 1993; Davenport és mtsai., 1988; Miller, 1991; Miller és mtsai., 1988).

Megfelelő számú, különböző radioaktivitást tartalmazó szövet-ekvivalens standard sorozat expozíciója és előhívása után meghatározható a film szenzitometrikus görbéje. Az OD és a radioaktivitás között fennálló komplex kapcsolatot explicit módon leíró elmélet hiányában a sorozat elemeihez tartozó adatok interpolálásához csak empirikus megfigyelésekre hagyatkozhatunk. Ebből a célból harmad- (Goochee és mtsai., 1980; Sokoloff és mtsai., 1977) és negyedrendű polinómikus (Baskin és Stahl, 1993; Pan és mtsai., 1983), hatvány (Unnerstall és mtsai., 1982) vagy logisztikus (Miller és mtsai., 1988) egyenleteket használnak. Az ilyen interpolációk egyetlen célja a legjobb közelítés elérése, ezért az egymást követő görbeillesztésekben a kapott

egyenletek paraméterei jelentős variációt mutatnak. Az előzetesen meghatározott paraméter értékek használata az egymást követő kísérletekben így bizonytalan eredményeket produkál. Tehát egy explicit elméleten alapuló matematikai modell, amelyben a paraméterek funkciója ismert, nagyban hozzájárulna a film autoradiogrammok pontos és reprodukálható analíziséhez.

Összefoglalás

A fentiekben röviden összefoglaltuk a Ca^{2+}-t, mint másodlagos hírvivőt, magába foglaló szignáltranszdukció lehetőségeit az eukarióta sejtekben. Figyelmet szenteltünk az emlős idegrendszerben végbemenő, Ca^{2+}/CaM révén megvalósuló mechanizmusoknak. Összegeztük a CaM génekre, azok élettani, kórélettani és kísérleti körülmények között megfigyelhető expressziójára, valamint a génexpresszió célzott mRNS transzlokáción keresztül megvalósuló szabályozására vonatkozó ismereteket. Röviden érintettünk néhány, a kvantitatív film denzitometriára vonatkozó aktuális kérdést is.

Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki, hogy a patkány központi idegrendszerében és embrionális patkány striátumból származó immortalizált sejttenyészetben tanulmányozzuk a 3 működő CaM gén fiziológiás és kísérleti körülmények között megfigyelhető kifejeződését. A génexpresszió mértékére a CaM mRNS-ek citoplazmikus mennyiségéből – amelyet radioaktív in situ hibridizációval határoztuk meg – következtettünk. Az expressziós vizsgálatokat a szöveti hierarchia különböző szintjein végeztük el. Vizsgálataink során az alábbi célokat tűztük ki:

1. A film autoradiográfia során lezajló folyamatok törvényszerűségeinek feltárása annak érdekében, hogy azokat megfelelő matematikai formába öntve, majd alkalmas matematikai módszereket felhasználva a kvantitatív film autoradiográfia leírására egzakt modellt kapjunk.

2. A kapott modell alkalmazása eltérő elnyelésű standard sorozatok szenzitometrikus görbéinek egymásba transzformálása.

3. Egy új, membrán alapú, széles körben alkalmazható radioaktív standard sorozat kifejlesztése.

4. A CaM mRNS-ek agyterület-specifikus megoszlásának az 1-3. pontok szerinti kvantitatív meghatározása élettani körülmények között a felnőtt patkányagyban.

5. A CaM mRNS-ek sejt-specifikus előfordulásának vizsgálata a felnőtt patkányagyban.

6. A CaM mRNS-ek in vivo intracelluláris lokalizációjának meghatározása a felnőtt patkányagyban.

7. A CaM gének expressziójának és mRNS-ei intracelluláris lokalizációjának vizsgálata embrionális patkány striatum immortalizált sejtvonala (M26-1F) sejtjeiben.

8. A CaM génexpresszió szabályozásának kvantitatív vizsgálata a felnőtt patkány hypothalamikus magnocelluláris magjaiban 10 napos vízmegvonást követően.

Anyagok és eszközök

Kísérleteink során molekuláris biológiai tisztaságú vegyszereket használtunk (Sigma, St. Louis, MO, USA; Promega Corp., Madison, WI, USA; Pharmacia Biotech, Uppsala, Svédország). A felhasznált enzimeket és kiteket a Sigma, a Promega, az Amersham (Amersham Int., Arlington Heights, IL, USA), a Gibco BRL (Life Technologies GmbH, Eggenstein, Németország) és a Fermentas (Fermentas AB, Vilnius, Litvánia) cégektől vásároltuk. A Cryomatrix a Shandon (Shandon Scientific Ltd., Pittsburgh, PA, USA), az entellán a Merck (Merck, Darmstadt, Németország) terméke. A sejttenyésztéshez használt FBS (fetal bovine serum) és a Dulbecco-féle módosított Eagle médium/F12 tápkeveréket a Gibco BRL-től származik. Az in vitro transzkripciót Riboprobe System-T7/SP6 rendszerekkel (Promega) végeztük, a [^{35}S]UTPSα-t az Izotóp Intézet Kft-től (Budapest) szereztük be.

További felhasznált anyagok és eszközök: pcDNA3 vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), ProbeQuant G-50 Sephadex microcolumn (Pharmacia), Duralon-UV nylon membrán (Stratagene Ltd., La Jolla, CA, USA), Stratalinker UV-keresztkötő (Stratagene), PosiBlot pressure blotter (Stratagene), AB 373 DNS Szekvenátor (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), Minifold dot blot apparátus (Schleicher&Schuell, Inc., Keene, NH, USA), HB-2D hibridizáló kemence (Techne Cambridge Ltd., UK), Hyperfilm-βmax autoradiográfiás film (Amersham), Hypercoat autoradiográfiás emulzió (Amersham), Kodak D19 hívó és Kodak fixáló (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA).

Az autoradiogrammok digitalizálását Microtek II HR szkenner (Microtek International Inc., Taiwan), a számítógépes analízist Power Macintosh 8600/250 személyi számítógép (Apple Computer Inc., Cupertino, CA, USA) segítségével végeztük. A felhasznált számítógépes programok a következők voltak: NIH Image 1.59 (Rasband, 1997), Photoshop 5.0 (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA, USA), Statgraphics 6.0 (Manugistics, Inc., Rockville, MD, USA), Excel 5.0a (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA), BLASTN 2.0.6 (Zhang és Madden, 1997). A mikroszkópos analízishez Leica DM LB fénymikroszkópot (Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar, Németroszág), a mikroszkópi képek készítéséhez Polaroid DMC 1 digitális mikroszkóp kamerát (Polaroid Corp., Cambridge, MA, USA) használtunk.

Kísérleti állatok és szövet előkészítés

Az állatkísérletek mind a Magyar Köztársaság, mind az Európai Közösség (86/609/EEC) által hozott, a laboratóriumi állatok védelmére és kísérleti felhasználására vonatkozó jogszabályainak megfelelően, a JATE Intézményi Etikai Bizottság engedélyével zajlottak. Az

állatházból érkezett hím, Sprague-Dawley patkányokat (200-250 g) legalább 1 hétig standard körülmények között tartottuk.

A vízmegvonási kísérletek alapjául korábbi, egerken végzett, 4 napos vízmegvonási rend szolgált (Gulya és mtsai., 1991; Gulya és mtsai., 1993). A dehidrált egereken fizikailag megfigyelhető változások eléréséhez (pl. jelentős testsúlycsökkenés) a patkányok esetében azonban 10 napos vízmegvonásra volt szükség. Ennek megfelelően a patkányok egy 5 fős csoportja 10 napon keresztül nem kapott ivóvizet, csak szilárd tápot, ugyanakkor az 5 fős kontroll csoport szabadon hozzájutott mind az ivóvízhez, mind a táplálékhoz. A 10 napos vízmegvonást követően az állatok a kontroll csoporthoz viszonyítva jelentős testsúlycsökkenést (25-30%) mutattak.

Az in situ hibridizációhoz, az agypaszta készítéshez és az RNS tisztításhoz az állatokat dekapitáltuk, majd az agyakat gyorsan kiemeltük a koponyából. Az in situ hibridizációhoz az agyakat Cryomatrixba ágyaztuk és azonnal -70°C-on lefagyasztottuk. A patkányagy atlasz (Paxinos és Watson, 1998) alapján kiválasztott területekről 15 μm vastag, koronasíkú sorozatmetszeteket készítettünk, majd azokat Cr-Al-zselatin-kezelt steril tárgylemezekre vettük fel. A metszeteket megszárítottuk, majd felhasználásig -70°C-on tároltuk. Az RNS tisztításhoz az agyakat azonnal -70°C-on lefagyasztottuk.

Sejtkultúra

A kísérletekben használt hőmérsékletérzékeny sejtvonal (M26-1F) sejtjei embrionális patkány striátumból származnak, amelyeket az SV40 vírus nagy T antigénjének A58 hőszenzitív mutáns alléljával onkogén transzfekció révén immortalizáltak (Giordano és mtsai., 1993). A transzfektált klónt 33°C-on fibroblasztszerű morfológia, glutamát dekarboxiláz és MAP-2 expresszió, mérhető GABA tartalom, ugyanakkor a gliális markerek (pl. vimentin) hiánya, s mindezek alapján a neuronális differenciáció bizonyos foka jellemzi. A sejteket poli-L-lizinnel (0.1 mg/ml) bevont üveg fedőlemezeken tenyésztettük. Tápfolyadéknak 10% FBS-sel (Gibco BRL), 100 U/ml penicillinnel és 0.1 mg/ml streptomicinnel kiegészített Dulbecco-féle módosított Eagle médium/F12 tápkeveréket (Gibco BRL) használtunk. A kultúrákat 5% CO_2 tartalmú légtermosztátban permisszív hőmérsékleten (33°C) 3 napig tenyésztettük. A fedőlemezeken növő sejteket 0.01 M foszfátpufferelt fiziológiás sóoldatban (PBS; 0.01 M Na_2HPO_4, pH 7.4, 0.9% NaCl) öblítettük, majd 4% formaldehidet tartalmazó PBS-ben 15 percig fixáltuk. Ezt követően a fedőlemezeket az in situ hibridizációnál leírtaknak megfelelően, a szövet metszetekkel azonos módon kezeltük. Az M26-1F sejtvonalat néhai Dr. Joó Ferenc bocsátotta kooperációs munkánk rendelkezésére.

cRNS próbák

A CaM I, II és III mRNS-ek 3'-UTR-inak megfelelő genomikus szekvenciákat (Nojima, 1989; Nojima és Sokabe, 1987) a polimeráz láncreakció (PCR) segítségével felsokszoroztuk. A szekvenciák összehasonlítását a BLASTN 2.0.6 program segítségével végeztük (Zhang és Madden, 1997). A PCR-t EcoR I és BamH I restrikciós enzim hasítóhelyekkel kiegészített primerekkel végeztük. A patkány genomikus szekvenciáknak megfelelő primer szekvenciák a következők voltak: a CaM I esetében 5'-AGACCTACTTTCAACTACT, ami megfelel a 6. exon 30-48 bp szekvenciájának, és 5'-TGTAAAACTCATGTAGGGG, ami megfelel a 6. exon 236-255 bp szekvenciájának (Nojima és Sokabe, 1987); a CaM II esetében, 5'-ATTAGGACTCCAT-TCCTCC, ami megfelel az 5. exon 1929-1947 bp szekvenciájának, és 5'-CACAACTCCACACTTC-AACAGC, ami megfelel az 5. exon 2138-2159 bp szekvenciájának (Nojima, 1989); és a CaM III esetében 5'-ATGATGACTGCGAAGTGAAG, ami megfelel a 6. exon 7058-7077 bp szekvenciájának, és 5'-CAGGAGGAAGGAGAAAGAGC, ami megfelel a 6. exon 7228-7247 bp szekvenciájának (Nojima, 1989). A standard PCR reakció (1.5 mM $MgCl_2$, 30 µM dNTP keverék, 400 ng genomikus DNS és 20 pmol alsó és felső primer) 35 ciklusból állt (denaturálás: 94°C, 40 mp; "annealing": 55°C, 30 mp és "extenzió": 72°C, 30 mp). A PCR termékeket pcDNA3 vektorba szubklónoztuk, majd szekvenáltuk. Az antiszensz (a mRNS-sel komplementer) és szensz (a mRNS-sel azonos) cRNS próbákat a linearizált és tisztított vektorokról in vitro RNS szintézissel készítettük. A komplementer, antiszensz próbák hossza 225 bp (CaM I), 231 bp (CaM II) és 157 bp (CaM III) volt. A radioaktív jelölés céljából [^{35}S]UTPαS-t (1100 µCi/nmol) építettünk a cRNS próbákba. Az in vitro transzkripcióhoz a Riboprobe System-T7 és a Riboprobe System-SP6 rendszereket a gyártó leírása szerint használtuk. A jelölt próbákat a nem beépült nukleotidoktól Sephadex G-50 oszlopon gélszűréssel választottuk el; a próbák specifikus aktivitása 3.5-6.5x10^8 cpm/µg között volt.

In situ hibridizáció

A patkányagy koronasíkú kriosztát metszeteit szobahőmérsékleten 5 percig 4% formaldehidet tartalmazó 2 x SSC oldatban (0.3 M NaCl és 0.03 M Na-citrát, pH 7.0) fixáltuk (a fedőlemezre fixált sejttenyészetek a fixálást követő mosásnál kapcsolódtak az itt leírt protokollhoz), 2 x 1 percig 2 x SSC-ben mostuk, majd 0.1 M trietanolamint tartalmazó 0.25%-os ecetsavanhidrid oldatban szobahőmérsékleten 5 percig prehibridizáltuk. A mintákat dehidráltuk, levegőn megszárítottuk, majd 50 µl hibridizációs oldatban (50% formamid, 6 x SSPE /0.9 M NaCl, 60 mM Na_2HPO_4 és 6 mM EDTA, pH 7.4/, 5 x Denhardt-féle reagens, 10% dextrán szulfát, 0.1% SDS, 50 mM DTT, 100 µg/ml hering spermium DNS és 50 µg/ml élesztő tRNS) 2.5x10^5 cpm cRNS próbát adtunk hozzájuk. A mintákat parafilm fedőlemezekkel láttuk

el, majd párásított dobozokban 50°C-on 20 órán keresztül hibridizáltuk. Ezután a mintákat 2 x SSC/50% formamid oldatban szobahőmérsékleten 5 percig, majd kétszer 2 x SSC/50% formamid oldatban 50°C-on 10 percig, végül 2 x SSC-ben szobahőmérsékleten 5 percig mostuk. A mintákat ezután 1 x TE (0.01 M Tris és 0.001 M EDTA, pH 8.0) pufferben, 0.5 M NaCl és 16 µg/ml RNáz A jelenlétében 37°C-on 30 percig inkubáltuk, majd kétszer 2 x SSC/50% formamid oldatban 50°C-on 10 percig és 2 x SSC-ben 50°C-on 10 percig mostuk. Végül a mintákat dehidráltuk és levegőn megszárítottuk. A reprezentatív metszeteket toluidinkékkel, a sejttenyészeteket safraninnal festettük meg.

RNS tisztítás és Northern blot analízis

A minták teljes RNS tartalmát Chomczynski és Sacchi (1987) módszerével tisztítottuk. A fagyasztott agyszövetet jégen, guanidin izotiocianát oldatban (4 M guanidin izotiocianát, 25 mM Na-citrát, 0.5% laurilszarkozin és 0.1 M 2-merkaptoetanol, pH 7.0) homogenizáltuk, majd fenol-kloroform-izoamilalkohol elegyben extraháltuk. Az RNS-t izopropanollal precipitáltuk, majd visszaoldottuk a guanidin izotiocianát oldatba. Ezt követően újra kicsaptuk, 70% etanolban mostuk, végül RNáz mentes vízben oldottuk. Az RNS tartalmat és tisztaságot UV-spektrofotometriával (rendre 260 nm-en és 260/280 nm-en mért hányadosából) számítottuk. Az elektroforézishez az RNS-t 15% formaldehidet, 20% formamidot és 10 mM MOPS puffert (10 mM MOPS, 4 mM Na-acetát és 0.5 mM EDTA, pH 7.0) tartalmú oldatban 65°C-on 15 percig denaturáltuk, majd jégen lehűtöttük. Az RNS mintákat (3 µg/sáv) 20 mM guanidin izotiocianátot és 20 mM MOPS puffert tartalmazó, 1.2%-os agaróz gélen választottuk el (Goda és Minton, 1995). Az elektroforézist 20 mM MOPS pufferben 5 V/cm feszültség alatt szobahőmérsékleten 100 percig végeztük. Az RNS-t 75 Hgmm nyomás alatt 10 x SSC-ben Duralon-UV nylon membránra szűrtük (PosiBlot pressure blotter), majd UV-keresztkötéssel (120,000 µJ/cm^2; Stratalinker) a membránhoz kötöttük. A hibridizációt 60°C-on, 1.5x10^6 cpm/sáv [^{35}S]cRNS próba jelenlétében 3 ml hibridizációs pufferben (ugyanaz, mint az in situ hibridizációnál, de 0.5% SDS-t és 5 x Denhardt-féle reagenst tartalmaz) 20 óráig hibridizáltuk (HB-2D hybridiser). Intenzív mosás (2 x SSC, 0.5% SDS, szobahőmérséklet, 5 perc; 2 x SSC, 0.1% SDS, szobahőmérséklet, 20 perc; 0.1 x SSC, 0.5% SDS, 37 °C, 20 perc; 0.1 x SSC, 0.5% SDS, 65 °C, 40 perc; és 0.1 x SSC, szobahőmér-séklet, 20 perc) után a membránokat 37°C-on 30 percig szárítottuk.

Szövetpaszta standard

A felező radioaktivitásokat tartalmazó 12 db agypaszta standardot Davenport és mtsai.

(1988) módszere alapján készítettük. Hat patkányagyat a vértől megtisztítottunk, majd jégen homogenizáltunk. Két ml-es centrifugacsövekben 500 mg szövetpasztához 30 µl desztillált vízben oldott ismert mennyiségű [^{35}S]cRNS próbát adtunk, majd 10 perces keverést követően a csöveket -70°C-on lefagyasztottuk. A fagyott szövethengereket gyorsan, felolvadás nélkül kitoltuk a csövekből, majd előhűtött Cryomatrixba ágyaztuk és azonnal -70°C-on lefagyasztottuk. A standardokból Cr-Al-zselatin-kezelt tárgylemezekre 15 µm vastag kriosztát metszeteket vettünk fel. A standardok metszése során néhány reprezentatív metszetet a radioaktivitás későbbi meghatározása céljából szcintillációs koktélba tettünk. Az így elkészült, 12 standardból álló sorozat radioaktivitása kb. 2.2-5.28x10^3 cpm/mm^2 tartományt fedett le, megközelítőleg felező aktivitású szakaszokkal.

Membrán standard

A membrán standard kifejlesztése laboratóriumunkban történt (Palfi és mtsai., 1998); módszertani jellege miatt ebben a fejezetben tárgyaljuk. A 16 felező hígítást tartalmazó standard sorozatot (aktivitási tartomány: 0.5-1.6x10^4 cpm/mm^2) Sephadex G-50 oszlopon gélszűréssel tisztított [^{35}S]cRNS próbából készítettük. A radioaktív próbát RNáz mentes vízben hígítottuk, majd radioaktivitását folyadékszcintillációs készülékkel meghatároztuk. Mindegyik hígításból 50 µl-t dot blot eljárással vákuum alatt Duralon-UV nylon membránra szűrtük, majd a jelölt RNS molekulákat UV-keresztkötéssel (120,000 µJ/cm^2; Stratalinker) a membránhoz kötöttük. A membránokat ezt követően 37°C-on 30 percig szárítottuk. A 16 tagú membrán standard sorozatot a 12 tagú paszta standard sorozattal együtt autoradiográfiás filmre exponáltuk. A hibridizált szövetmetszetek méréséhez ugyanilyen módon készített, de csak 12 elemet tartalmazó membrán standard sorozatokat (aktivitási tartomány: 1-2000 cpm/mm^2) készítettünk.

A vákuumszűrés után a radioaktivitás membránhoz való kötődését az alábbiak szerint ellenőriztük. Ismert mennyiségű radioaktivitást kétféle módon (vákuumszűréssel vagy beitatással) vittünk fel a membránra, majd a membránok radioaktivitását folyadékszcintillációs készülékkel megmértük. Mivel a kétféle módon felvitt radioaktivitás membránkötött mennyiségei között nem volt szignifikáns különbség, a radioaktív molekulák megtartását a vákuumszűrés során 100%-osnak fogadtuk el.

A film autoradiográfiát leíró modell

A matematikai modellt laboratóriumunkban, a JATE Bolyai Intézete közreműködésével dolgoztuk ki (Palfi és mtsai., 1998); módszertani jellege miatt azonban ezt is ebben a fejezetben tárgyaljuk. A film expozíció során a fotoemulzió ezüstionjai a sugárzás elnyelése közben

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 13.

ezüstatomokká redukálódnak. A film előhívása során további ezüstionok redukciója megy végbe, elsődlegesen azokon a helyeken, ahol az előzetes besugárzás révén már ezüstatomok voltak jelen. Így az előhívást követően a besugárzott terület a fémezüst jelenléte miatt szürke. A szürkeség arányos az expozíció során redukált ezüstionok mennyiségével, ez pedig a radioaktív besugárzás mértékével.

Exponáljuk a filmet egy homogén radioaktív sugárforrással (a következő állítások a besugárzott területre vonatkoznak), és tételezzük fel, hogy az ezüstionok mennyiségének t időpillanatban, egységnyi idő alatt bekövetkező csökkenése arányos az ezüstionok koncentrációjával és a sugárzás intenzitásával. $E(t)$ jelölje t időpillanatban az ezüstionok koncentrációját. A $[t,t+\Delta t]$ időintervallumban Δt kis értékeire igaz, hogy

$$E(t+\Delta t) - E(t) = -cE(t)x\Delta t \qquad (1)$$

ahol x a sugárzás intenzitása (cpm/mm^2, itt az egyszerűség kedvéért konstansnak tekintjük; az általános eset, amikor x az idővel csökken, később kerül tárgyalásra) és c a filmtől és a kísérleti körülményektől függő konstans. Δt-vel osztva és a határátmenet műveletét alkalmazva ($\Delta t \to 0$) a következő differenciálegyenletet kapjuk:

$$\frac{dE(t)}{dt} = -cxE(t) \qquad (2)$$

$E(t)$-vel osztva és a $[0,t']$ intervallumon integrálva (t' az expozíció ideje) a

$$\ln E(t') - \ln E(0) = -ct'x$$

formula adódik. A formulát a természetes alapú hatványra emelve kapjuk:

$$E(t') = E(0)\exp[-ct'x] \qquad (3)$$

Ezért, ha C az expozíció végén jelenlevő ezüstatomok moláris koncentrációját jelenti, akkor

$$C = E(0) - E(t') = E(0)\{1 - \exp[-ct'x]\}$$

Mivel C nem mérhető közvetlenül (de arányos a film szürkeségével), helyette az előhívott film szürkeségét (homogénnek feltételezve) fényáteresztése alapján, mikrodenzitometriával határozzuk meg. A film fényáteresztő képességét az opacitása jellemzi (O; $O = L_i/L_o$, ahol L_i a beeső fény és L_o az áteresztett fény). Beer-Lambert törvénye szerint $O = 10^{c_1 C}$ (c_1 konstans). A fényáteresztés és C közötti összefüggés linearizálása érdekében az OD fogalmát használják:

$$\mathrm{OD} = \log_{10}(O) = c_1 C$$

Amikor 256-szürke árnyalat megkülönböztetésére alkalmas digitalizálót használnak, a fényáteresztés méréséhez a szürkeséget szürke értékben (gray value, GV) lineáris skálán, 0 (fehér) és 255 (fekete) közötti értékekben adják meg. A GV átalakítható "OD-szerű" értékké, ez a relatív optikai denzitás (ROD; Baskin és Stahl, 1993):

$$\mathrm{ROD} = \log_{10}\frac{255}{255 - \mathrm{GV}}$$

A ROD egységek hasonló log-reciprok kapcsolatban állnak a fényáteresztéssel, mint a valódi OD értékek. A ROD és az OD görbék illeszkedése a 0.05-2.4 OD tartományban nagyon jó ($r^2 = 0.997$; Baskin és Stahl, 1993), ezért gyakorlati szempontból a nagyon sötét és a nagyon világos értékek kivételével a ROD használható az OD helyett, így

$$\begin{aligned} \mathrm{ROD} &= c_2 C \\ &= c_2 E(0)\{1-\exp[-ct'\,x]\} \\ &= p_1(1-\exp[-p_2 x]) \end{aligned}$$

ahol c_2 konstans. A p_1 paraméter $= c_2 E(0)$ elsődlegesen az ezüstionok kezdeti koncentrációjától $/E(0)/$ és az előhívás körülményeitől függ. A p_2 paraméter $= ct'$ függ a felhasznált izotóptól, a sugárzás minta általi kioltásától, a filmtől, az expozíciós időtől és más kísérleti körülményektől.

Összegezve, az autoradiográfiás adatok interpolálására a következő nemlineáris regressziót használhatjuk:

$$\mathrm{ROD} = p_1(1-\exp[-p_2 x]) \tag{4}$$

A matematikai modell általánosítása

Amikor az expozíciós idő az izotóp felezési idejéhez ($T_{1/2}$) viszonyítva nem elhanyagolható, a radioaktivitás (x) jelentősen változik az $x(t) = x(0)\exp[-\lambda t]$ összefüggés szerint, ahol λ a radioaktív bomlási paraméter ($\lambda = \ln 2/T_{1/2}$). Ha a film expozíciója $t = 0$ időpillanatban kezdődik és $x(0)$ jelöli a radioaktivitást az expozíció kezdetén, akkor az (1) formula az alábbi formát ölti:

$$E(t+\Delta t) - E(t) = -cE(t)\int_{t}^{t+\Delta t} x(0)\exp[-\lambda s]ds \tag{1*}$$

Az (1)-(4) formulák matematikai átalakításainak megfelelő operációkat elvégezve az (1*) egyenletből levezetve kapjuk a

$$\mathrm{ROD} = p_1(1-\exp[-p_2 \frac{1-\exp[-\lambda t']}{\lambda t'} x(0)]) \tag{4*}$$

egyenletet, ahol $p_1 = c_2 E(0)$ és $p_2 = ct'$.

A (4*) egyenlet tehát lehetővé teszi a szenzitometrikus görbék általános körülmények közötti meghatározását. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy a (4) egyenletet akkor is használhatjuk a (4*) helyett, ha az expozíciós idő összemérhető a $T_{1/2}$-vel, feltéve, hogy az összes mintát és standardot egyszerre, azonos ideig exponáljuk.

A membrán standard sorozat kalibrálása szövet-ekvivalens radioaktivitásra

Mivel a (4) egyenletben a paraméterek ismert függvényei a résztvevő anyagok (pl. film, hívó, fixáló) jellemzőinek és a kísérleti körülményeknek, a különböző szenzitometrikus görbék egymásba történő transzformációja is elvégezhető.

Határozzuk meg a szövetpaszta standard (b) és a membrán standard (m) szenzitometrikus

görbéi közötti összefüggést. Exponáljuk ugyanarra a filmre a két standard sorozatot, hívjuk elő a filmet, értékeljük ki az autoradiográfiás adatokat, és a (4) egyenlet segítségével illesszünk görbét a két sorozat pontjaira. Mivel a p_1 paraméter csak a filmtől és az előhívás körülményeitől függ, ezért a két paraméter a két egyenletben megegyezik, $p_1^b = p_1^m$. Továbbá, mivel a két adatsort azonos körülmények között szereztük, a p_2^b és a p_2^m paraméterekbe foglalt összes faktor, kivéve a kioltást, azonos. Ezért a két szenzitometrikus görbe közötti különbség az itt bevezetendő transzformációs hányados (γ) segítségével kifejezhető:

$$\gamma = p_2^b / p_2^m = c^b t' / c^m t' = c^b / c^m$$

Az adott kísérleti körülmények között előre meghatározott γ érték segítségével az adott kísérleti körülmények megtartása mellett tehát a további membrán standard sorozatok (z) regressziós egyenletei /ROD = $p_1^z(1 - \exp[-p_2^z x])$/ könnyen és megbízhatóan transzformálhatók a megfelelő szövetpaszta standardokkal ekvivalens egyenletekké a $p_2^b = \gamma p_2^z$ összefüggés segítségével. Így kapjuk a ROD = $p_1^z(1 - \exp[-\gamma p_2^z x]$ egyenleteket, amelyek membrán standard sorozatok adatain alapulnak, de már szövet-ekvivalens radioaktivitásra vonatkoznak.

Autoradiográfia

A szövet metszeteket, a szövetpaszta és a membrán standard sorozatokat, valamint a Northern blottokat 4°C-on 36 órán keresztül Hyperfilm-βmax autoradiográfiás filmre exponáltuk. Ezt követően a metszetek egy részét és a sejttenyészeteket a β-sugárzásra érzékeny Hypercoat emulzióval vontuk be és 4°C-on 10-30 napig exponáltuk. A filmeket és az emulzióval bevont mintákat az expozíció végén 19°C-on rendre 3.5 és 5 percig Kodak D19 hívóban (Kodak) hívtuk, majd szintén 19°C-on 10 percig Kodak fixálóban fixáltuk.

Film denzitometria

Az autoradiográfiás filmeket nagy feloldású (600x600 dpi, pixel méret 42x42 μm), 8-bites, 256 GV mikrodenzitometriával (Microtek II HR) digitalizáltuk. Az autoradiogrammok videojeleit a NIH Image 1.59 (Rasband, 1997) program segítségével analizáltuk. Nulla és 255 közötti GV-t rendeltünk az autoradiográfiás képek általunk kiválasztott részleteihez (a kiválasztott rész homogén szürkeségét feltételeztük). A hátteret (kevesebb, mint 20 GV) levontuk és a megfelelő ROD értékeket meghatároztuk. A szövetpaszta standardokról és a szövet metszetekről feltételeztük, hogy bennük az azonos koncentrációjú radioaktivitás az autoradiogrammokon azonos GV értéket eredményez (Davenport és mtsai., 1988; Kuhar és Unnerstall, 1985).

A szövetpaszta és a membrán standard sorozatok elemeinek képeit a képernyőn kijelöltük,

s a hozzájuk tartozó területeket és GV értékeket meghatároztuk. A GV értékekből a hátteret levontuk, kiszámoltuk a ROD értékeket, majd 3-4 független értéket átlagoltunk. A radioaktivitás/pixel ± SD és a ROD ± SD értékeket grafikusan ábrázoltuk, majd a (4) egyenletet felhasználva nemlineáris regresszió segítségével görbéket illesztettünk az adatsorokra, és a γ értéket meghatároztuk. Ezt követően az in situ hibridizációkban használt membrán standardokat az előre meghatározott γ érték segítségével az aktuális szövet-ekvivalens radioaktivitásokra kalibráltuk.

Az in situ hibridizációs kísérletek autoradiogrammjait a kalibrált membrán standard sorozatok segítségével kvantifikáltuk. A toluidinkék festés alapján anatómiailag azonosított agyterületek (Paxinos és Watson, 1998) film háttérre javított ROD értékeit a standardokhoz hasonlóan határoztuk meg (a nemspecifikus hibridizáció nem volt elkülöníthető a film háttértől). A különböző kísérletekben legalább 5 állat tartozott a kísérlet szempontjából azonos csoportba. Minden állatban az adott agyterületen 2 független mérést végeztünk. Az azonos csoportba tartozó állatok adott agyterületre vonatkozó ROD értékeit átlagoltuk, majd a koexponált membrán standard sorozat szövet-ekvivalens egyenletével interpolálva az átlagolt ROD értékekhez tartozó radioaktivitás/pixel értékeket meghatároztuk. Az agyterületek mRNS tartalmát a következő egyenlet szerint számoltuk:

$$\text{RNS kópiaszám/mm}^3 = \frac{\text{radioaktivitás (cpm/pixel)}}{\text{próba specifikus aktivitás (cpm/mol)}} \times \text{Avogadro sz.} \times f$$

ahol az Avogadro sz. = 6.022510^{23} és f = 37792.9 a pixel térfogatot (42 µm x 42 µm x 15 µm) 1 mm^3 térfogatra felszorzó korrekciós faktor. A végeredményt 1 mm^3 térfogatra vonatkoztatott mRNS kópiaszám ± SD értékben adtuk meg.

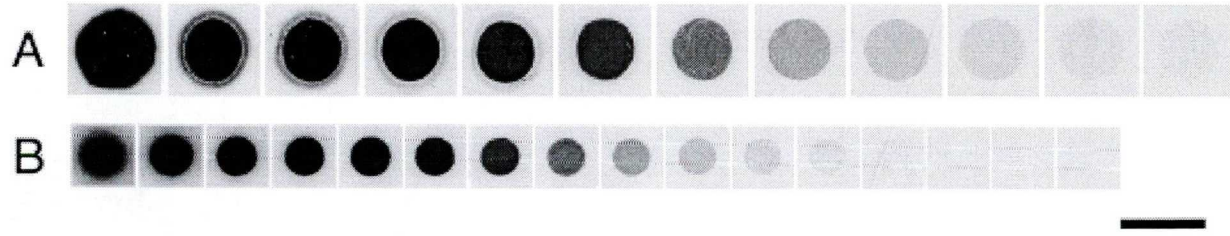
Adatkezelés, statisztika és mikroszkópia

A nemlineáris regressziós analízist a Statgraphics 6.0 (Manugistics) program segítségével végeztük. A további számításokhoz az Excel 5.0a (Microsoft) programot használtuk. A szignifikancia analízishez a Student-féle t-tesztet (2-mintás, két csoport azonos varianciával) alkalmaztuk. Az összehasonlított agyterületek mRNS kópiaszámaiban fennálló különbségeket akkor fogadtuk el szignifikánsnak, ha a p érték kisebb volt, mint 0.01.

Az emulzióval bevont, felülfestett metszeteket és sejttenyészeteket szobahőmérsékleten 1 napig szárítottuk, majd entellánnal lefedtük. A mintákat Leica DM LB mikroszkóp segítségével fényes és sötét látótérben vizsgáltuk. A mikroszkópi képeket (1600 x 1200 pixel, 8-bit) Polaroid DMC 1 digitális mikroszkóp kamerával készítettük. Az autoradiogrammokon (film, vagy emulzióval bevont tárgylemez) az anatómiailag definiált agyterületeket (Paxinos és Watson, 1998) a toluidinkékkel festett metszetek alapján azonosítottuk.

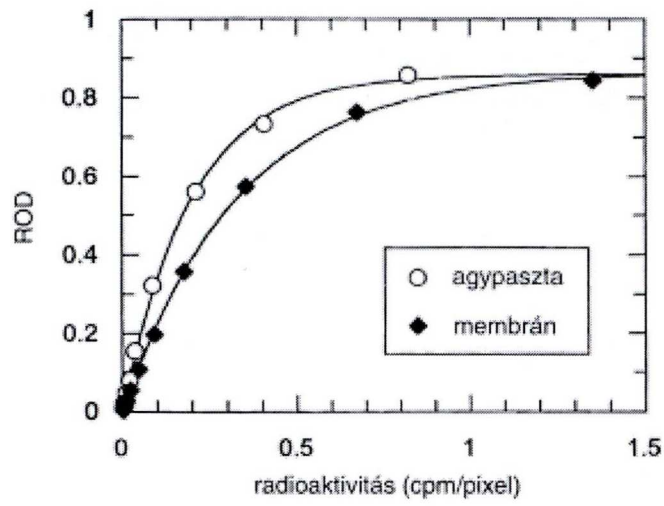
A [^{35}S]-membrán standard sorozat kalibrálása szövet-ekvivalens radioaktvitásra és felhasználása a CaM in situ hibridizáció kvantifikálására

A [^{35}S]-membrán standard sorozat kalibrálását szövet-ekvivalens radioaktivitásra az általunk kidolgozott exponenciális egyenlet felhasználásával végeztük (Palfi és mtsai., 1998). Az 1. Ábra a radioaktív agypaszta (A) és membrán standard (B) sorozatok tipikus autoradiográfiás képét mutatja. A standardok minden egyes tagjához tartozó autoradiogrammon meghatároztuk annak ROD értékét és területét, majd mindkét sorozat adatainak regressziós analíziséhez a (4) egyenletet alkalmaztuk. Mindkét sorozat esetében a görbék illeszkedésének jóságát a 0-0.85 ROD intervallumon (0-240 GV) az $r^2 \geq 0.999$ értékek jelzik (2. Ábra). Az ebbe a tartományba eső adatpontok felhasználásával meghatároztuk a paramétereket, amelyek a membrán standard sorozat esetében $p_1^m = 0.8657$ és $p_2^m = 3.0252$, az agypaszta sorozat esetében pedig $p_1^b = 0.8590$ és $p_2^b = 5.0702$ értékeket adtak. Az exponenciális modell helyességét bizonyítja, hogy a p_1 értékek kevesebb, mint 1%-ban különböztek egymástól. A transzformációs hányados értéke, $\gamma = p_2^b / p_2^m = 1.676$, azt mutatja, hogy a β-sugárzás elnyelése a membránban magasabb, mint az agypasztában. A γ értéket különböző standard sorozat párokkal meghatározva az előbbivel nagyon hasonló értékek adódtak.



1. Ábra. Reprezentatív [^{35}S]-jelölt agypaszta és [^{35}S]-jelölt nylon membrán standard sorozatok autoradiográfiás képe. (A) Az agyhomogenátumot csökkenő mennyiségű radioaktív cRNS próbával kevertük össze, majd lefagyasztottuk. A metszetek egy részét tárgylemezre vettük fel, másik részében folyadékszcintillációs méréssel meghatároztuk az aktuális radioaktivitást. A standard sorozat elemeinek radioaktivitása megközelítőleg felező aktivitásokat tartalmaz, amelyek a 2.2-5.28x10^3 cpm/mm^2 tartományba esnek. (B) Gélkromatográfiával tisztított [^{35}S]cRNS próbából felező hígításokat készítettünk, majd azok radioaktivitását folyadékszcintillációs méréssel meghatároztuk. A hígításokat nylon membránra dot-blottoltuk (0.5-1.6x10^4 cpm/mm^2), majd UV-keresztkötéssel a membránhoz rögzítettük. Mind az agypaszta, mind a membrán standard sorozatokat megszárítottuk, majd Hyperfilm-βmax autoradiográfiás filmre 4°C-on 36 óráig koexponáltuk. Vonal = 10 mm.

A transzformációs hányadossal kalibrált szövet-ekvivalens membrán standardok kvantitatív autoradiográfiában történő felhasználását a 3 CaM gén mRNS populációinak patkányagyban történő összehasonlító vizsgálatával demonstráltuk (Palfi és mtsai., 1998). A koronasíkú agymetszeteket CaM I-, CaM II- és CaM III-specifikus [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizáltuk, majd



2. Ábra. A membrán standard sorozat kalibrálása az agypaszta standard sorozatra. A membrán és az agypaszta standard sorozatok autoradiogrammjait digitalizáltuk, az egyes elemekhez tartozó ROD és terület értékeket meghatároztuk (3-4 független mérés eredményeit átlagoltuk), majd az adatsorokra a 0-0.85 ROD tartományban a (4) egyenlet segítségével görbéket illesztettünk. A standard hibát jelölő vonalak (95%-os konfidencia határ mellet) a pontokat jelölő szimbólumokon belül vannak. A $\mathrm{ROD} = p_1(1-\exp[-p_2 x])$ egyenlethez tartozó paraméter értékek a következők voltak: a membrán standard esetében $p_1^m = 0.8657$ és $p_2^m = 3.0252$; az agypaszta esetében pedig $p_1^b = 0.8590$ és $p_2^b = 5.0702$ ($r^2 \geq 0.999$).

a membrán standard sorozatokkal együtt autoradiográfiás filmre exponáltuk. Ezekben a kísérletekben összesen 18 filmet és a hozzájuk tartozó 18 standard sorozatot használtunk fel. A membrán standard sorozatok adataihoz tartozó regressziós egyenletek paramétereit (p_1^m és p_2^m; $r^2 > 0.9995$) meghatároztuk, s a p_2^m értékeket a $p_2^b = \gamma p_2^m$ (b: agypaszta) egyenlet alapján szövet-ekvivalens formába hoztuk. A koexponált metszetek definiált agyterületeiben mért ROD értékek közelítéséhez és interpolálásához, valamint az azoknak megfelelő radioaktivitás értékek meghatározásához az ilymódon transzformált egyenleteket:

$$\mathrm{ROD} = p_1^m(1-\exp[-\gamma p_2^m x])$$

használtuk. A módszer alkalmazhatóságát bizonyítja, hogy a 18 standard sorozat paraméter értékei kis varianciát mutattak: $p_1^m = 0.8528 \pm 0.0188$ (átlag ± SD) és $p_2^m = 3.3414 \pm 0.2227$ (átlag ± SD).

Kvantifikációs módszerünket az alábbiakban foglaljuk össze:

1. A membrán standard sorozat kalibrációja szövet-ekvivalens radioaktivitásra
   1.1. A vizsgálni kívánt szövetből radioaktív paszta standard sorozat készítése
   1.2. Membrán standard sorozat készítése (a két sorozat radioaktivitás értékeinek azonos tartományt kell lefednie)
   1.3. A két standard sorozat koexpozíciója autoradiográfiás filmre a kísérleti metszetek expozíciós idejének megfelelő ideig
   1.4. A film előhívása, a sorozatelemekhez tartozó autoradiogrammok GV és terület értékeinek meghatározása, ezekből a ROD és az egységnyi területre eső radioaktivitások kiszámítása

1.5. Az adatsorok regressziós analízise a (4) egyenlet felhasználásával. A p_1^m, p_1^b, p_2^m és p_2^b (m: membrán és b: szövetpaszta) értékek meghatározása és a $\gamma = p_2^b / p_2^m$ kiszámítása

2. A kísérleti metszetek vizsgált területeihez tartozó radioaktivitások kvantifikációja

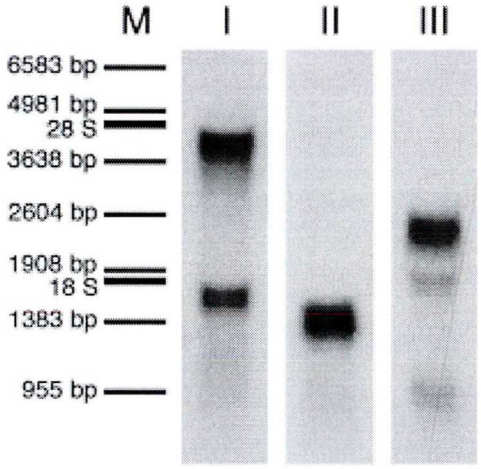
2.1. Membrán standard sorozatok készítése

2.2. Az 1.3. körülményeinek megtartása mellett a membrán standard sorozatok és a kísérleti metszetek autoradiográfiás filmre történő koexpozíciója

2.3. Az 1.4. körülményeinek megtartása mellett a filmek előhívása, a standardok és a kísérleti metszetek autoradiográfiás adatainak kiértékelése (a terület meghatározása az agyterületeken nem szükséges)

2.4. A standard sorozatok regressziós analízise a (4) egyenlet segítségével, a p_1^m és p_2^m értékek meghatározása, valamint a $p_2^b = \gamma p_2^m$ képzése az 1.5-ben meghatározott γ értékkel

2.5. A szövet metszetek meghatározott területeihez kötött radioaktivitások meghatározása a $\mathrm{ROD} = p_1^m(1 - \exp[-\gamma p_2^m x])$ egyenletek segítségével



3. Ábra. A CaM mRNS-ek Northern blot analízise a patkányagyban. A patkány agykéregből származó teljes RNS-t (3 µg/sáv) elektroforetikusan elválasztottuk, nylon membránra blottoltuk, majd különkülön CaM I- (I membrán), CaM II- (II membrán) és CaM III- (III membrán) specifikus antiszensz [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizáltuk, végül autoradiográfiás filmre exponáltuk. A CaM I esetében 2 (4.0 kb és 1.7 kb), a CaM II esetében 1 (1.4 kb) és a CaM III esetében 3 transzkriptumot (2.3 kb, 1.9 kb és 0.9 kb) detektáltunk. Az M sáv RNS markerek (18 S, 28 S) és az rRNS-ek pozícióját mutatja ugyanannak a membránnak etídium bromiddal történő festése alapján.

A CaM in situ hibridizáció kontroll kísérletei

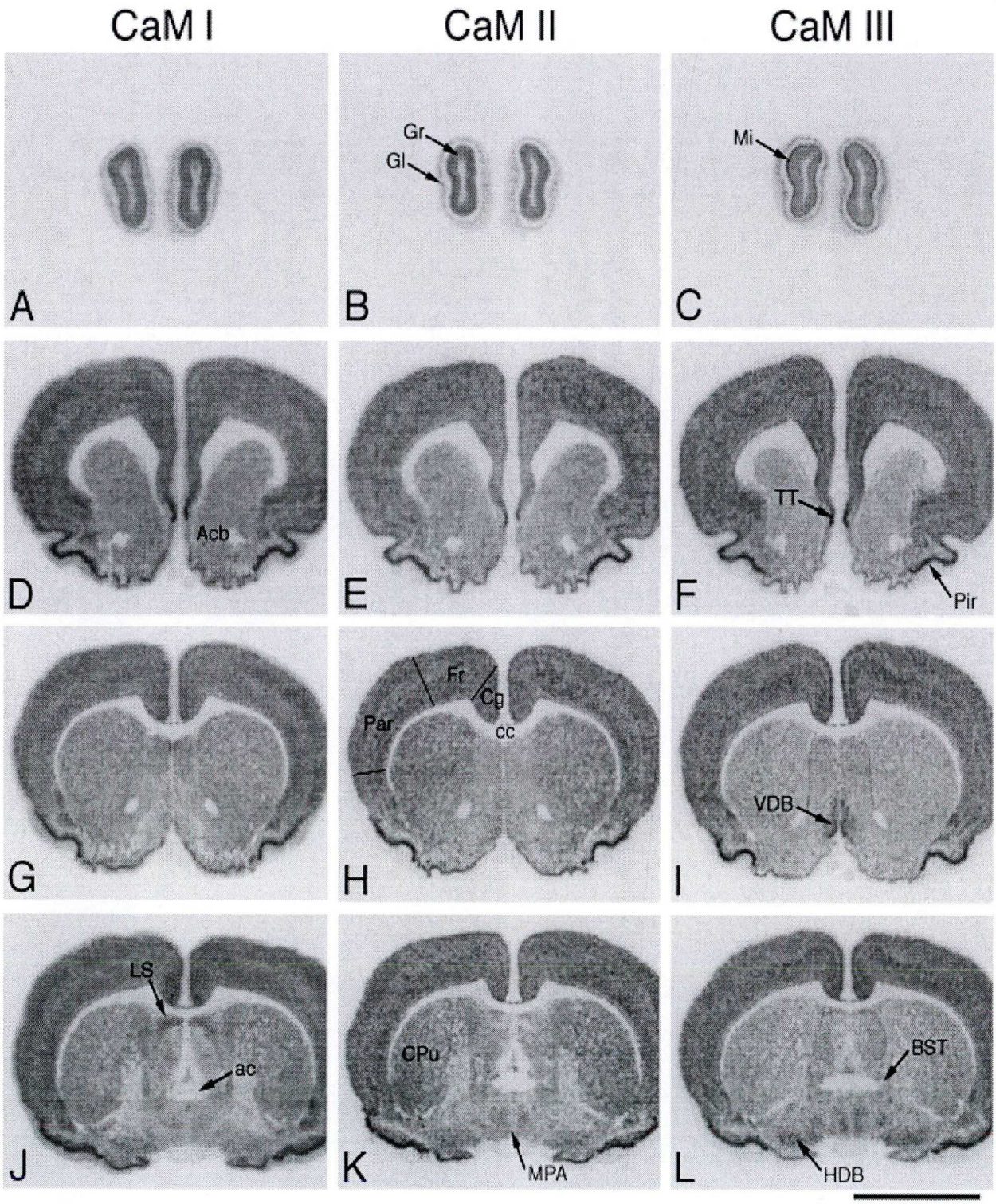
A CaM I, II és III próbák specificitása várható volt, hiszen a kiválasztott szekvenciák sem egymással, sem bármilyen más szekvenciával nem mutattak szignifikáns homológiát. A

patkányagyból készített teljes RNS Northern blot analízise a CaM I esetében 2 (4.0 kb és 1.7 kb), a CaM II esetében 1 (1.4 kb), a CaM III esetében 3 transzkriptumot (2.3 kb, 1.9 kb és 0.9 kb) mutatott ki (3. Ábra). A szensz próbákkal hibridizálva az autoradiogrammokon jelölődés nem volt megfigyelhető (ábrán nem mutatjuk). Az agymetszeteket antiszensz próbákkal hibridizálva egyedi és specifikus megoszlást figyeltünk meg, ugyanakkor a szensz próbák esetében csak nagyon gyenge, nem specifikus megoszlás volt detektálható (12.E Ábra). A metszetek RNáz A-val történő előkezelése az antiszensz hibridizáció gyakorlatilag teljes elvesztésével járt együtt (ábrán nem mutatjuk).

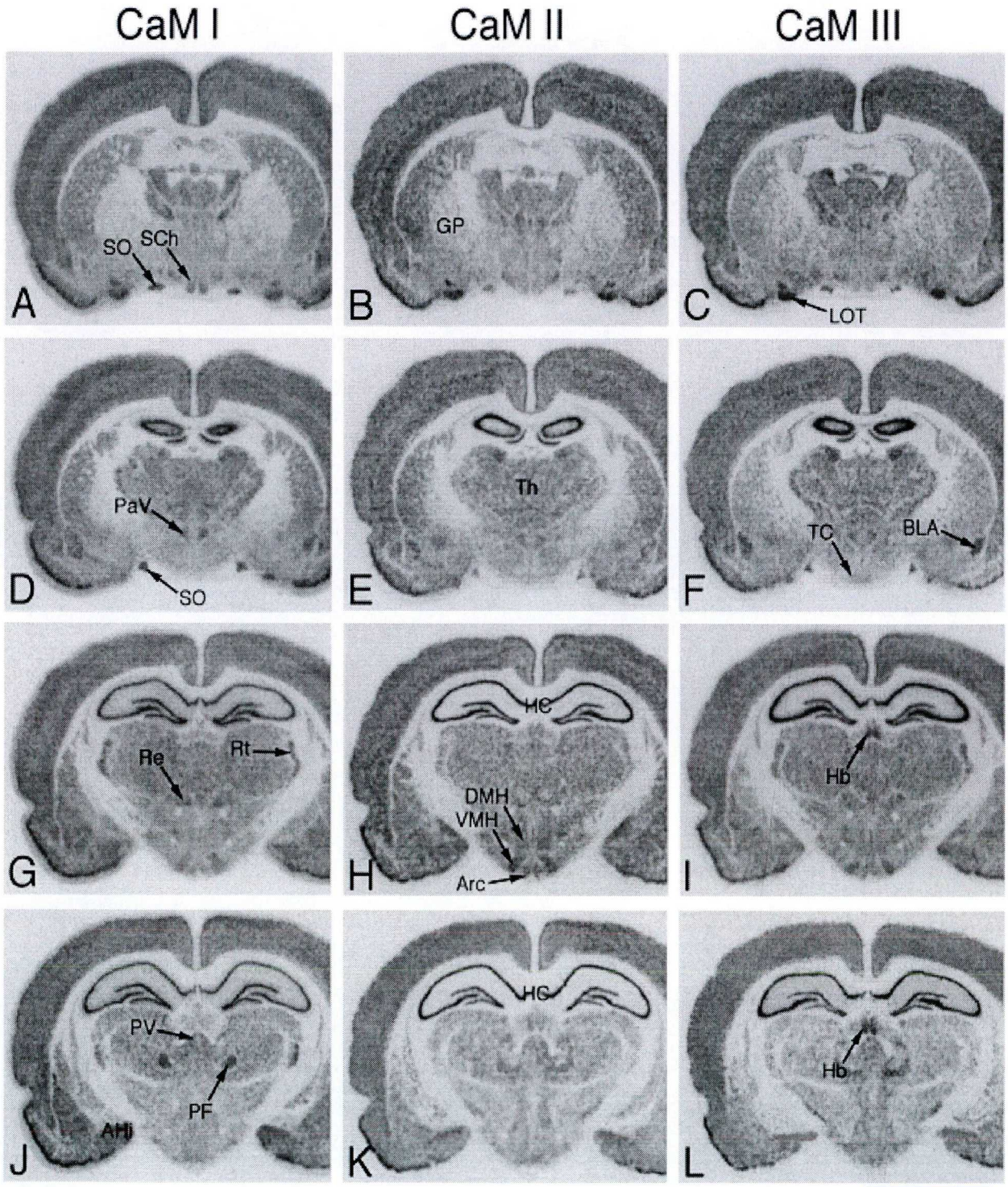
A CaM mRNS-ek kvantitatív megoszlása a felnőtt patkányagyban

A 3 CaM gén expressziója a patkányagy minden részében megfigyelhető volt (4-6. Ábrák, 1. Táblázat). A CaM mRNS-ek legnagyobb mennyiségben a neuronok sejttestjeiben gazdag szürkeállományban voltak jelen, a fehérállományban sokkal kisebb mennyiségben fordultak elő. Az egyes CaM génekhez tartozó mRNS-ek bazális mennyisége és területi megoszlásuk mintázata általában hasonló volt, bár számos agyterületen jelentős, statisztikailag szignifikáns különbséget találtunk. Az alábbiak a 3 CaM gén mRNS-einek részletes, kvantitatív és sejtszintű megoszlását adják a felnőtt patkányagyban élettani körülmények között (Palfi és mtsai., 1999b).

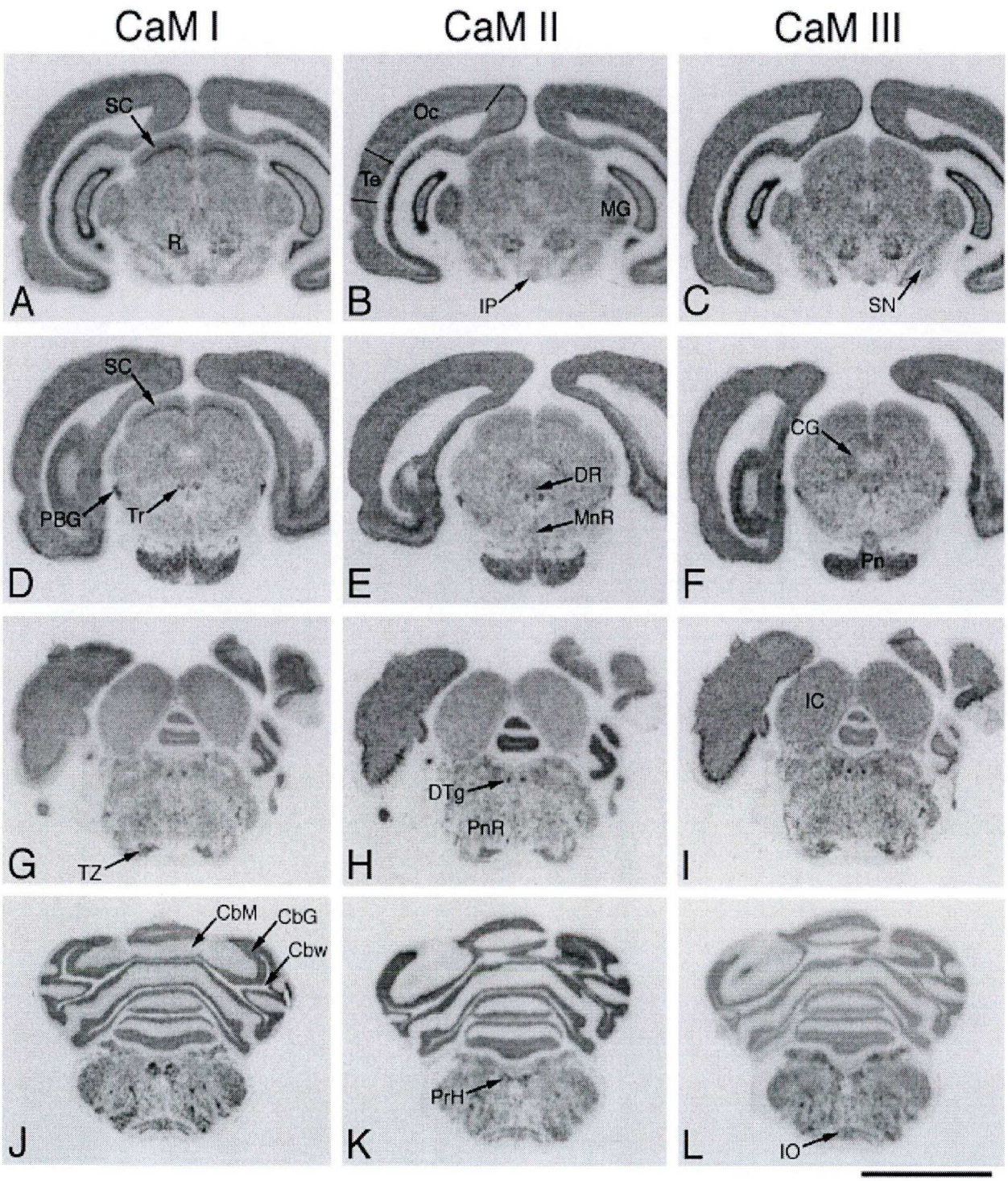
Bulbus olfactorius. A CaM gének ebben a régióban erősen és differenciáltan expresszálódtak (4.A-4.C Ábrák; 1. Táblázat). A CaM mRNS-ek viszonylag nagy mennyiségben voltak jelen a granuláris és mitrális sejtek rétegeiben. Ezeken a területeken a CaM I és a CaM II mRNS mennyisége hasonló volt, viszont a CaM III mRNS-ekből több volt a mitrális sejt rétegben és kevesebb a granuláris sejt rétegben (7.A-7.C Ábrák). A glomeruláris rétegben alacsonyabb hibridizációs jelet detektáltunk; a CaM I és a CaM II mRNS-ek mennyisége hasonló, a CaM III mRNS-eké azonban szignifikánsan magasabb volt. A bulbusban a legalacsonyabb expressziót a külső plexiform rétegben mértük, ahol a transzkriptumok többsége a CaM I és a CaM III génekhez tartozott. Ezen a területen diffúz és pontszerű (egyértelműen sejttestekhez tartozó) jelölődés is megfigyelhető volt.



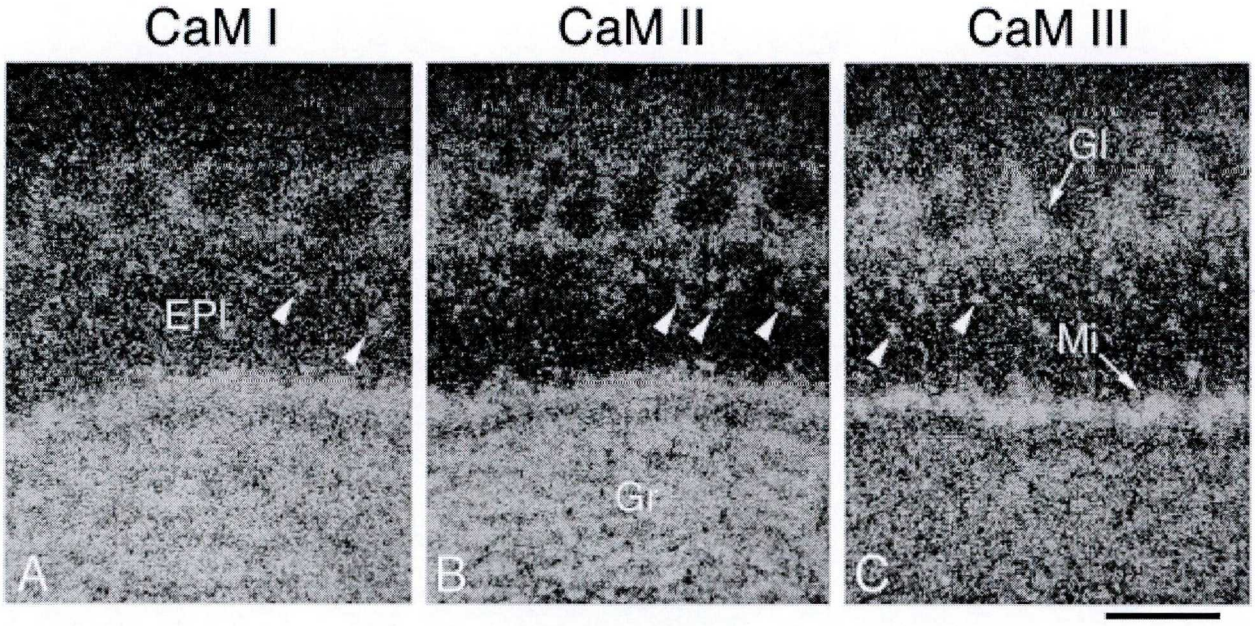
4. Ábra. A CaM mRNS-ek megoszlásának in situ hibridizációs analízise a felnőtt patkányagyban (rostralis rész). A koronasíkú kriosztát metszeteket a Bregma 6.7 mm (A-C), 2.2 mm (D-F), 0.7 mm (G-I) és -0.4 mm (J-L) magasságokban készítettük, majd CaM I- (A, D, G, J), CaM II- (B, E, H, K) és CaM III- (C, F, I, L) specifikus antiszensz [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizáltuk. Az ábra reprezentatív jelölt metszetek pozitív film autoradiogrammjait mutatja, ahol a sötétebb területekhez erősebb hibridizációs szignál tartozik. ac, commissura anterior; Acb, nucleus accumbens; BST, nucleus interstitialis striae terminalis; cc, corpus callosum; Cg, cinguláris cortex; CPu, nucleus caudatus-putamen; Fr, frontális cortex; Gl, glomeruláris réteg, bulbus olfactorius; Gr, granuláris sejt réteg, bulbus olfactorius; HDB, horizontális kar, nucleus tractus diagonalis; LS, nucleus septalis lateralis; Mi, mitrális sejt réteg, bulbus olfactorius; MPA, nucleus preopticus medialis; Par, parietális cortex; Pir, cortex piriformis; TT, tenia tecta; VDB, vertikális kar, nucleus tractus diagonalis. Vonal = 5 mm.



5. Ábra. A CaM mRNS-ek megoszlásának in situ hibridizációs analízise a felnőtt patkányagyban (középső rész). A koronasíkú kriosztát metszeteket a Bregma -1.1 mm (A-C), -2.1 mm (D-F), -3.1 mm (G-I) és -3.8 mm (J-L) magasságokban készítettük, majd CaM I- (A, D, G, J), CaM II- (B, E, H, K) és CaM III- (C, F, I, L) specifikus antiszensz [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizáltuk. Az ábra reprezentatív jelölt metszetek pozitív film autoradiogrammjait mutatja, ahol a sötétebb területekhez erősebb hibridizációs szignál tartozik. AHi, amygdalo-hippocampalis terület; Arc, nucleus arcuatus; BLA, nucleus amygdaloideus basalis lateralis; DMH, nucleus dorsomedialis hypothalami; GP, globus pallidus; Hb, nucleus habenulae; HC, hippocampus; SO, nucleus supraopticus; LOT, nucleus tractus olfactorii lateralis; PaV, nucleus paraventricularis hypothalami; PF, nucleus parafascicularis thalami; PV, nucleus paraventricularis thalami; Re, nucleus reuniens thalami; Rt, nucleus reticularis thalami; SCh, nucleus suprachiasmaticus; TC, tuber cinereum; Th, thalamus; VMH, nucleus ventromedialis hypothalami. Vonal = 5 mm.



6. Ábra. A CaM mRNS-ek megoszlásának in situ hibridizációs analízise a felnőtt patkányagyban (caudalis rész). A koronasíkú kriosztát metszeteket a Bregma -6.0 mm (A-C), -7.3 mm (D-F), -9.2 mm (G-I) és -12.3 mm (J-L) magasságokban készítettük, majd CaM I- (A, D, G, J), CaM II- (B, E, H, K) és CaM III- (C, F, I, L) specifikus antiszensz [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizáltuk. Az ábra reprezentatív jelölt metszetek pozitív film autoradiogrammjait mutatja, ahol a sötétebb területekhez erősebb hibridizációs szignál tartozik. CbG, kisagyi glomeruláris sejt réteg; CbM, kisagyi molekuláris réteg; Cbw, kisagyi fehérállomány; CG, substantia grisea centralis; DR, nucleus raphe dorsalis; DTg, nucleus tegmenti dorsalis; IC, colliculus inferior; IO, oliva inferior; IP, nucleus interpeduncularis; MG, corpus geniculatum mediale; MnR, nucleus raphe medialis; Oc, occipitális cortex; PBG, nucleus parabigeminalis; Pn, nuclei ponti; PnR, nucleus reticularis pontis; PrH, nucleus prepositus hypoglossi; R, nucleus ruber; SC, colliculus superior; SN, substantia nigra; Te, temporális cortex; Tr, nucleus trochlearis; TZ, corpus trapezoideum. Vonal = 5 mm.

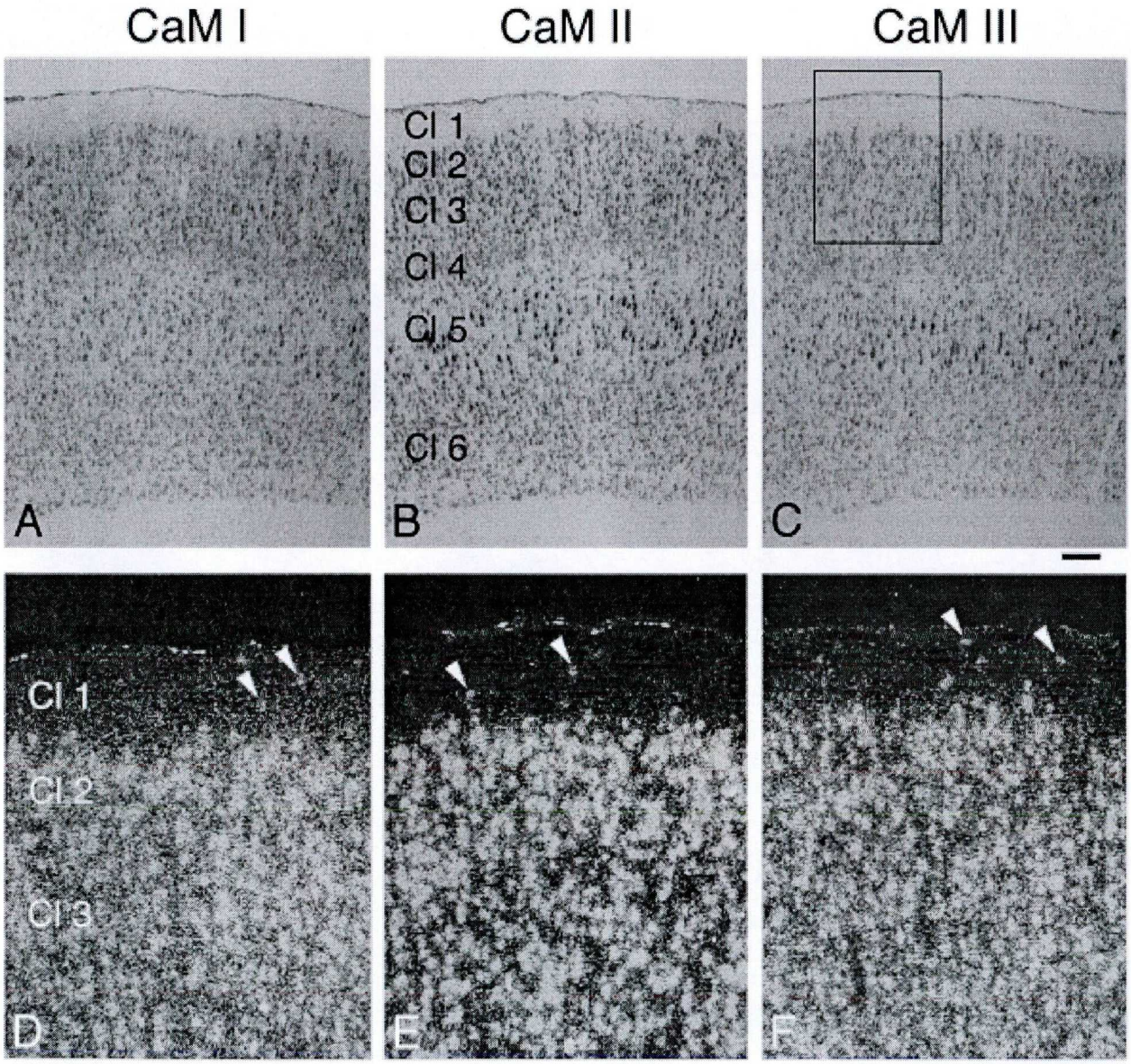


7. Ábra. A CaM mRNS-ek megoszlása és sejtes lokalizációja a felnőtt patkány bulbus olfactoriusban. A koronasíkú kriosztát metszeteket a Bregma -6.0 mm magasságban készítettük, majd CaM I- (A), CaM II- (B) és CaM III- (C) specifikus antiszensz [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizáltuk. Az ábra reprezentatív jelölt metszetek emulzió autoradiográfiás képét sötét látótérben mutatja, ahol a világosabb területekhez erősebb hibridizációs szignál tartozik. EPl, külső plexiform réteg, bulbus olfactorius; Gl, glomeruláris réteg, bulbus olfactorius; Gr, granuláris sejt réteg, bulbus olfactorius; Mi, mitrális sejt réteg, bulbus olfactorius. A nyílhegyek a külső plexiform réteg sejttestjeihez tartozó jelölődést mutatják. Vonal = 200 μm.

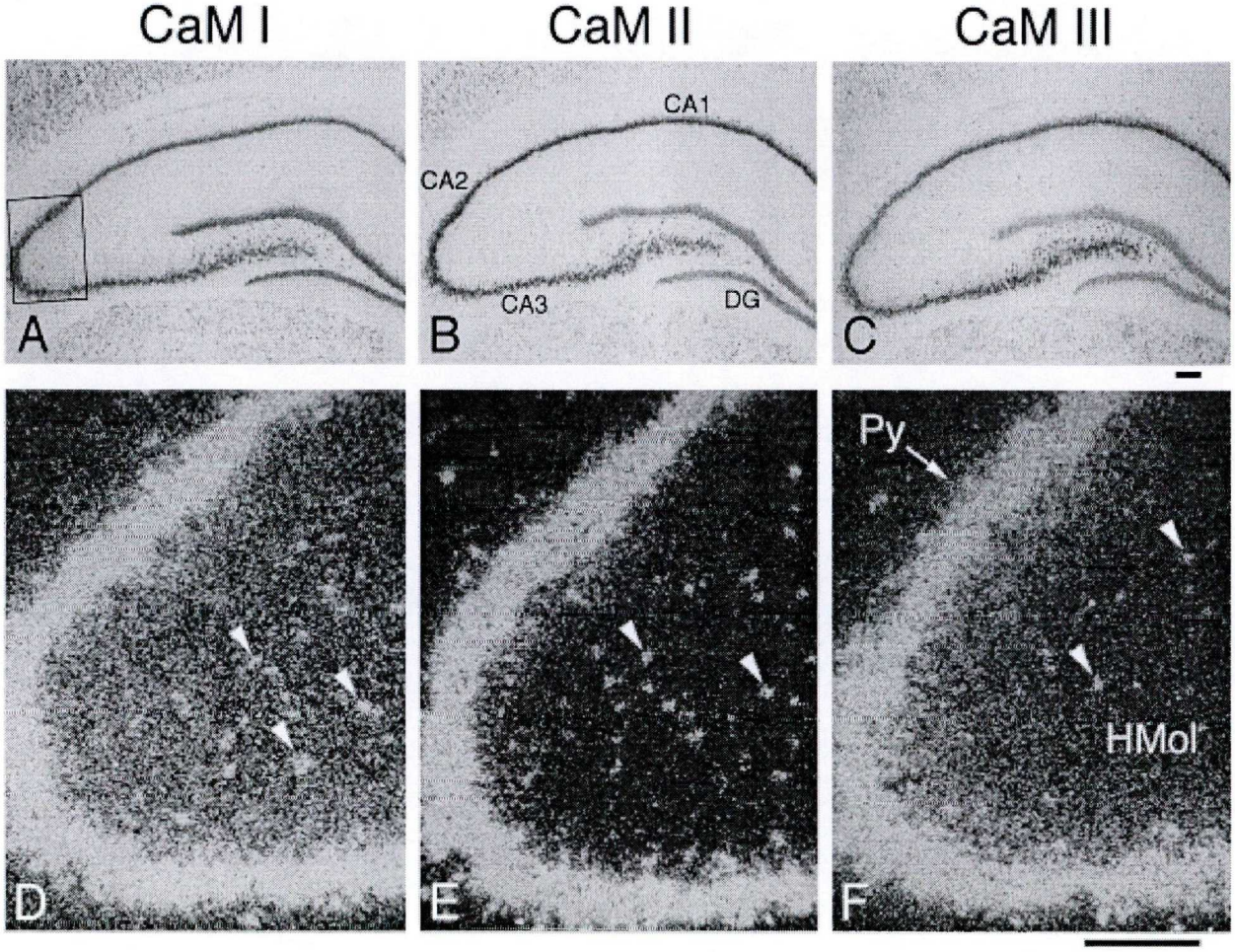
Cortex cerebri. A CaM gének expressziója a 2-6. rétegekben viszonylag magas (4.D-4.L, 5.A-5.L, 6.A-6.I és 8.A-8.C Ábrák; 1. Táblázat), ugyanakkor az 1. rétegben alacsony volt. A 2-6. rétegekben a cinguláris, a frontális és a parietális kéregben magasabb (38.2-44.3x10^6/mm^3), az occipitális és temporális kéregben alacsonyabb (28.8-30.1x10^6/mm^3) CaM III mRNS mennyiséget mértünk ugyanezen területek CaM I és CaM II mRNS kópiaszámaival (32.5-36.9x10^6/mm^3) összehasonlítva. A mozgatókéreg 5. rétegének nagy piramissejtjei jelölődtek a legerősebben, ez legjobban a CaM II és CaM III expressziója esetében volt megfigyelhető (8.A-8.C Ábrák). A CaM II mRNS-ek jelölődése elsődlegesen a sejttestekhez kapcsolódott, ugyanakkor a CaM I és a CaM III mRNS jelölődés diffúzabb volt, ami nemcsak a perikarionokhoz, hanem a neuropilhez is kapcsolódott (8.D-8.F Ábrák). Noha az 1. rétegben gyenge, diffúz jelölődés volt megfigyelhető, a CaM mRNS-ek mennyisége jelentősen különbözött (CaM II < CaM III < CaM I; 8.D-8.F Ábrák). Mindhárom CaM gén esetében nagyon erős expresszió volt megfigyelhető a cortex piriformisban (CaM I: 82.8x10^6/mm^3 ≈ CaM II: 81.3x10^6/mm^3 < CaM III: 108.4x10^6/mm^3; 4.D-4.L és 5.A-5.L Ábrák).

Törzsdúcok és kapcsolódó területek. Ezeket a régiókat alacsony vagy mérsékelt CaM mRNS szintek jellemezték (1. Táblázat). A másik két gén mRNS koncentrációihoz viszonyítva szignifikánsan magasabb CaM I mRNS szintet a nucleus accumbensben (4.D-4.F Ábrák), CaM II szintet

a nucleus caudatus-putamenben (4.I-4.L Ábrák) és CaM III szintet a globus pallidusban (5.A-5.C Ábrák) találtunk. Alacsonyabb CaM génexpresszió jellemezte a substantia nigra területét (6.A-6.C Ábrák), ahol a zona compacta mRNS tartalma magasabb volt a zona reticularisénál. Mindhárom CaM gén közepesen expresszálódott a nucleus ruberben (6.A-6.C Ábrák).



8. Ábra. A CaM mRNS-ek megoszlása és sejtes lokalizációja a felnőtt patkány mozgatókéregben. A koronasíkú kriosztát metszeteket a Bregma –1.1 mm magasságban készítettük, majd CaM I- (A, D), CaM II- (B, E) és CaM III- (C, F) specifikus antiszensz [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizáltuk. Az A-C panelek reprezentatív jelölt metszetek emulzió autoradiográfiás képét világos látótérben mutatják, ahol a sötétebb területekhez erősebb hibridizációs szignál tartozik. A C panelen téglalappal jelölt területnek megfelelő területek nagyobb nagyításban sötét látótérben a D-F paneleken láthatók; itt a világosabb területekhez tartozik erősebb hibridizációs szignál. Cl 1-6, a cortex cerebri 1-6. rétegei. A nyílhegyek (D-F panelek) az 1. réteg sejttestjeihez tartozó jelölődést mutatják. Vonalak = 200 μm.



9. Ábra. A CaM mRNS-ek megoszlása és sejtes lokalizációja a felnőtt patkány hippocampus-gyrus dentatus komplexben. A koronasíkú kriosztát metszeteket a Bregma –3.8 mm magasságban készítettük, majd CaM I- (A, D), CaM II- (B, E) és CaM III- (C, F) specifikus antiszensz [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizáltuk. Az A-C panelek reprezentatív jelölt metszetek emulzió autoradiográfiás képét világos látótérben mutatják, ahol a sötétebb területekhez erősebb hibridizációs szignál tartozik. Az A panelen téglalappal jelölt területnek megfelelő területek nagyobb nagyításon sötét látótérben a D-F paneleken láthatók; itt a világosabb területekhez tartozik erősebb hibridizációs szignál. CA1-3, CA1-3 hippocampális régiók; DG, granuláris sejt réteg, gyrus dentatus; HMol, molekuláris rétegek, hippocampus; Py, piramissejt réteg, hippocampus. A D-F paneleken a hippocampus molekuláris rétegeiben a sejttestekhez tartozó jelölődést nyílhegyek mutatják. Vonalak = 200 μm.

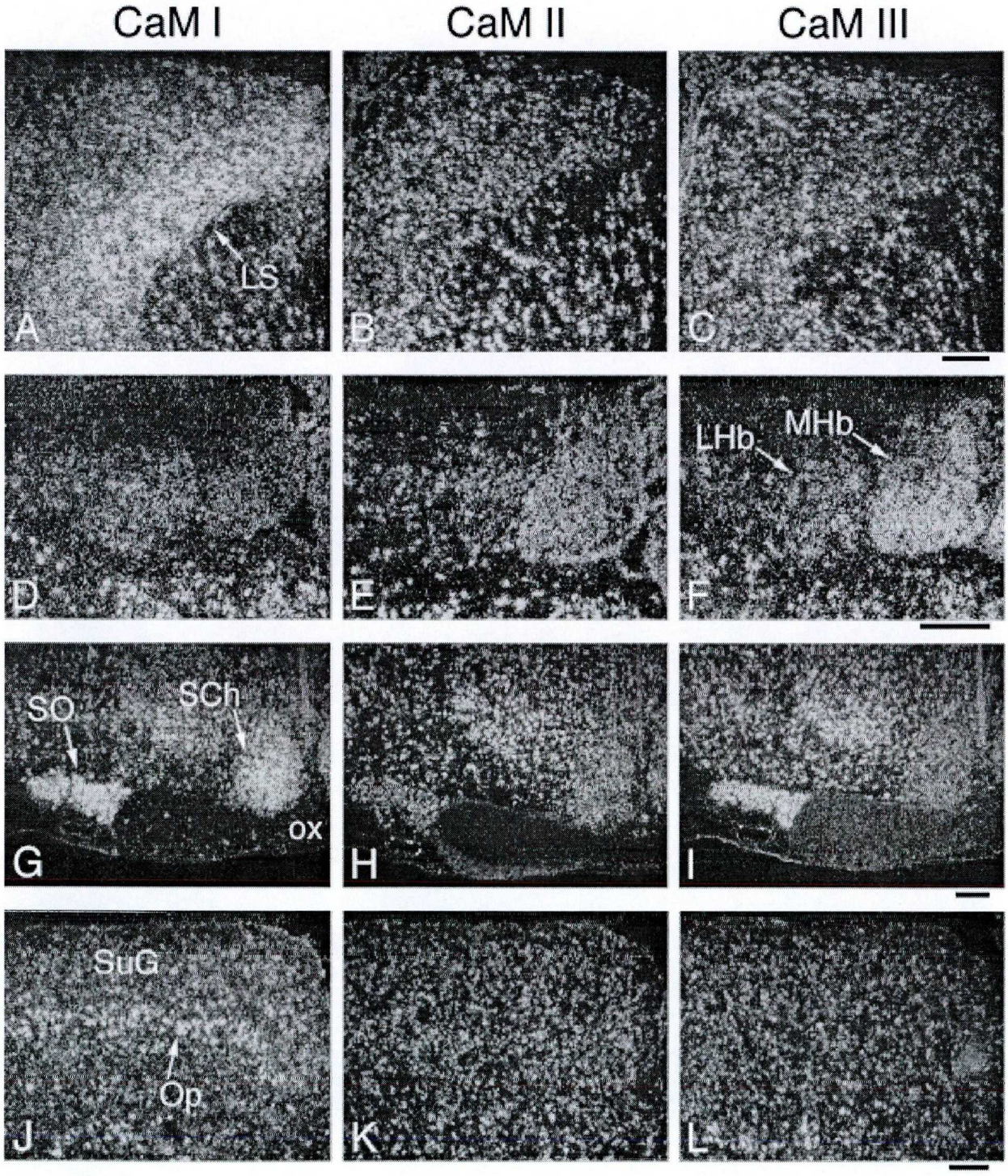
Limbikus területek. Ezekben a régiókban a CaM gének expressziója a mérsékelttől az erősig változott (1. Táblázat). A hippocampus-gyrus dentatus komplexben nagyon erős és differenciált expressziót detektáltunk (5.D-5.L és 6.A-6.C Ábrák). Mindhárom CaM gén mRNS-ei nagyon magas koncentrációban voltak jelen a CA3 piramissejt rétegben (86.3-87.9x10^6/mm^3; 9.A-9.C Ábrák). Valamivel alacsonyabb mRNS szinteket találtunk a CA1 és CA2 piramissejt rétegekben, ahol a CaM I és CaM III mRNS-ekhez viszonyítva (56.6-61.3x10^6/mm^3) a CaM II mRNS-ek mennyisége (66.5-69.6x10^6/mm^3) szignifikánsan magasabb volt. A gyrus dentatus granuláris sejtjei ugyancsak differenciált expressziót mutattak (CaM I: 90.2x10^6/mm^3, CaM II: 59.3x10^6/

mm^3 és CaM III: $47.6x10^6/mm^3$). A hippocampus molekuláris rétegeiben viszonylag alacsony, de génenként szignifikánsan különböző (CaM II < CaM III < CaM I) expressziót találtunk, ahol az autoradiográfiás jel elsődlegesen a neuropilhez, néha a sejttestekhez is kapcsolódott (9.D-9.F Ábrák). A nucleus septalis lateralisban a CaM I mRNS-ek kópiaszáma szignifikánsan meghaladta a CaM II és a CaM III mRNS-ekét (4.J-4.L és 10.A-10.C Ábrák). A differenciált mRNS koncentráció a nucleus tractus diagonalis vertikális (4.G-4.I Ábrák) és horizontális (4.J-4.L Ábrák) karjaiban is nyilvánvaló volt. Ezen a területen a CaM I expressziója alacsony, a CaM II-é közepes, míg a CaM III-é erős volt. A nucleus amygdaloideus basalis lateralisban (5.D-5.F Ábrák) a CaM III, az amygdalo-hippocampalis területen (5.J-5.L Ábrák) pedig a CaM I mRNS tartalom volt jelentősen magasabb a másik két CaM mRNS-éhez viszonyítva. A CaM I mRNS-ek száma a nucleus habenulae medialis és lateralis területén hasonló, a CaM II, de különösen a CaM III mRNS-eké viszont a nucleus habenulae medialisban szignifikánsan magasabb volt (5.G-5.L és 10.D-10.F Ábrák). Magas CaM mRNS kópiaszámokat (CaM I ≈ II < III) mértünk a tenia tectaban (4.D-4.F Ábrák) és a nucleus tractus olfactorii lateralisban (5.A-5.C Ábrák). Differenciált expressziós mintázat jellemezte a nucleus interstitialis striae terminalist (CaM I < CaM II ≈ CaM III; 4.J-4.L Ábrák) és a subiculumot is (CaM I < CaM III < CaM II).

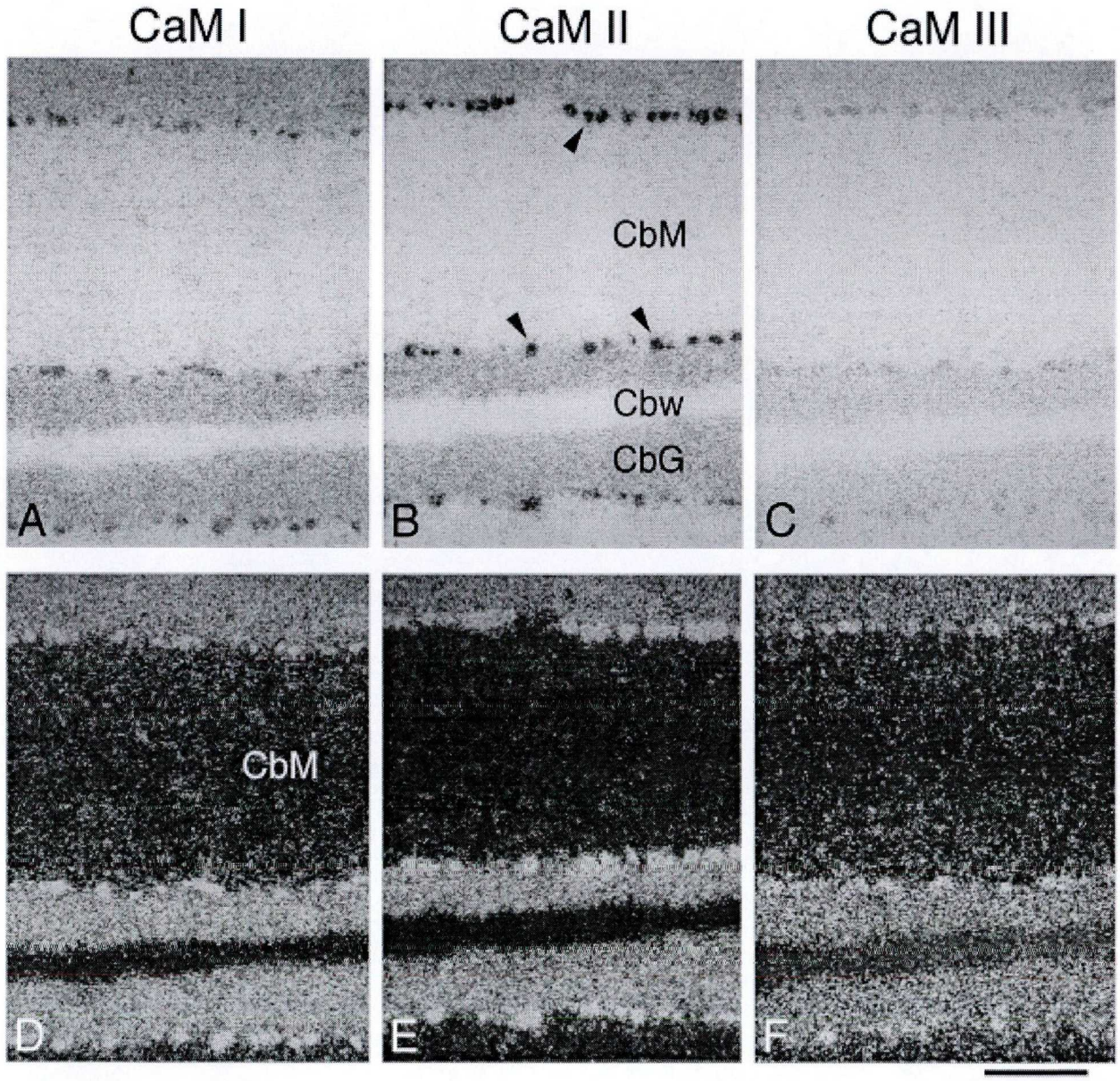
Thalamus. A thalamikus magokat általában mérsékelt CaM mRNS koncentráció jellemezte (1. Táblázat). Magasabb és differenciált expressziót találtunk a nucleus parafascicularisban (CaM II < CaM III < CaM I; 5.J-5.L Ábrák) és a nucleus paraventricularisban (CaM II ≈ CaM III < CaM I; 5.J-5.L Ábrák). Alacsonyabb expressziót mértünk a nucleus reticularis (CaM II < CaM I ≈ CaM III; 5.G-5.I Ábrák), a nucleus reuniens (5.G-5.I Ábrák) és a corpus geniculatum mediale területén (6.A-6.C Ábrák).

Hypothalamus. Mérsékelt, ám differenciált CaM génexpresszió jellemezte a hypothalamikus magokat (1. Táblázat). Valamivel alacsonyabb CaM I, mint CaM II és CaM III mRNS szint volt mérhető a nucleus arcuatusban, a nucleus dorsomedialisban és nucleus ventromedialisban (5.G-5.I Ábrák). Ugyancsak különböző CaM mRNS kópiaszámok jellemezték a nucleus preopticus medialist (CaM I < CaM II < CaM III; 4.J-4.L Ábrák), a nucleus suprachiasmaticust (CaM II < CaM III < CaM I; 5.A-5.C és 10.G-10.I Ábrák), a nucleus supraopticust (CaM II < CaM I ≈ CaM III, 5.A-5.F és 10.G-10.I Ábrák), a nucleus supraopticus pars retrochiasmaticusát (CaM II < CaM I < CaM III), a nucleus paraventricularis hypothalamit (CaM I < CaM II < CaM III, 5.D-5.F Ábrák) és a tuber cinereumot (CaM I ≈ CaM II < CaM III; 5.D-5.F Ábrák).

Középagy-agytörzs. Ezeken az agyterületeken általában mérsékelt CaM mRNS tartalmat mértünk (1. Táblázat). Differenciált mRNS megoszlás jellemezte a colliculus superiort (CaM II ≈ CaM III < CaM I). A stratum griseum superficialeban közepes, a stratum opticumban erősebb



10. Ábra. A CaM mRNS-ek megoszlása és sejtes lokalizációja a felnőtt patkányagy különböző területein. A koronasíkú kriosztát metszeteket a Bregma -0.4 mm (A-C), -3.1 mm (D-F), -1.1 mm (G-I) és -6.0 mm (J-L) magasságokban készítettük, majd CaM I- (A, D, G, J), CaM II- (B, E, H, K) és CaM III- (C, F, I, L) specifikus antiszensz [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizáltuk. Az ábra reprezentatív jelölt metszetek emulzió autoradiográfiás képét sötét látótérben mutatja, ahol a világosabb területekhez erősebb hibridizációs szignál tartozik. LHb, nucleus habenulae lateralis; LS, nucleus septalis lateralis; MHb, nucleus habenulae medialis; Op, stratum opticum colliculi superioris; ox, chiasma opticum; SCh, nucleus suprachiasmaticus; SO, nucleus supraopticus; SuG, stratum griseum superficiale colliculi superioris. Vonalak = 200 μm.

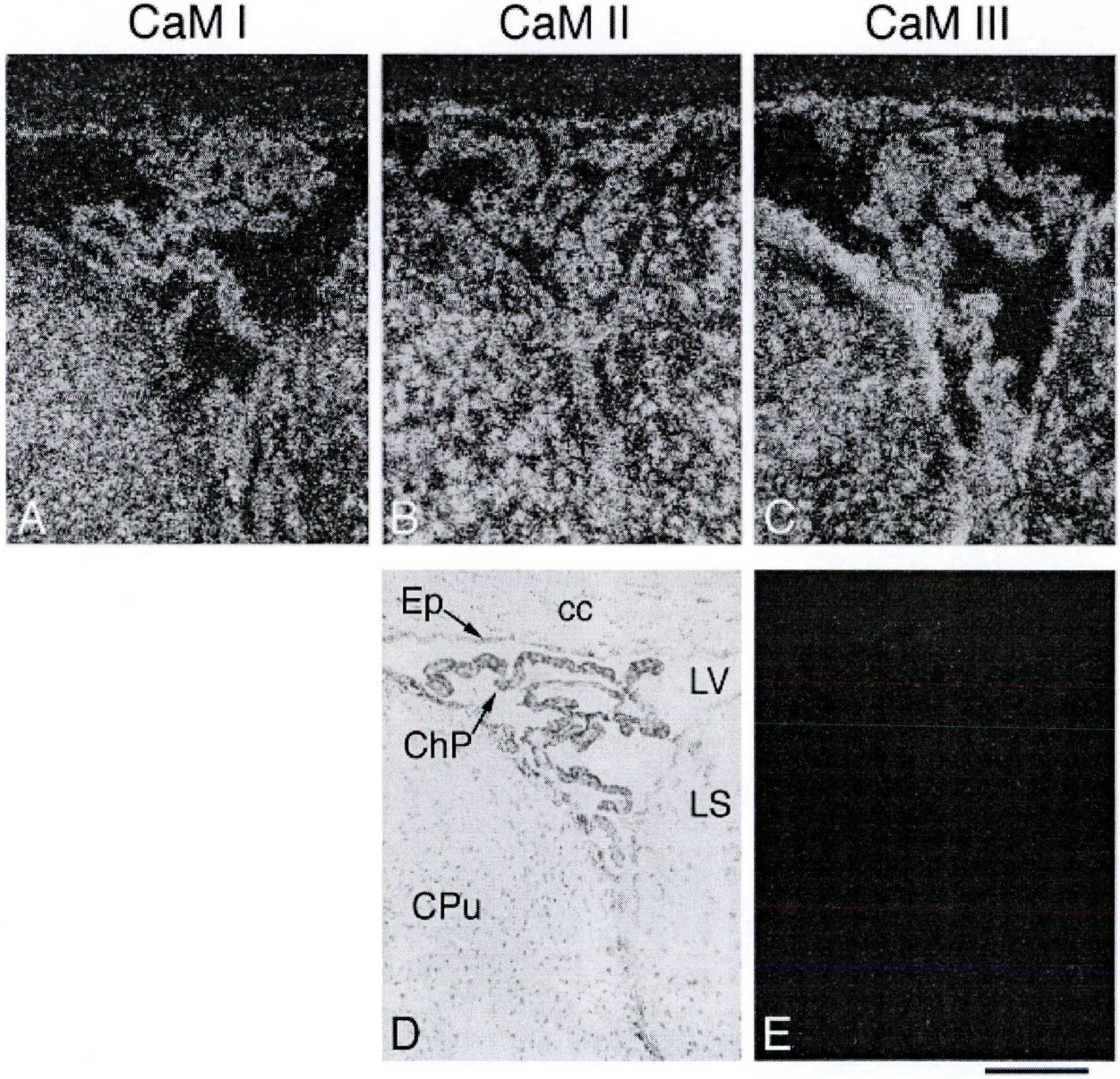


11. Ábra. A CaM mRNS-ek megoszlása és sejtes lokalizációja a felnőtt patkány cortex cerebelliben. A koronasíkú kriosztát metszeteket a Bregma –12.3 mm magasságban készítettük, majd CaM I- (A, D), CaM II- (B, E) és CaM III- (C, F) specifikus antiszensz [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizáltuk. Az A-C panelek reprezentatív jelölt metszetek emulzió autoradiográfiás képét világos látótérben mutatják, ahol a sötétebb területekhez erősebb hibridizációs szignál tartozik. A D-F paneleken ugyanezen területek sötét látótérben láthatók; itt a világosabb területekhez tartozik magasabb hibridizációs szignál. CbG, kisagyi glomeruláris sejt réteg; CbM, kisagyi molekuláris réteg; Cbw, kisagyi fehérállomány. A B panelen nyílhegyek jelölik a Purkinje sejttesteket. Vonal = 200 μm.

volt az expresszió (6.A-6.F és 10.J-10.L Ábrák). Differenciált expresszió jellemezte továbbá a raphe magokat (CaM I < CaM II ≈ CaM III; 6.D-6.F Ábrák), a corpus trapezoideumot (CaM II ≈ CaM III< CaM I; 6.G-6.I Ábrák) és a nucleus parabigeminalist (CaM II < CaM I ≈ III; 6.D-6.F Ábrák). Nem differenciált CaM génexpresszió jellemezte a substantia grisea centralist (6.D-6.F Ábrák), a colliculus inferiort (6.G-6.I Ábrák), a nucleus tegmenti dorsalist (6.G-6.I Ábrák), az oliva inferiort (6.J-6.L Ábrák), a nucleus interpeduncularist (6.A-6.C Ábrák), a nuclei pontit

(6.D-6.F Ábrák), a nucleus reticularis pontist (6.G-6.I Ábrák), a nucleus prepositus hypoglossit (6.J-6.L Ábrák) és a nucleus trochlearist (6.D-6.F Ábrák).

Cerebellum. Az agynak ebben a részében nyilvánvaló volt a differenciált CaM mRNS megoszlás (1. Táblázat). A granuláris sejt rétegben magas volt a CaM I ($49.4x10^6/mm^3$) és a CaM II ($56.1x10^6/mm^3$), de alacsony a CaM III ($23.8x10^6/mm^3$) expressziója (6.J-6.L Ábrák). A molekuláris réteget igen alacsony, de egymástól szignifikánsan különböző CaM mRNS kópia-



12. Ábra. A CaM mRNS-ek megoszlása és sejtes lokalizációja az oldalsó agykamrában. A koronasíkú kriosztát metszeteket a Bregma –0.4 mm magasságban készítettük, majd CaM I- (A), CaM II- (B) és CaM III- (C) specifikus antiszensz és CaM III szensz (E) [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizáltuk. Az A-C panelek reprezentatív jelölt metszetek emulzió autoradiográfiás képét sötét látótérben mutatják, ahol a világosabb területekhez erősebb hibridizációs szignál tartozik. Az A-C és E paneleknek megfelelő toluidinkékkel festett metszet fényes látótérben készült képét a D panel mutatja. cc, corpus callosum; ChP, plexus choroideus; CPu, nucleus caudatus-putamen; Ep, ependyma; LS, nucleus septalis lateralis; LV, ventriculus lateralis. Vonal = 200 μm.

számok jellemzték (CaM II < CaM III < CaM I; 11.D-11.F ábrák). A nagy felbontású emulziós autoradiográfia nagyon erős CaM II, valamint gyengébb CaM I és különösen gyenge CaM III expressziót mutatott ki a Purkinje sejtekben (11.A-11.F Ábrák).

Fehérállomány. Noha a CaM mRNS-ek elsősorban a szürkeállományban domináltak, alacsony mRNS kópiaszámoknak megfelelő (1. Táblázat), de egyértelműen specifikus jel volt mérhető az agy fehérállományból felépülő részeiben, így pl. a commissura anteriorban (4.J-4.L Ábrák), a corpus callosumban (4.D-4.L, 5.A-5.L és 6.A-6.F Ábrák) és a kisagyi fehérállományban is (6.J-6.L Ábrák).

Agykamrák. Mérsékelt CaM génexpresszió volt megfigyelhető a plexus choroideusban (CaM I < CaM II < CaM III; 1. Táblázat). Az emulzióval bevont metszetek vizsgálata alapján a kamrákat bélelő ependyma sejtek mRNS tartalma mennyiségét tekintve hasonló volt a a plexus choroideusban mérthez (12.A-12.C Ábrák).

A CaM mRNS-ek sejt-specifikus előfordulása a felnőtt patkányagyban

A fentiekben részletesen tárgyalt agyterület-specifikus CaM génexpresszió hátterében nyilvánvalóan az idegsejtek egyedi expressziós mintázata, valamint a különböző agyterületeket felépítő idegsejttípusok eltérő összetétele áll. A film, de különösen az emulziós autoradiográfia feloldása lehetővé teszi bizonyos sejttípusok azonosítását és így azok expressziójának sejtszintű jellemzését. Erre akkor nyílik lehetőség, ha 1) egy sejttípus jól definiált réteget alkot (pl. a bulbus olfactorius mitrális sejtjei, 7.A-7.C Ábrák; a hippocampus piramissejtjei, 9.A-9.F Ábrák; a gyrus dentatus granuláris sejtjei, 9.A-9.C Ábrák; az ependyma sejtek, 12.A-12.D Ábrák); 2) a sejtek olyan réteget vagy magot alkotnak, amelyben valamelyik sejttípus jelentős túlsúlyban van (pl. a bulbus olfactorius granuláris sejt rétege, 7.A-7.C Ábrák; a kisagy granuláris sejt rétege, 11.A-11.F Ábrák; a nucleus supraopticus, 10.G-10.I Ábrák; a fehérállomány, 4-6. Ábrák); 3) az egyedi sejtek expressziója a környezettől jelentősen eltér (pl. a mozgatókéreg nagy piramissejtjei, 8.A-8.C Ábrák; a kisagyi Purkinje sejtek, 11.A-11.F Ábrák).

Az ilyen típusú vizsgálatok azt mutatták, hogy a különböző idegsejttípusok között jelentős expressziós különbségek vannak (lásd a fentebb felsorolt szürkeállomány területek mRNS kópiaszámait az 1. Táblázatban). A CaM III mRNS-ek megoszlási értékeiből néhány példát kiragadva – $23.8 \times 10^6/mm^3$ (kisagy granuláris sejtjei), $34.3 \times 10^6/mm^3$ (nucleus supraopticus magnocelluláris sejtjei), $50.5 \times 10^6/mm^3$ (bulbus olfactorius mitrális sejtjei) és $86.7 \times 10^6/mm^3$ (hippocampus CA3 piramissejtjei) – látható, hogy a különböző idegsejtek mRNS tartalma közötti különbség megközelíti a négyszerest.

A három CaM gén expresszióját adott idegsejttípusban megvizsgálva ugyancsak jelentős

eltéréseket találtunk (1. Táblázat). Megközelítőleg kétszeres mRNS kópiaszám különbségeket mértünk a gyrus dentatus granuláris (CaM I: $90.2x10^6/mm^3$, CaM II: $59.3x10^6/mm^3$ és CaM III: $47.6x10^6/mm^3$), a nucleus supraopticus magnocelluláris (CaM I: $37.1x10^6/mm^3$, CaM II: $17.0x10^6/mm^3$ és CaM III: $34.3x10^6/mm^3$) és a kisagy granuláris sejtjeiben (CaM I: $49.4x10^6/mm^3$, CaM II: $56.1x10^6/mm^3$ és CaM III: $23.8x10^6/mm^3$). A cortex cerebri 5. rétegében a nagy mozgatóneuronok expressziós mintázata: CaM I < CaM III < CaM II, a kisagyi Purkinje sejteké pedig: CaM III < CaM I < CaM II (kvalitatív adatok).

A különböző fehérállomány területeken (1. Táblázat) elsődlegesen az oligodendrocitákhoz és/vagy az axonokhoz tartozó nagyon alacsony CaM génexpresszió a jellemző ($1.5\text{-}5.4x10^6/mm^3$; általában CaM I ≈ CaM II < CaM III), ugyanakkor az ependymasejtekben (kvalitatív adat) ennél jóval magasabb expresszió figyelhető meg.

A fentieket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a különböző idegsejttípusok között, illetve adott sejttípuson belül, a 3 CaM gén között szignifikáns expressziós különbségek vannak. A gliális expresszió az oligodendrociták esetében nagyon alacsony, az ependyma sejtekben viszont jóval magasabb.

A CaM mRNS-ek in vivo intracelluláris lokalizációja a felnőtt patkányagyban

Az agy egyes területeinek réteges felépítése miatt az idegsejtek különböző kompartmentjei (sejttestek, dendritek és axonok) elkülönült rétegeket alkothatnak. A sejttesteket tartalmazó rétegek közé tartoznak a cortex cerebri 2-6. rétegei (8.A-8.F Ábrák), a kisagyi granuláris és Purkinje sejtek rétegei (11.A-11.F Ábrák), a hippocampus piramissejt rétege (9.A-9.F Ábrák) és a bulbus olfactorius granuláris és mitrális sejt rétegei (7.A-7.C Ábrák). Ezeken a területeken viszonylag magas CaM mRNS koncentrációt figyeltünk meg (1. Táblázat). Alacsonyabb, de egyértelműen specifikus hibridizációt detektáltunk olyan, főként dendriteket tartalmazó területeken, mint a cerebrális (8.D-8.F Ábrák), a cerebelláris (11.D-11.F Ábrák) és a hippocampális (9.D-9.F Ábrák) molekuláris rétegek, illetve a bulbus olfactorius külső plexiform rétege (7.A-7.C Ábrák). Ezeken a területeken feltehetően a neuropilhez tartozó, elsődlegesen diffúz ezüstszemcse megoszlást találtunk, bár néha a sejttestekhez tartozó pontszerű jelölődés is megfigyelhető volt (7.A-7.C, 8.D-8.F és 9.D-9.F Ábrák). Diffúz hibridizációs szignál a cortex cerebri 2-6. rétegeinek erősen jelölt sejttestjei között is látható volt (8.D-8.F Ábrák). A dendritgazdag területeken a CaM mRNS-ek mennyisége jelentősen és azonos módon különbözött (CaM II < CaM III < CaM II; 1. Táblázat). A fehérállományban, amelyet elsődlegesen axonok és oligodendrociták építenek fel, nagyon alacsony CaM mRNS tartalmat mértünk (1. Táblázat). Mindezek alapján a CaM mRNS-ek nemcsak a sejttestben vannak jelen, hanem CaM géntől függő, differenciált módon (CaM II < CaM III < CaM I) a dendritekbe is transzlokálódnak, ugyanakkor az axonális lokalizáció nem jellemző.

1. Táblázat. A CaM mRNS-ek kópiaszámai a patkányagyban (x 10^6 ± SD)

agyi régió	CaM I	CaM II	CaM III
bulbus olfactorius:			
ext. plexiform réteg	9.51 ± 1.73[a]	5.78 ± 8.15[b]	10.60 ± 1.97
glomerularis réteg	15.40 ± 2.11	15.84 ± 1.93[b]	23.90 ± 2.34[c]
granularis réteg	38.83 ± 5.53	41.75 ± 5.45[b]	30.60 ± 2.69[c]
mitralis sejt réteg	39.55 ± 5.10	40.70 ± 6.08[b]	50.50 ± 3.83[c]
cortex cerebri (1. réteg):			
frontalis	13.64 ± 1.38[a]	5.09 ± 0.43[b]	8.31 ± 1.49[c]
cortex cerebri (2-6. rétegek):			
cingularis	33.56 ± 4.52	36.56 ± 4.57[b]	44.28 ± 3.94[c]
frontalis	33.05 ± 5.75	36.91 ± 4.09	41.63 ± 4.59[c]
parietalis	32.48 ± 3.38	36.88 ± 4.95	38.16 ± 3.77[c]
occipitalis	35.12 ± 5.53	36.54 ± 5.74[b]	28.81 ± 3.35[c]
temporalis	36.02 ± 4.61	35.21 ± 9.76	30.11 ± 2.42[c]
cortex piriformis:	80.80 ± 14.13	78.20 ± 6.59[b]	104.12 ± 7.69[c]
basalis ganglionok és kapcsolódó régiók:			
nucleus accumbens	25.86 ± 3.05[a]	21.58 ± 3.33	20.82 ± 1.11[c]
nucleus caudatus-putamen	17.54 ± 2.02[a]	24.04 ± 2.34[b]	17.18 ± 2.39
globus pallidus	5.51 ± 0.53	5.55 ± 0.85[b]	10.42 ± 1.17[c]
zona compacta, substantia nigra	13.41 ± 1.02	12.91 ± 1.39	15.71 ± 3.28
zona reticularis, substantia nigra	9.05 ± 0.72	9.42 ± 1.54	10.49 ± 1.37[c]
nucleus ruber	21.15 ± 3.42	19.14 ± 3.44	21.28 ± 2.54
limbikus régiók:			
CA1 piramissejt réteg, hippocampus	59.37 ± 7.66[a]	69.56 ± 5.46[b]	61.26 ± 5.83
CA2 piramissejt réteg, hippocampus	56.62 ± 6.62[a]	66.46 ± 5.79[b]	57.67 ± 3.53
CA3 piramissejt réteg, hippocampus	87.94 ± 14.59	86.34 ± 14.48	86.68 ± 7.07
molekularis réteg, hippocampus	11.87 ± 1.47[a]	3.21 ± 0.56[b]	6.29 ± 0.85[c]
granularis sejt réteg, gyrus dentattus	90.20±10.83[a]	59.34 ± 8.84[b]	47.55 ± 8.50[c]
amygdalo-hippocampalis area	43.62 ± 4.77[a]	28.01 ± 3.48	27.30 ± 3.45[c]
nucleus amygdaloideus basalis lateralis	34.16 ± 5.28	30.94 ± 5.11[b]	47.87 ± 5.13[c]
nucleus interstitialis striae terminalis	16.36 ± 1.42[a]	21.77 ± 2.64	23.97 ± 1.93[c]
nucleus habenulae lateralis	14.07 ± 1.67	13.89 ± 1.21[b]	17.15 ± 1.84[c]
nucleus habenulae medialis	14.94 ± 2.97[a]	23.24 ± 3.35[b]	33.72 ± 2.89[c]
nucleus septalis lateralis	34.08 ± 4.57[a]	17.87 ± 1.96	19.37 ± 4.00[c]

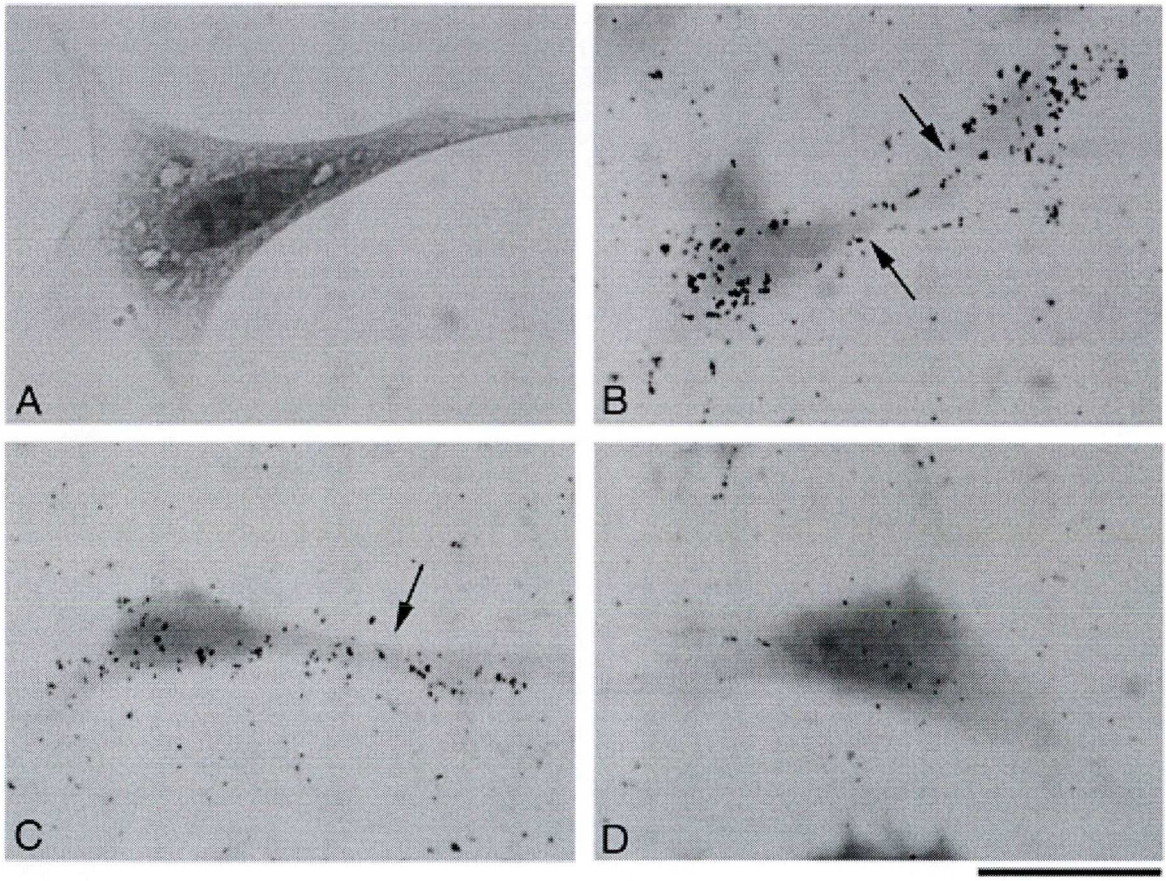
agyi régió	CaM I	CaM II	CaM III
horizontalis kar, nucleus tractus diagonalis	15.84 ± 1.58[a]	21.73 ± 3.14[b]	33.03 ± 2.31[c]
vertikalis kar, nucleus tractus diagonalis	13.91 ± 0.97[a]	22.92 ± 3.59[b]	31.07 ± 2.35c
nucleus tractus olfactorii lateralis	60.56 ± 8.65	64.09 ± 9.51[b]	75.79 ± 10.89[c]
subiculum	26.76 ± 2.68[a]	45.37 ± 5.86[b]	35.66 ± 3.85[c]
tenia tecta	66.49 ± 8.92	55.33 ± 8.66[b]	77.87 ± 9.53
thalamus:			
teljes area	18.57 ± 0.99[a]	15.66 ± 2.05[b]	18.75 ± 1.97
nucleus parafascicularis thalami	51.76 ± 6.16[a]	26.18 ± 4.03[b]	32.74 ± 2.77[c]
nucleus paraventricularis thalami	34.01 ± 2.72[a]	26.51 ±3.24	24.80 ± 3.96[c]
nucleus reticularis thalami	24.81 ± 1.46[a]	12.37 ± 0.94[b]	22.92 ± 2.44
nucleus reuniens thalami	24.07 ± 1.18	20.47 ± 4.35	22.90 ± 4.92
corpus geniculatum mediale	20.23 ± 1.67	20.27 ± 3.62	17.36 ± 2.14
hypothalamus:			
nucleus arcuatus	20.70 ± 3.69[a]	25.52 ± 3.19	22.64 ± 2.46
nucleus dorsomedialis hypothalami	15.77 ± 1.58[a]	18.19 ± 1.25	16.95 ± 3.24
nucleus preopticus medialis	21.66 ± 2.70[a]	28.13 ± 3.84[b]	39.88 ± 3.28[c]
nucleus paraventricularis hypothalami	21.11 ± 1.94[a]	25.24 ± 2.43[b]	32.4 ± 3.55[c]
nucleus suprachiasmaticus	27.71 ± 5.06[a]	14.28 ± 1.51[b]	19.13 ± 2.45[c]
nucleus supraopticus	37.05 ± 5.05[a]	16.96 ± 1.98[b]	34.29 ± 2.80[c]
pars retrochiasmaticus, nucleus supraopticus	12.47 ± 2.37[a]	8.16 ± 2.59[b]	20.57 ± 2.95[c]
tuber cinereum	13.22 ± 2.14	13.94 ± 2.24[b]	18.62 ± 1.29[c]
nucleus ventromedialis hypothalami	25.70 ± 2.59[a]	30.28 ± 3.74	30.07 ± 4.72
mesencephalon - medulla oblongata:			
medulla, teljes area	17.48 ± 1.15[a]	13.25 ± 1.81	16.94 ± 2.23
stratum opticum colliculi superioris	48.16 ± 4.66[a]	29.59 ± 2.59[b]	26.16 ± 3.02[c]
stratum griseum superficiale colliculi superioris	25.09 ± 1.84[a]	21.10 ± 2.19	20.88 ± 1.50[c]
substantia grisea centralis	18.28 ± 2.75	18.54 ± 2.04	20.21 ± 1.91
colliculus inferior	20.95 ± 2.26	18.69 ± 2.36	18.45 ± 2.74
nucleus tegmenti dorsalis	39.12 ± 8.08	35.10 ± 3.81	39.56 ± 4.47
oliva inferior	18.37 ± 2.70	18.75 ± 2.17	19.50 ± 3.01
nucleus interpeduncularis	14.46 ± 3.19	15.49 ± 1.59	14.98 ± 1.60
corpus trapezoideum	25.73 ± 2.88[a]	21.98 ± 2.28	24.36 ± 5.20
nucleus parabigeminalis	37.61 ± 3.17[a]	28.32 ± 4.75[b]	34.44 ± 3.79

agyi régió	CaM I	CaM II	CaM III
nuclei ponti	37.47 ± 3.93	32.45 ± 4.20	39.01 ± 8.25
nucleus reticularis pontis	16.19 ± 2.67	13.40 ± 1.53	15.43 ±2.30
nucleus prepositus hypoglossi	33.55 ± 2.59	29.44 ± 1.79	33.83 ± 5.77
raphe nuclei	23.84 ± 4.98[a]	29.63 ± 2.63	27.61 ± 3.02
nucleus trochlearis	28.32 ± 3.64	30.07 ± 3.39	31.79 ± 2.94
cerebellum:			
granularis sejt réteg	49.41 ± 3.60	56.09 ± 8.81[b]	23.77 ± 3.54[c]
molekularis réteg	9.40 ± 1.18[a]	4.78 ± 0.76[b]	7.90 ± 1.01[c]
fehérállomány:			
commissura anterior	2.86 ± 0.55	3.44 ± 0.37[b]	4.71 ± 1.10[c]
corpus callosum	3.86 ± 0.60	3.75 ± 0.50[b]	4.41 ± 1.13[c]
capsula interna	2.50 ± 0.28	2.81 ± 0.82[b]	4.79 ± 0.59[c]
tractus pyramidalis	1.51 ± 0.48	1.97 ± 0.75	2.55 ± 0.85[c]
commissura fornicis ventralis	2.76 ± 0.49	3.18 ± 1.14[b]	5.42 ± 1.15[c]
cerebellaris fehérállomány	2.21 ± 0.50[a]	3.53 ± 0.76	3.12 ± 1.43
plexus choroideus:	17.57 ± 1.83[a]	20.81 ± 2.39[b]	26.00 ± 3.14[c]

1. Táblázat. Öt patkányagyból 12 különböző magasságban koronasíkú kriosztát metszeteket készítettünk, azokat CaM I, CaM II és CaM III specifikus antiszensz [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizáltuk, majd autoradiográfiás filmre exponáltuk. A film autoradiogrammokat számítógépes mikrodenzitometriával értékeltük. A kvantifikációhoz a metszeteket szövet-ekvivalens radioaktivitásra kalibrált membrán standard sorozatokkal koexponáltuk. A próbák specifikus aktivitását meghatároztuk, majd a különböző agyterületek sötétségéhez tartozó radioaktivitás értékeket a hibridizált próbák kópiaszámává alakítottuk. A táblázat az 1 mm^3 szövet térfogatra vonatkozó hibridizált kópiaszámokat (x 10^6 ± SD) mutatja. [a]: szignifikáns különbség a CaM I és a CaM II kópiaszámok között; [b]: szignifikáns különbség a CaM II és a CaM III kópiaszámok között; [c]: szignifikáns különbség a CaM I és a CaM III kópiaszámok között; $p < 0.01$ (Student-féle kétmintás *t*-teszt).

A CaM mRNS-ek detektálása és intracelluláris lokalizációja embrionális patkány striatum immortalizált sejtvonala (M26-1F) sejtjeiben

Az M26-1F sejtek 33°C-on tenyésztve jellegzetes fibroblasztszerű morfológiát mutattak (13.A Ábra). Az antiszensz [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizálva a sejteket specifikus, a sejtekhez kapcsolódó szignál volt megfigyelhető (13.B-13.D Ábrák; Palfi és mtsai., 1999a). A CaM génspecifikus ribopróbák mind a sejtek szómáját, mind azok nyúlványait megjelölték (13.B és 13.C Ábrák). Neuronokra jellemző erős jel volt megfigyelhető a CaM I és CaM II mRNS-ek hibridizációja során (13.B és 13.C Ábrák), ugyanakkor a CaM III mRNS-ek jóval kisebb mennyiségben voltak jelen (13.D Ábra).

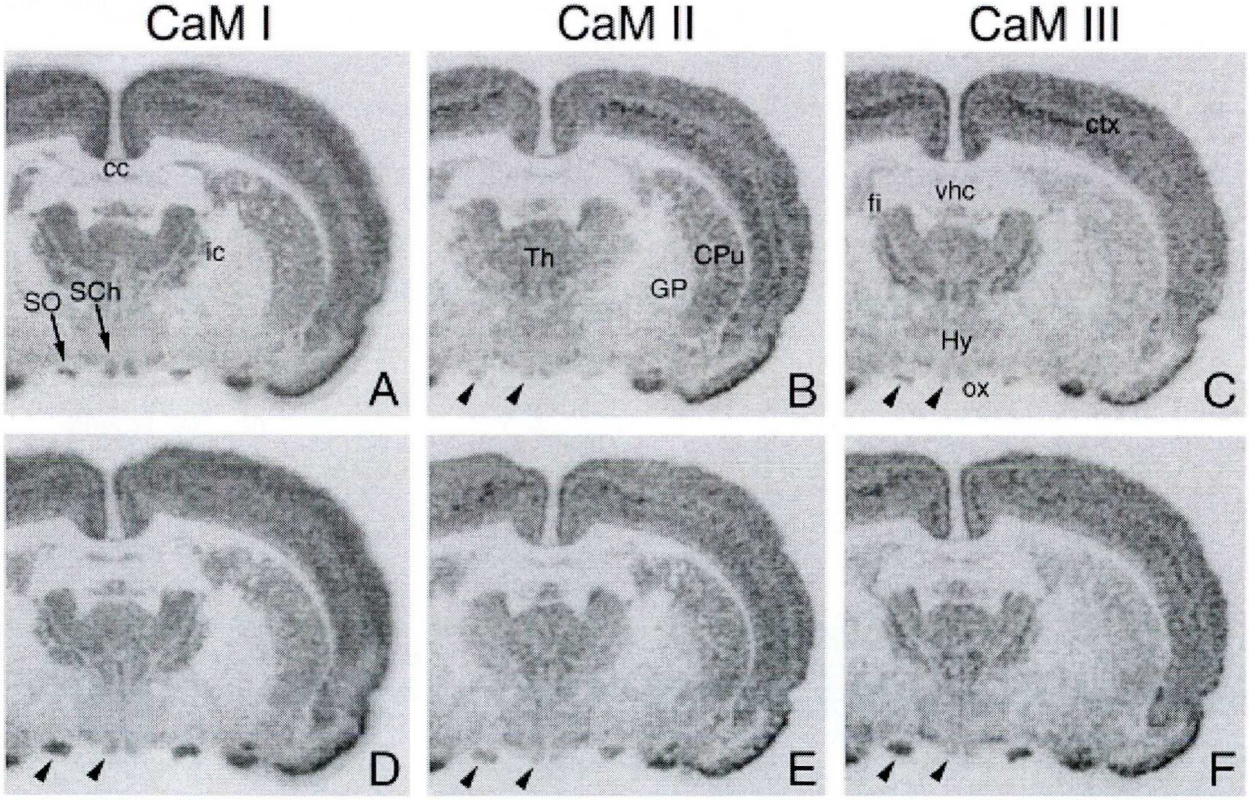


13. Ábra. A CaM mRNS-ek sejtes lokalizációja az M26-1F sejtvonal sejtjeiben. A sejteket 3 napig 33°C-on tenyésztettük (A: safraninnal felülfestett sejt), majd CaM I- (B), CaM II- (C) és CaM III- (D) specifikus antiszensz [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizáltuk. A hibridizációs jel mind a sejttestek, mind a nyúlványok felett megfigyelhető, igen erős a CaM I (B) és a CaM II (C), ugyanakkor gyengébb a CaM III (D) esetében. A nyilak a sejtek nyúlványait mutatják. Vonal = 25 μm.

A CaM génexpresszió szabályozása a hypothalamikus magnocelluláris magokban 10 napos vízmegvonást követően

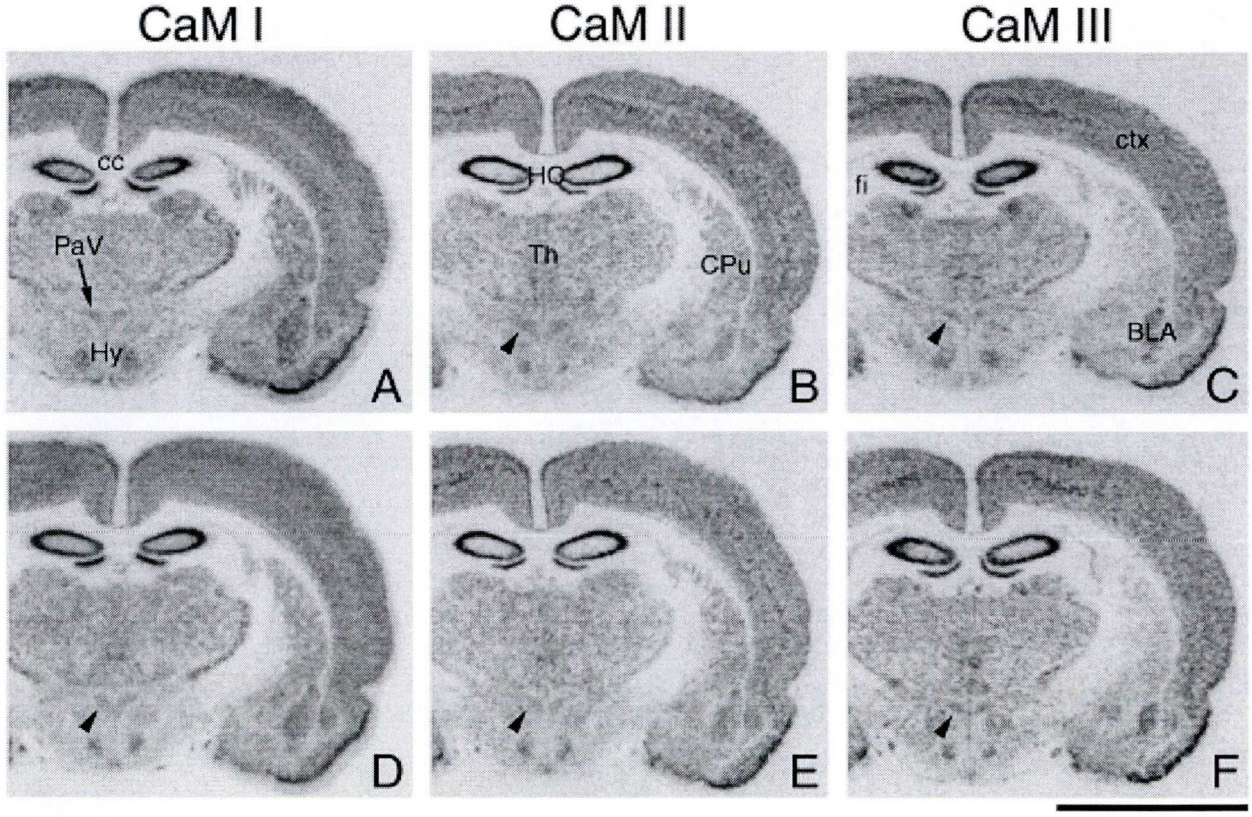
A hibridizált antiszensz [^{35}S]cRNS próbák mennyiségét összehasonlítottuk a víztől megvont és a kontroll állatok különböző agyterületei között (2. Táblázat). A vizsgált hypothalamikus területek a nucleus supraopticus (14.A-14.C Ábrák: kontroll; 14.D-14.F Ábrák: víztől megvont), a nucleus paraventricularis hypothalami (15.A-15.C Ábrák: kontroll; 15.D-15.F Ábrák: víztől megvont) és a nucleus suprachiasmaticus voltak (ez utóbbi vazopresszinerg, de nem magnocelluláris mag; 14.A-14.C Ábrák: kontroll; 14.D-14.F Ábrák: vízmegvont). Emellett számos extrahypothalamikus régióban is megmértük a CaM mRNS-ek mennyiségének változását (Palfi és Gulya, 1999).

A 10 napos vízmegvonást követően a legtöbb agyterületen, beleértve a hypothalamikus paraventricularis és suprachiasmaticus magokat is, a kontroll állatok értékeihez viszonyítva megtartott, vagy kissé, ám szignifikánsan csökkent (max. 15%-kal) CaM mRNS kópiaszámokat



14. Ábra. A 10 napos vízmegvonás hatása a CaM gének expressziójára a nucleus supraopticus és a nucleus suprachiasmaticus magasságában. A koronasíkú kriosztát metszeteket a Bregma -1.3 mm magasságban készítettük, majd CaM I- (A és D), CaM II- (B és E) és CaM III- (C és F) specifikus antiszensz [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizáltuk. Az A-C panelek kontroll állatok agyából, a D-F panelek 10 napig víztől megvont állatok agyából készült metszetek autoradiogrammjait mutatják. cc, corpus callosum; CPu, nucleus caudatus-putamen; ctx, cortex cerebri; fi, fimbria hippocampi; GP, globus pallidus; Hy, hypothalamus; ic, capsula interna; ox, chiasma opticum; SCh, nucleus suprachiasmaticus; SO, nucleus supraopticus; Th, thalamus; vhc, commissura fornicis ventralis. A nyílhegyek a két releváns hypothalamikus magot mutatják. Vonal = 5 mm.

mértünk (14 és 15 Ábrák; 2. Táblázat). Ezzel ellentétben a nucleus supraopticusban a három CaM gén expressziója a víztől megvont állatokban megemelkedett (CaM I: 138%, CaM II: 126% és CaM III: 169%; $p < 10^{-5}$). Az expresszió növekedés mértéke a CaM I - CaM III (138% és 169%) és a CaM II - CaM III (126% és 169%) párok esetében szignifikánsan különbözött ($p< 10^{-3}$).



15. Ábra. A 10 napos vízmegvonás hatása a CaM gének expressziójára a nucleus paraventricularis magasságában. A koronasíkú kriosztát metszeteket a Bregma -1.8 mm magasságban készítettük, majd CaM I- (A és D), CaM II- (B és E) és CaM III- (C és F) specifikus antiszensz [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizáltuk. Az A-C panelek kontroll állatok agyából, a D-F panelek 10 napig víztől megvont állatok agyából készült metszetek autoradiogrammjait mutatják. BLA, nucleus amygdaloideus basalis lateralis; cc, corpus callosum; CPu, nucleus caudatus-putamen; ctx, cortex cerebri; fi, fimbria hippocampi; HC hippocampus; Hy, hypothalamus; PaV, nucleus paraventricularis hypothalami; Th, thalamus. A nyílhegyek a nucleus paraventricularis hypothalamit mutatják. Vonal = 5 mm.

2. Táblázat. A 10 napos vízmegvonás hatása a patkányagy különböző területeinek CaM mRNS kópiaszámaira (x 10^6 ± SD)

agyi régió	CaM I kontroll	CaM I víztől megvont	CaM II kontroll	CaM II víztől megvont	CaM III kontroll	CaM III víztől megvont
frontalis cortex	33.03 ± 5.75	30.43 ± 3.20	36.91 ± 4.09	28.89 ± 2.65 (-)	41.62 ± 4.59	31.03 ± 3.60 (-)
parietalis cortex	32.47 ± 3.38	33.26 ± 5.03	36.88 ± 4.95	31.60 ± 4.63 (-)	38.27 ± 3.77	30.90 ± 2.29 (-)
cortex piriformis	82.83 ± 1.40	74.25 ± 8.47	81.31 ± 11.76	66.52 ± 11.2 (-)	100.81 ± 8.51	84.70 ± 1.42 (-)
nucleus accumbens	25.86 ± 3.05	21.74 ± 2.06 (-)	21.58 ± 3.33	19.77 ± 3.09	20.82 ± 1.11	15.25 ± 2.01 (-)
nucl. caudatus-putamen	18.03 ± 2.17	14.76 ± 1.36 (-)	24.59 ± 2.90	20.21 ± 2.31 (-)	16.58 ± 2.44	13.34 ± 1.50 (-)
globus pallidus	58.13 ± 6.24	55.34 ± 5.95	56.93 ± 7.13	56.91 ± 1.02	104.43 ± 1.23	100.30 ± 8.63
CA1 piramissejt réteg, hippoc.	59.39 ± 7.66	51.88 ± 9.09	69.56 ± 5.46	62.95 ± 6.47 (-)	61.35 ± 5.83	56.16 ± 5.89
CA2 piramissejt réteg, hippoc.	56.62 ± 6.62	46.49 ± 6.08 (-)	66.46 ± 5.79	56.90 ± 6.43 (-)	57.67 ± 3.53	51.97 ± 7.04 (-)
CA3 piramissejt réteg, hippoc.	87.94 ± 1.46	84.67 ± 8.48	86.34 ± 1.45	83.90 ± 1.23	86.68 ± 7.07	85.07 ± 1.09
gyrus dentatus	90.20 ± 10.84	85.89 ± 9.51	59.34 ± 8.84	54.37 ± 5.52	47.55 ± 8.50	41.46 ± 3.77
thalamus (teljes area)	18.72 ± 4.40	17.45 ± 2.69	19.00 ± 2.74	16.02 ± 1.68 (-)	25.94 ± 1.98	24.64 ± 2.14
nucleus supraopticus	33.94 ± 4.89	46.85 ± 2.51 (+)	18.24 ± 2.52	23.04 ± 1.44 (+)	33.52 ± 3.54	56.57 ± 3.80 (+)
nucl. suprachiasm.	26.45 ± 4.73	23.51 ± 2.09 (-)	13.26 ± 1.42	12.13 ± 1.70	16.77 ± 2.71	15.57 ± 2.93
nucl. paraventr. hypothalami	20.06 ± 1.92	18.19 ± 2.34	23.61 ± 2.17	21.29 ± 2.40	30.58 ± 3.79	27.43 ± 1.79
nuclei pontis	37.47 ± 3.93	36.22 ± 1.84	32.45 ± 4.20	30.28 ± 3.59	39.01 ± 8.25	35.96 ± 4.01
medulla (teljes area)	17.55 ± 1.15	13.29 ± 2.12 (-)	13.25 ± 1.81	11.65 ± 1.89	16.96 ± 2.23	15.29 ± 5.33
granularis sejt r. cerebellum	49.41 ± 3.60	37.02 ± 3.53 (-)	56.01 ± 8.81	52.08 ± 6.63	23.85 ± 3.54	20.86 ± 2.50 (-)

2. Táblázat. Öt kontroll és 5, 10 napig víztől megvont patkány agyából különböző magasságokban koronasíkú kriosztát metszeteket készítettünk, azokat CaM I, CaM II és CaM III specifikus antiszensz [^{35}S]cRNS próbákkal hibridizáltuk, majd autoradiográfiás filmre exponáltuk. A film autoradiogrammokat (adott agyterületen minden állatban 4 független mérés) számítógépes mikrodenzitometriával értékeltük. A kvantifikációhoz a metszeteket kalibrált membrán standard sorozatokkal koexponáltuk. A próbák specifikus aktivitását meghatároztuk, majd a különböző agyterületek sötétségéhez tartozó radioaktivitás értékeket a hibridizált próbák kópiaszámává alakítottuk. A táblázat az 1 mm^3 szövet térfogatra vonatkozó hibridizált kópiaszámokat (x 10^6 ± SD) mutatja. (-): a kontroll értékhez viszonyítva szignifikánsan alacsonyabb mRNS szint ($p < 0.01$, Student-féle kétmintás *t*-teszt). (+): a kontroll értékhez viszonyítva szignifikánsan magasabb mRNS szint ($p < 0.01$, Student-féle kétmintás *t*-teszt).

A film autoradiográfia modellje és alkalmazása

Az autoradiográfiás film általunk detektált szenzitometrikus görbéje a más szerzők által leírtakhoz hasonló volt (Davenport és mtsai., 1988; Ito és mtsai., 1995; Kuhar és Unnerstall, 1985; Unnerstall és mtsai., 1982). Az autoradiográfiás adatok interpolálására és a standardok kalibrálására az eddig használt empirikusan választott függvényekkel ellentétben (Miller és mtsai., 1988; Pan és mtsai., 1983; Sokoloff és mtsai., 1977; Unnerstall és mtsai., 1982) egy új matematikai megközelítést alkalmaztunk (Palfi és mtsai., 1998). Az általunk kidolgozott exponenciális egyenlet / $\mathrm{ROD} = p_1(1-\exp[-p_2 x])$ / két ismert funkciójú paraméterrel rendelkezik, és kísérleti feltételeink mellett a 0-240 ROD tartományban használható a ROD-radioaktivitás közötti kapcsolat pontos leírására ($r^2 \geq 0.999$). Az egyenlet első paraméterét (p_1) elsődlegesen az autoradiográfiás film jellemzői és az előhívás körülményei (amelyek a kísérletek során állandóak voltak) határozzák meg. A második paraméter (p_2) elsődlegesen a kísérleti körülmények függvénye (ezek ugyancsak állandóak voltak), de magába foglalja a radioaktivitás minta általi kioltását is, ami a szöveti metszetek és a különböző standardok esetében eltérő. Az exponenciális modell legfontosabb új tulajdonságai: 1) valódi teoretikus háttérrel rendelkezik, ennek eredményeként azonos feltételek mellett a különböző kísérletek egyforma standard sorozataihoz tartozó szenzitometrikus görbék regressziós paraméterei kis varianciát mutatnak. A korábban alkalmazott megközelítések ezt a feltételt nem teljesítik (Baskin és Stahl, 1993), így használatuk, különösen egymást követő kísérletekben, ahol a filmeket nem együtt exponálják, nem megbízható; 2) adott kísérleti elrendezés mellett az eltérő kioltás révén különböző szenzitometrikus görbék a γ transzformációs hányados segítségével egymásba transzformálhatók; ennek legfontosabb gyakorlati alkalmazása a különböző standard sorozatok szövet-ekvivalens radioaktivitásra történő kalibrációja.

A dot blot alapú [^{35}S]-membrán standard sorozatot laboratóriumunkban fejlesztettük ki (Palfi és mtsai., 1998). A standard sorozat elkészítése gyors és egyszerű: a hibridizációhoz használt próbából hígítási sorozatot készítünk, azt membránra szűrjük, ahhoz UV-besugárzással rögzítjük, végül megszárítjuk. Az egész folyamat kevesebb, mint egy órát vesz igénybe, és mentes a szövetpaszta sorozat készítésének hátrányaitól (Baskin és Stahl, 1993; Davenport és mtsai., 1988). A membrán standard sorozat által lefedett radioaktív tartomány pontosan meghatározható, reprodukálható, ugyanakkor a különböző kísérleti elvárásokhoz alkalmazkodva könnyen változtatható. Mérete kompakt, összehasonlítható a műanyag-bázisú, kereskedelmi forgalomban kapható standardokéval, előállítási költsége azonban csak töredéke azok árának. Számos kedvező tulajdonsága alapján a membrán standard sorozat ésszerű alternatívát kínál a ma használatos standard sorozatokkal szemben. Fontos azonban megjegyezni, hogy a felhasznált próba gélkromatográfiás tisztítása elengedhetetlen követelmény, hiszen a

standard készítéséhez használt membrán a nem beépült nukleotidokat átengedi. Mivel az in vitro transzkripció során a jelölt nukleotidok beépülése csak 40-80%, a tisztítás nélküli reakciókeverék használata a membrán által ténylegesen megtartott radioaktivitás jelentős túlbecslését eredményezné. A radioaktív jel cRNS próbában történő felvitele esetében az RNáz szennyeződés hasonló hibákhoz vezethet. Az RNáz mentes környezet kialakítása azonban nem igényel külön befektetést, hiszen az in situ hibridizáció szükségszerűen csak ilyen körülmények között végezhető el. A fentieket szem előtt tartva, kísérleteink során a membrán a felvitt radiokativitás 100%-át megtartotta. Bár a membrán standardhoz használt radioaktív jel ezekben a kísérletekben [^{35}S]cRNS próba volt, a módszer könnyen alkalmazható különböző radioizotópok (pl. [^{3}H], [^{32}P], [^{33}P]) valamelyikével jelölt oligo vagy DNS próbák esetében is.

Összegezve, kvantifikációs módszerünk magába foglalja: 1) a membrán standardok matematikai transzformáció segítségével szövet-ekvivalens radioaktivitásra történő kalibrációját; 2) az így kalibrált standard sorozatok regressziós egyenleteinek felhasználását a szöveti metszetek autoradiogrammjainak ROD értékeihez tartozó radioaktivitások meghatározására. Az exponenciális modell teoretikus alapjaiból következő megbízhatósága különösen akkor mutatkozik meg, ha nemcsak egy adott kísérlet relatív változásait kívánjuk meghatározni, hanem számos kísérletsorozat kvantitatív adatait hasonlítjuk össze. A módszer felhasználhatóságát a patkányagyban a három CaM gén mRNS kópiaszámainak meghatározása révén bizonyítottuk (Palfi és mtsai., 1998; Palfi és mtsai., 1999b).

A CaM mRNS-ek régió- és sejtspecifikus megoszlása a felnőtt patkányagyban. A CaM mRNS-ek in vivo és in vitro intracelluláris lokalizációja

CaM I-, CaM II- és CaM III-génspecifikus, a mRNS-ek 3'-UTR-ival komplementer cRNS próbákat terveztünk. A próbák specificitását Northern blot analízissel ellenőriztük; az általunk az agyban detektált 6 CaM mRNS fajta megegyezett a korábban mások által leírtakkal (Gannon és McEwen, 1994; Ikeshima és mtsai., 1993; Nojima, 1989). A próbák nem mutattak sem kereszthibridizációt a másik CaM génekhez tartozó mRNS-ekkel, sem nemspecifikus hibridizációt más mRNS fajtákkal. A három CaM gén erős expresszióját a patkányagyban mind a Northern blot analízise, mind az in situ hibridizáció eredményei megerősítették, s ezek összhangban állnak a CaM fehérje emlős agyban mért magas koncentrációjával (Caceres és mtsai., 1983; Cheung, 1982; DeLorenzo, 1982; Vendrell és mtsai., 1991; Zhou és mtsai., 1985).

Az in situ hibridizáció eredményei szerint a három CaM gén bazális kifejeződése a patkányagyban széleskörű. A CaM génekhez tartozó mRNS-ek általunk megfigyelt általános területi megoszlási mintázata megegyezik a más szerzők által korábban leírtakkal (Barron és mtsai., 1995; Cimino és mtsai., 1990; Gannon és McEwen, 1994; Ikeshima és mtsai., 1993; Matsuo és mtsai., 1993; Matsuoka és mtsai., 1992; Ni és mtsai., 1992a). Ugyanakkor a fenti

munkák kvalitatív adatainak – amelyek ráadásul a három CaM gén közül leggyakrabban csak egynek az expresszióját jellemezték – összehasonlító kiértékelése gyakorlatilag lehetetlen. A patkányagyban a három CaM gén expresszióját vizsgálva mind Ikeshima és mtsai. (1993), mind Gannon és McEwen (1994) hasonló megoszlást talált, amelyből koordinált génkifejeződésre következtetett. Saját eredményeink ezzel ellentétben a CaM mRNS-ek élettani körülmények közötti jelentős mennyiségbeli különbségeire utalnak a patkányagy számos területén (Palfi és mtsai., 1998; Palfi és mtsai., 1999b). Eredményeinkkel összhangban a három CaM gén differenciált bazális expresszióját az egéragyban is megfigyelték (Sola és mtsai., 1996). Munkánk jelentőségét az eddig publikáltakkal szemben az adja, hogy kvantitatív módon (mRNS kópiaszámban) és részletesen (több mint 70 agyterületet leírva) jellemzi a CaM gének bazális expresszióját a patkány agyában. Fontos megjegyezni, hogy az mRNS kópiaszámokban kifejezett adatok valójában a hibridizált cRNS póbák mennyiségét jelölik. Ezek az értékek a valódi mRNS kópiaszámokat több okból is alulbecslik: az mRNS molekulák egy része degradálódhat a szövet preparálása közben, a fixálás nem feltétlenül az összes mRNS molekulát rögzíti, a fixált mRNS molekulák egy része a próba számára nem hozzáférhető, és a hozzáférhető mRNS molekulák bizonyos százaléka a hibridizáció szempontjából nincs kedvező konformációban. Ezek a tényezők tehát csökkentik a mérhető mRNS molekulák számát, azonban feltételezhetjük, hogy e faktorok a legtöbb mRNS fajta hibridizációját közel azonos módon befolyásolják.

Az mRNS molekulák mennyiségének konkrét meghatározása a három CaM gén expressziójának közvetlen összehasonlítását tette lehetővé. Mindhárom CaM gén bazális expressziója esetében jelentős, mRNS kópiaszámban kifejezve 35-40-szeres, területi különbségeket detektáltunk a patkányagyban. Számos agyterületen a három CaM gén differenciált expresszióját figyeltük meg, ilyenek a bulbus olfactorius külső plexiform rétege, a cortex cerebri 1. rétege, a globus pallidus, a nucleus tractus diagonalis, a nucleus septalis lateralis, a nucleus suprachiasmaticus, a nucleus supraopticus, a hippocampus, a gyrus dentatus, a nucleus habenulae medialis, a stratum opticum colliculi superioris és a cotrex cerebelli. A differenciált CaM génexpressziót számos agyterületen, így a cerebrális, cerebelláris és hippocampális molekuláris rétegekben (Palfi és mtsai., 1999b), a cortex piriformis, a globus pallidus, a nucleus supraopticus és a nucleus suprachiasmaticus területén (Palfi és mtsai., 1998) mi írtuk le először. Erős, nemneuronális CaM génexpressziót figyeltünk meg a plexus choroideusban és az ependyma sejtekben. A CaM II mRNS-t a plexus choroideusban (Matsuoka és mtsai., 1992), valamint a CaM fehérje gliális jelenlétét a hippocampusban (Caceres és mtsai., 1983; Sola és mtsai., 1999; Sola és mtsai., 1997a; Sola és mtsai., 1997b) és a patkány agykérgéből izolált gliális sejtmagvakban már korábban kimutatták (Vendrell és mtsai., 1991).

A különböző agyterületek eltérő CaM mRNS tartalma részben az őket felépítő különböző idegsejttípusok egyedi expressziós mintázatából adódhat. A sejttípus-specifikus mRNS megoszlás vizsgálata azt mutatta, hogy az adott CaM gén expresszióját a különböző

idegsejttípusok között összehasonlítva jelentős különbségek adódnak, ami mRNS kópiaszámban kifejezve megközelíti a négyszerest. Fontos megjegyezni, hogy azok a sejttípusok, amelyekben a kópiaszám meghatározás lehetséges volt, viszonylag magas expresszióval rendelkeztek, ezért a tényleges különbség más, alacsonyabb expresszióval rendelkező sejtek révén az itt mért adatokat meghaladhatja. A 3 CaM gén expresszióját adott idegsejttípusokon belül összehasonlítva ugyancsak jelentős, mRNS kópiaszámban kifejezve kb. kétszeres, eltéréseket találtunk. Összefoglalva, a különböző idegsejtek között, illetve adott sejttípuson belül a 3 CaM gén között szignifikáns expressziós különbségek vannak; legjobb tudásunk szerint az idegrendszeri CaM génexpresszió ilyen típusú összehasonlítására nincs korábbi irodalmi példa.

Az emlősagy bizonyos területeinek réteges szerkezetét kihasználva a CaM mRNS-ek intracelluláris lokalizációját is megvizsgáltuk. Korábbi kísérletek eredményeivel összhangban (Berry és Brown, 1996; Cimino és mtsai., 1990; Gannon és McEwen, 1994; Ikeshima és mtsai., 1993; Matsuoka és mtsai., 1992; Ni és mtsai., 1992b; Sola és mtsai., 1996; Sola és mtsai., 1997b) az idegsejttesteket tartalmazó rétegekben általában erős CaM génexpressziót figyeltünk meg. A fenti közlemények eredményeivel ellentétben a cortex cerebri, a cortex cerebelli és a hippocampus molekuláris rétegeiben, valamint a bulbus olfactorius külső plexiform rétegében is detektáltuk a CaM mRNS-ek diffúz jelenlétét, noha pontszerű, egyértelműen sejttestekhez kapcsolódó jelölődést szintén megfigyeltünk. Ezeken a területeken a CaM elsődlegesen neuronális expresszióját a CaM immuncitokémia bizonyítja (Berry és Brown, 1996; Caceres és mtsai., 1983; Sola és mtsai., 1999; Sola és mtsai., 1996; Sola és mtsai., 1997a; Sola és mtsai., 1997b), ugyanis az immuncitokémiai jel döntő része az erősen festődő dendritekhez kapcsolódik, bár bizonyos kísérleti körülmények között a gliasejtekben is megfigyelhető (Sola és mtsai., 1997a). Ezek szerint a CaM fehérje sokkal nagyobb mennyiségben van jelen a neuronokban, mint a gliasejtekben, így feltételezhető, hogy a mért CaM mRNS tartalom is elsősorban a neuronokhoz (azok dendritjeihez) és nem a gliasejtekhez tartozik. A CaM mRNS-ek dendritikus transzlokációja a CaM I esetében a korai embrionális fejlődés során a patkányagy kérgi, hippocampális és Purkinje neuronjaiban (Berry és Brown, 1996), a CaM I és a CaM II esetében pedig a PC12 sejtekben már korábban is ismert volt (Zhang és mtsai., 1993); ezek a tanulmányok azonban mind kvalitatív jellegűek voltak. A dendritgazdag területeken az egyes CaM génekhez tartozó mRNS-ek kópiaszámait összehasonlítva szignifikáns és következetes különbségeket találtunk. Ezek alapján az érett neuronokban nemcsak a CaM mRNS-ek dendritikus transzlokációjának tényét, hanem a dendritikus transzlokáció differenciált voltát is valószínűsíthetjük. Korábbi kísérletek eredményeivel egybehangzóan (Cimino és mtsai., 1990; Matsuoka és mtsai., 1992; Ni és mtsai., 1992b; Sola és mtsai., 1996) a fehérállományban mindhárom CaM gén esetében nagyon alacsony expressziót mértünk, ami feltételezi, hogy az axonális lokalizáció nem jellemző, illetve, hogy a gliális (itt elsődlegesen oligodendrocitákhoz tartozó) CaM expresszió nagyon alacsony.

A CaM mRNS-ek in situ hibridizációval és a CaM fehérje immuncitokémiával megfigyelt megoszlása hasonló (Caceres és mtsai., 1983; Palfi és mtsai., 1999b; Sola és mtsai., 1999; Sola és mtsai., 1996; Sola és mtsai., 1997a; Sola és mtsai., 1997b). A CaM aktivitás (Zhou és mtsai., 1985) és a CaM mRNS megoszlás azonban nem fed át teljesen, hiszen például a nucleus caudatus-putamen aktivitása magas, ugyanakkor mRNS tartalma mérsékelt. Továbbá, amíg a különböző agyterületeken a CaM aktivitásokban legfeljebb 10-szeres (Zhou és mtsai., 1985), addig a CaM mRNS-ek kópiaszámaiban 35-40-szeres eltérések vannak (Palfi és mtsai., 1999b). Megjegyzendő, hogy a CaM aktivitás és a CaM fehérjetartalom között is jelentős különbségek lehetnek, hiszen a fehérjetartalom bizonyos százaléka inaktív formában van jelen a sejtben.

Korábban számos, a primer neuronokhoz sok tulajdonságban hasonló sejtvonalat fejlesztettek ki. Ezek közé tartoznak a raphe sejtekből (White és mtsai., 1994), a kisagyból (MacManus és mtsai., 1989), a hippocampusból (Berger és mtsai., 1998; Eves és mtsai., 1992), a striátumból (Giordano és mtsai., 1993; Wainwright és mtsai., 1995) származó és a PC12 sejtvonalak (Greene és Tischler, 1976). Az immortalizált sejtek iránti fokozódó igény fő oka, hogy e sejtek transzplantálása révén különböző, bennük már eredendően meglevő faktorok agyba juttatása válhat lehetővé. Az idővel lecsengő transzgénexpresszióval szemben így a primer neuronok onkogén transzdukciója alternatív utat kínál az idegrenszerben valamilyen okból hiányzó faktorok pótlására (Berger és mtsai., 1998; Eves és mtsai., 1992; Gage és mtsai., 1995). A felhasznált sejtvonalakkal szemben támasztott fontos követelmény a kiindulási sejttípusra jellemző tulajdonságok legalább részleges megléte. A CaM génexpresszió szempontjából eddig egyedül a PC12 sejteket tanulmányozták (Bai és mtsai., 1992; Bai és Weiss, 1991; Zhang és mtsai., 1993). Az M26-1F sejteken végzett vizsgálataink szerint a CaM génexpresszió a neuronokra jellemző intenzitást mutat, ugyanakkor a három CaM gén mRNS-einek összetétele (CaM III < CaM I ≈ CaM II) némileg eltér a kiindulási agyterületétől (nucleus caudatus-putamen; CaM I ≈ CaM III < CaM II; Palfi és mtsai., 1999a; 1999b). A CaM I és a CaM II mRNS-ek hibridizációja az M26-1F sejtekben mind a sejtek szómájában, mind azok nyúlványaiban megfigyelhető volt, ugyanakkor a CaM III-specifikus jel túl alacsony volt a neuritekben történő lokalizációhoz. A CaM I és CaM II mRNS-ek nyúlványokban megfigyelt lokalizációja ugyancsak e sejtek neuronális fenotípusára utal. Adataink az M26-1F sejtvonal további jellemzéséhez szolgáltatnak új információt.

A CaM génexpresszió szabályozása a hypothalamikus magnocelluláris magokban 10 napos vízmegvonást követően

A vízmegvonás hatására a CaM gének régió-specifikus szabályozását figyeltük meg (Palfi és Gulya, 1999). A vizsgált agyterületek döntő többségét a kontroll, bazális értékekhez viszonyítva megtartott vagy kissé csökkent CaM mRNS tartalom jellemezte. A nucleus supraopti-

cusban azonban a CaM gének expressziója jelentősen és differenciált módon fokozódott. Az extrahypothalamikus területeken és a nucleus suprachiasmaticusban (ez utóbbi vazopresszinerg, de parvocelluláris mag, amely funkcionálisan különbözik a hypothalamikus magnocelluláris rendszertől) mért lefeljebb 15%-os expresszió csökkenést az extracelluláris tér kedvezőtlen körülményeire adott sejtválaszként értékeltük, amely egy háztartási fehérje génjei esetében jelentős változásként értelmezhető. A magnocelluláris hypothalamikus magokban az ozmotikus stimulus hatására fellépő fokozott neuroszekretoros működés eredményeként fokozott CaM génkifejeződésre számítottunk. Meglepő módon a két magnocelluláris mag expressziója eltérően változott. A nucleus supraopticusban ugyanis jelentős CaM génexpresszió fokozódást (126-169%), ugyanakkor a nucleus paraventricularis hypothalamiban az extrahypothalamikus területek expressziójához hasonló, kb. 10%-os csökkenést detektáltunk. Noha e két mag egyazon funkcionális rendszerbe sorolható, a CaM expressziójukban megfigyelt eltérő szabályozásuk eltérő szerepükre utalhat. A differenciált funkciót számos irodalmi adat is támogatja. Ozmotikus stimulálás hatására a vazopresszin gén expressziója szignifikánsan nagyobb mértékben emelkedik a nucleus supraopticusban, mint a nucleus paraventricularisban (Gulya és mtsai., 1991; Sherman és mtsai., 1986a; Sherman és mtsai., 1986b). A magnocelluláris sejtek elektrofiziológiai tulajdonságai szintén különböznek, ugyanis az oxitocint, de méginkább a vazopresszint szintetizáló sejtek az ozmotikus stimulálásra sokkal kevésbé érzékenyek a nucleus paraventricularisban, mint a nucleus supraopticusban (Brimble és Dyball, 1977; Brimble és mtsai., 1978; Wakerley és mtsai., 1978). A 10 napos vízmegvonás hatására a nucleus supraopticusban a CaM mRNS szintek szignifikánsan megemelkedtek: CaM I (138%), CaM II (126%) és CaM III (169%). A változások mértéke a CaM I és a CaM III, valamint a CaM II és a CaM III között szignifikánsan különbözött. A CaM gének adott agyterületen vagy adott sejttípusban megfigyelhető differenciált szabályozása számos más kísérleti stimulus esetében is ismert (Bai és mtsai., 1992; Bai és Weiss, 1991; Barron és mtsai., 1995; Gannon és McEwen, 1994; Sola és mtsai., 1997b).

Összefoglalás

A CaM gének – a CaM-nak az idegrendszer működésében betöltött jelentőségének megfelelően – széleskörben expresszálódnak a patkányagyban. A szöveti hierarchia különböző szintjein a CaM gének differenciált expresszióját detektáltuk. Agyterület-specifikus CaM mRNS megoszlást mutattunk ki a felnőtt patkányban élettani körülmények között. Megállapítottuk, hogy ez legalábbis részben a különböző idegsejttípusok egymástól jelentősen különböző egyedi expressziós mintázatából következik. Kimutattuk, hogy in vivo a CaM mRNS-ek dendritikusan transzlokáltak és a transzlokáció mértéke a három CaM gén között jelentősen eltér. Az M26-1F striatális sejtvonalban elsőként jellemeztük a CaM gének expresszióját. Kísérleti

körülmények között, ozmotikus stimulációt követően, a hypothalmikus magnocelluláris rendszer aktivációja differenciált CaM génexpressziós változásokat eredményezett. A kvantitatív analízishez egy új kvantifikációs módszert dolgoztunk ki és kutatásainkhoz azt sikeresen alkalmaztunk.

Az irodalmi adatok és saját eredményeink azt mutatják, hogy az emlősökben élettani körülmények között a különböző agyterületek, idegsejttípusok, de még az idegsejtek különböző kompartmentjei is, eltérő mennyiségben tartalmazzák a CaM mRNS-eket. Ezek feltehetően különböző mértékben járulnak hozzá a sejtekben és azok kompartmentjeiben aktuálisan jelenlevő CaM fehérje tartalomhoz. A differenciált bazális expresszión túl a különböző agyterületeken, illetve a különböző idegsejtekben és azok kompartmentjeiben, a különböző stimulusok egyedi, egymástól lényegében független hatást gyakorolhatnak a három CaM gén expressziójára. Ez a CaM mRNS mintázat térben és időben koordinált változásait eredményezheti, amely biztosítja a megváltozott igényeknek megfelelő mennyiségű és lokalizációjú CaM fehérje szintézisét.

Adler EM, Augustine GJ, Duffy SN, Charlton MP (1991) Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. J Neurosci 11:1496-507.

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 23:115-21.

Allbritton NL, Meyer T, Stryer L (1992) Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5- trisphosphate. Science 258:1812-5.

Amara FM, Sun J, Wright JA (1996) Defining a novel cis-element in the 3'-untranslated region of mammalian ribonucleotide reductase component R2 mRNA. cis-trans-interactions and message stability. J Biol Chem 271:20126-31.

Amemiya Y, Miyahara J (1988) Imaging plate illuminates many fields. Nature 336:89-90.

Andressen C, Blumcke I, Celio MR (1993) Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. Cell Tissue Res 271:181-208.

Armstrong DL (1989) Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca2+-activated phosphatase in mammalian brain. Trends Neurosci 12:117-22.

Babu YS, Sack JS, Greenhough TJ, Bugg CE, Means AR, Cook WJ (1985) Three-dimensional structure of calmodulin. Nature 315:37-40.

Bachs O, Agell N, Carafoli E (1994) Calmodulin and calmodulin-binding proteins in the nucleus. Cell Calcium 16:289-96.

Bai G, Nichols RA, Weiss B (1992) Cyclic AMP selectively up-regulates calmodulin genes I and II in PC12 cells. Biochim Biophys Acta 1130:189-96.

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. J Cell Physiol 149:414-21.

Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. Trends Neurosci 15:303-8.

Barron S, Tusell JM, Serratosa J (1995) Effect of hexachlorocyclohexane isomers on calmodulin mRNA expression in the central nervous system. Brain Res Mol Brain Res 30:279-86.

Bashirullah A, Cooperstock RL, Lipshitz HD (1998) RNA localization in development. Annu Rev Biochem 67:335-94.

Baskin DG, Stahl WL (1993) Fundamentals of quantitative autoradiography by computer densitometry for in situ hybridization, with emphasis on 33P. J Histochem Cytochem 41:1767-76.

Bell RM (1986) Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. Cell 45:631-2.

Bender PK, Dedman JR, Emerson CP, Jr. (1988) The abundance of calmodulin mRNAs is regulated in phosphorylase kinase- deficient skeletal muscle. J Biol Chem 263:9733-7.

Berger F, Gage FH, Vijayaraghavan S (1998) Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. J Neurosci 18:6871-81.

Berridge MJ (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature 361:315-25.

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.

Braun AP, Schulman H (1995) The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. Annu Rev Physiol 57:417-45.

Brimble MJ, Dyball RE (1977) Characterization of the responses of oxytocin- and vasopressin-secreting neurones in the supraoptic nucleus to osmotic stimulation. J Physiol (Lond)

271:253-71.
Brimble MJ, Dyball RE, Forsling ML (1978) Oxytocin release following osmotic activation of oxytocin neurones in the paraventricular and supraoptic nuclei. J Physiol (Lond) 278:69-78.
Brostrom CO, Huang YC, Breckenridge BM, Wolff DJ (1975) Identification of a calcium-binding protein as a calcium-dependent regulator of brain adenylate cyclase. Proc Natl Acad Sci U S A 72:64-8.
Burgin KE, Waxham MN, Rickling S, Westgate SA, Mobley WC, Kelly PT (1990) In situ hybridization histochemistry of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. J Neurosci 10:1788-98.
Burke BE, DeLorenzo RJ (1981) Ca2+- and calmodulin-stimulated endogenous phosphorylation of neurotubulin. Proc Natl Acad Sci U S A 78:991-5.
Burke BE, DeLorenzo RJ (1982) Ca2+ and calmodulin-dependent phosphorylation of endogenous synaptic vesicle tubulin by a vesicle-bound calmodulin kinase system. J Neurochem 38:1205-18.
Burke BE, Delorenzo RJ (1982) Ca2+ and calmodulin-regulated endogenous tubulin kinase activity in presynaptic nerve terminal preparations. Brain Res 236:393-415.
Caceres A, Bender P, Snavely L, Rebhun LI, Steward O (1983) Distribution and subcellular localization of calmodulin in adult and developing brain tissue. Neuroscience 10:449-61.
Capano CP, Giuditta A, Castigli E, Kaplan BB (1987) Occurrence and sequence complexity of polyadenylated RNA in squid axoplasm. J Neurochem 49:698-704.
Cheung WY (1980) Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. Science 207:19-27.
Cheung WY (1982) Calmodulin. Sci Am 246:62-70.
Chien YH, Dawid IB (1984) Isolation and characterization of calmodulin genes from Xenopus laevis. Mol Cell Biol 4:507-13.
Choi DW (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. Trends Neurosci 11:465-9.
Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. J Neurobiol 23:1261-76.
Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162:156-9.
Chun JT, Gioio AE, Crispino M, Giuditta A, Kaplan BB (1996) Differential compartmentalization of mRNAs in squid giant axon. J Neurochem 67:1806-12.
Cimino M, Chen JF, Weiss B (1990) Ontogenetic development of calmodulin mRNA in rat brain using in situ hybridization histochemistry. Brain Res Dev Brain Res 54:43-9.
Clapham DE (1995) Calcium signaling. Cell 80:259-68.
Corneliussen B, Holm M, Waltersson Y, Onions J, Hallberg B, Thornell A, Grundstrom T (1994) Calcium/calmodulin inhibition of basic-helix-loop-helix transcription factor domains. Nature 368:760-4.
Crocker G, Dawson RA, Barton CH, MacNeil S (1988) An extracellular role for calmodulin-like activity in cell proliferation. Biochem J 253:877-84.
Danchin A, Sezer O, Glaser P, Chalon P, Caput D (1989) Cloning and expression of mouse-brain calmodulin as an activator of Bordetella pertussis adenylate cyclase in Escherichia coli. Gene 80:145-9.
Dash PK, Karl KA, Colicos MA, Prywes R, Kandel ER (1991) cAMP response element-binding protein is activated by Ca2+/calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 88:5061-5.
Davenport AP, Beresford IJM, Hall MD, Hill RG, Hughes J (1988) Quantitative autoradiography in neuroscience. In FW Van Leeuwen, RM Bujis, CW Pool, O Pach (eds.): Molecular

neuroanatomy. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, pp. 121-145.
DeLorenzo RJ (1980) Role of calmodulin in neurotransmitter release and synaptic function. Ann N Y Acad Sci 356:92-109.
DeLorenzo RJ (1982) Calmodulin in neurotransmitter release and synaptic function. Fed Proc 41:2265-72.
DeLorenzo RJ, Freedman SD, Yohe WB, Maurer SC (1979) Stimulation of Ca2+-dependent neurotransmitter release and presynaptic nerve terminal protein phosphorylation by calmodulin and a calmodulin- like protein isolated from synaptic vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A 76:1838-42.
Doble A (1995) Excitatory amino acid receptors and neurodegeneration. Therapie 50:319-37.
Ehn E, Larsson (1979) Properties of an antiscratch-layer-free X-ray film for the autoradiographic registration of tritium. Sci Tools 26:24-29.
Enslen H, Soderling TR (1994) Roles of calmodulin-dependent protein kinases and phosphatase in calcium-dependent transcription of immediate early genes. J Biol Chem 269:20872-7.
Eves EM, Tucker MS, Roback JD, Downen M, Rosner MR, Wainer BH (1992) Immortal rat hippocampal cell lines exhibit neuronal and glial lineages and neurotrophin gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A 89:4373-7.
Fujisawa H, Yamauchi T, Nakata H, Okuno S (1984) Role of calmodulin in neurotransmitter synthesis. Fed Proc 43:3011-4.
Gage FH, Ray J, Fisher LJ (1995) Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. Annu Rev Neurosci 18:159-92.
Gallin WJ, Greenberg ME (1995) Calcium regulation of gene expression in neurons: the mode of entry matters. Curr Opin Neurobiol 5:367-74.
Gannon MN, McEwen BS (1994) Distribution and regulation of calmodulin mRNAs in rat brain. Brain Res Mol Brain Res 22:186-92.
Gao FB (1998) Messenger RNAs in dendrites: localization, stability, and implications for neuronal function. Bioessays 20:70-8.
Garner CC, Tucker RP, Matus A (1988) Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. Nature 336:674-7.
Gazzaley AH, Benson DL, Huntley GW, Morrison JH (1997) Differential subcellular regulation of NMDAR1 protein and mRNA in dendrites of dentate gyrus granule cells after perforant path transection. J Neurosci 17:2006-17.
Ghosh A, Greenberg ME (1995) Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. Science 268:239-47.
Giordano M, Takashima H, Herranz A, Poltorak M, Geller HM, Marone M, Freed WJ (1993) Immortalized GABAergic cell lines derived from rat striatum using a temperature-sensitive allele of the SV40 large T antigen [published erratum appears in Exp Neurol 1994 Apr;126(2):313]. Exp Neurol 124:395-400.
Giuditta A, Menichini E, Perrone Capano C, Langella M, Martin R, Castigli E, Kaplan BB (1991) Active polysomes in the axoplasm of the squid giant axon. J Neurosci Res 28:18-28.
Gnegy ME, Agrawal A, Hewlett K, Yeung E, Yee S (1994) Repeated haloperidol increases both calmodulin and a calmodulin-binding protein in rat striatum. Brain Res Mol Brain Res 27:195-204.
Goberdhan NJ, Dawson RA, Freedlander E, Mac Neil S (1993) A calmodulin-like protein as an extracellular mitogen for the keratinocyte. Br J Dermatol 129:678-88.
Goda SK, Minton NP (1995) A simple procedure for gel electrophoresis and northern blotting of RNA. Nucleic Acids Res 23:3357-8.
Goldenring JR, McGuire JS, Jr., DeLorenzo RJ (1984) Identification of the major postsynaptic

density protein as homologous with the major calmodulin-binding subunit of a calmodulin-dependent protein kinase. J Neurochem 42:1077-84.
Goochee C, Rasband W, Sokoloff L (1980) Computerized densitometry and color coding of [14C] deoxyglucose autoradiographs. Ann Neurol 7:359-70.
Grab DJ, Carlin RK, Siekevitz P (1980) The presence and functions of calmodulin in the postsynaptic density. Ann N Y Acad Sci 356:55-72.
Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A 73:2424-8.
Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F (1993) Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. Science 259:780-5.
Griffith LC, Schulman H (1988) The multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca2+-dependent phosphorylation of tyrosine hydroxylase. J Biol Chem 263:9542-9.
Gulya K, Dave JR, Hoffman PL (1991) Chronic ethanol ingestion decreases vasopressin mRNA in hypothalamic and extrahypothalamic nuclei of mouse brain. Brain Res 557:129-35.
Gulya K, Orpana AK, Sikela JM, Hoffman PL (1993) Prodynorphin and vasopressin mRNA levels are differentially affected by chronic ethanol ingestion in the mouse. Brain Res Mol Brain Res 20:1-8.
Heizmann CW (1988) Calcium-binding proteins of the EF-type. J Cardiovasc Pharmacol 12:S30-7.
Heizmann CW (1992) Calcium-binding proteins: basic concepts and clinical implications. Gen Physiol Biophys 11:411-25.
Heizmann CW (1993) Calcium signaling in the brain. Acta Neurobiol Exp 53:15-23.
Heizmann CW, Hunziker W (1991) Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. Trends Biochem Sci 16:98-103.
Herb A, Wisden W, Catania MV, Marechal D, Dresse A, Seeburg PH (1997) Prominent dendritic localization in forebrain neurons of a novel mRNA and its product, dendrin. Mol Cell Neurosci 8:367-74.
Hoskins B, Burton CK, Liu DD, Porter AB, Ho IK (1986) Regional and subcellular calmodulin content of rat brain. J Neurochem 46:303-4.
Huang KP (1989) The mechanism of protein kinase C activation. Trends Neurosci 12:425-32.
Huttner WB, Schiebler W, Greengard P, De Camilli P (1983) Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. J Cell Biol 96:1374-88.
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. J Neurosci Res 36:111-9.
Irvine RF (1982) How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? Biochem J 204:3-16.
Ito T, Suzuki T, Lim DK, Wellman SE, Ho IK (1995) A novel quantitative receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry technique using storage phosphor screen imaging. J Neurosci Methods 59:265-71.
Jeffery WR, Tomlinson CR, Brodeur RD (1983) Localization of actin messenger RNA during early ascidian development. Dev Biol 99:408-17.
Jirikowski GF, Sanna PP, Bloom FE (1990) mRNA coding for oxytocin is present in axons of the hypothalamo- neurohypophysial tract [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1990 Dec;87(24):10068]. Proc Natl Acad Sci U S A 87:7400-4.

Jonker A, de Boer PA, van den Hoff MJ, Lamers WH, Moorman AF (1997) Towards quantitative in situ hybridization. J Histochem Cytochem 45:413-23.
Kakiuchi S, Yamazaki R (1970) Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (3). Biochem Biophys Res Commun 41:1104-10.
Kakiuchi S, Yamazaki R, Teshima Y, Uenishi K, Miyamoto E (1975) Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat tissues and occurrence of a calcium-plus-magnesium-ion-dependent phosphodiesterase and its protein activator. Biochem J 146:109-20.
Kapiloff MS, Mathis JM, Nelson CA, Lin CR, Rosenfeld MG (1991) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase mediates a pathway for transcriptional regulation. Proc Natl Acad Sci U S A 88:3710-4.
Kato K (1992) Finding new genes in the nervous system by cDNA analysis. Trends Neurosci 15:319-23.
Kelly PT, McGuinness TL, Greengard P (1984) Evidence that the major postsynaptic density protein is a component of a Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 81:945-9.
Kennedy MB (1989a) Regulation of neuronal function by calcium. Trends Neurosci 12:417-20.
Kennedy MB (1989b) Regulation of synaptic transmission in the central nervous system: long-term potentiation. Cell 59:777-87.
Kennedy MB, Bennett MK, Erondu NE (1983) Biochemical and immunochemical evidence that the "major postsynaptic density protein" is a subunit of a calmodulin-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 80:7357-61.
Kennedy MB, Greengard P (1981) Two calcium/calmodulin-dependent protein kinases, which are highly concentrated in brain, phosphorylate protein I at distinct sites. Proc Natl Acad Sci U S A 78:1293-7.
Kitamura Y, Miyazaki A, Yamanaka Y, Nomura Y (1993) Stimulatory effects of protein kinase C and calmodulin kinase II on N- methyl-D-aspartate receptor/channels in the postsynaptic density of rat brain. J Neurochem 61:100-9.
Klee CB (1991) Concerted regulation of protein phosphorylation and dephosphorylation by calmodulin. Neurochem Res 16:1059-65.
Klee CB, Crouch TH, Richman PG (1980) Calmodulin. Annu Rev Biochem 49:489-515.
Klee CB, Ren H, Wang X (1998) Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. J Biol Chem 273:13367-70.
Knowles RB, Sabry JH, Martone ME, Deerinck TJ, Ellisman MH, Bassell GJ, Kosik KS (1996) Translocation of RNA granules in living neurons. J Neurosci 16:7812-20.
Koller M, Schnyder B, Strehler EE (1990) Structural organization of the human CaMIII calmodulin gene. Biochim Biophys Acta 1087:180-9.
Kristian T, Siesjo BK (1996) Calcium-related damage in ischemia. Life Sci 59:357-67.
Kuhar MJ, Unnerstall JR (1985) Quantitative receptor mapping by autoradiography: some current tecnical problems. Trends Neurosci 8:49-53.
Kuhn DM, Lovenberg W (1982) Role of calmodulin in the activation of tryptophan hydroxylase. Fed Proc 41:2258-64.
Landry CF, Ivy GO, Brown IR (1992) Effect of a discrete dorsal forebrain lesion in the rat on the expression of neuronal and glial-specific genes: induction of calmodulin, NF-L, SC1, and GFAP mRNA. J Neurosci Res 32:280-9.
Landry CF, Watson JB, Kashima T, Campagnoni AT (1994) Cellular influences on RNA sorting in neurons and glia: an in situ hybridization histochemical study. Brain Res Mol Brain Res

27:1-11.
Lechleiter J, Girard S, Clapham D, Peralta E (1991) Subcellular patterns of calcium release determined by G protein- specific residues of muscarinic receptors. Nature 350:505-8.
Lerea LS, McNamara JO (1993) Ionotropic glutamate receptor subtypes activate c-fos transcription by distinct calcium-requiring intracellular signaling pathways. Neuron 10:31-41.
Lieberman DN, Mody I (1994) Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca(2+)-dependent phosphatase. Nature 369:235-9.
Lin CT, Dedman JR, Brinkley BR, Means AR (1980) Localization of calmodulin in rat cerebellum by immunoelectron microscopy. J Cell Biol 85:473-80.
Lin YM, Liu YP, Cheung WY (1974) Cyclic 3':5'-nucleotide phosphodiesterase. Purification, characterization, and active form of the protein activator from bovine brain. J Biol Chem 249:4943-54.
Linden CD, Dedman JR, Chafouleas JG, Means AR, Roth TF (1981) Interactions of calmodulin with coated vesicles from brain. Proc Natl Acad Sci U S A 78:308-12.
Lisman J (1994) The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. Trends Neurosci 17:406-12.
Liu YC, Storm DR (1990) Regulation of free calmodulin levels by neuromodulin: neuron growth and regeneration. Trends Pharmacol Sci 11:107-11.
Llinas R, Sugimori M, Hillman DE, Cherksey B (1992a) Distribution and functional significance of the P-type, voltage- dependent Ca2+ channels in the mammalian central nervous system. Trends Neurosci 15:351-5.
Llinas R, Sugimori M, Silver RB (1992b) Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. Science 256:677-9.
Lu KP, Means AR (1993) Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin. Endocr Rev 14:40-58.
Lu YF, Hayashi Y, Moriwaki A, Tomizawa K, Matsui H (1996) FK506, a Ca2+/calmodulin-dependent phosphatase inhibitor, inhibits the induction of long-term potentiation in the rat hippocampus. Neurosci Lett 205:103-6.
Lucas LR, Mize RR, Harlan RE (1994) Semiquantitative analysis of in-situ hybridization results using IMAGE software: a rapid method for counting reduced silver grains over mRNA-positive cells. J Neurosci Methods 52:101-9.
MacManus JP, Gillen MF, Korczak B, Nojima H (1989) Differential calmodulin gene expression in fetal, adult, and neoplastic tissues of rodents. Biochem Biophys Res Commun 159:278-82.
MacNeil S, Dawson RA, Crocker G, Barton CH, Hanford L, Metcalfe R, McGurk M, Munro DS (1988) Extracellular calmodulin and its association with epidermal growth factor in normal human body fluids. J Endocrinol 118:501-9.
Majerus PW, Connolly TM, Deckmyn H, Ross TS, Bross TE, Ishii H, Bansal VS, Wilson DB (1986) The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. Science 234:1519-26.
Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Nicoll RA (1989) The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission -its role in long-term potentiation. Trends Neurosci 12:444-50.
Malenka RC, Madison DV, Nicoll RA (1986) Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. Nature 321:175-7.
Manalan AS, Krinks MH, Klee CB (1984) Calcineurin: a member of a family of calmodulin-stimulated protein phosphatases. Proc Soc Exp Biol Med 177:12-6.
Marcum JM, Dedman JR, Brinkley BR, Means AR (1978) Control of microtubule assembly-

disassembly by calcium-dependent regulator protein. Proc Natl Acad Sci U S A 75:3771-5.
Marty A (1989) The physiological role of calcium-dependent channels. Trends Neurosci 12:420-4.
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. Brain Res Mol Brain Res 20:9-20.
Matsuoka I, Giuili G, Poyard M, Stengel D, Parma J, Guellaen G, Hanoune J (1992) Localization of adenylyl and guanylyl cyclase in rat brain by in situ hybridization: comparison with calmodulin mRNA distribution. J Neurosci 12:3350-60.
Matthews RP, Guthrie CR, Wailes LM, Zhao X, Means AR, McKnight GS (1994) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. Mol Cell Biol 14:6107-16.
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. Proc Natl Acad Sci U S A 93:13250-5.
McCormick DA (1999) Membrane potential and action potential. In MJ Zigmond, FE Bloom, SC Landis, JL Roberts,LR Squire (eds.): Fundamental neuroscience. San Diego: Academic Press, pp. 129-154.
McGlade-McCulloh E, Yamamoto H, Tan SE, Brickey DA, Soderling TR (1993) Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Nature 362:640-2.
McPhalen CA, Strynadka NC, James MN (1991) Calcium-binding sites in proteins: a structural perspective. Adv Protein Chem 42:77-144.
Means AR, VanBerkum MF, Bagchi I, Lu KP, Rasmussen CD (1991) Regulatory functions of calmodulin. Pharmacol Ther 50:255-70.
Miljanich GP, Ramachandran J (1995) Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. Annu Rev Pharmacol Toxicol 35:707-34.
Miller JA (1991) The calibration of 35S or 32P with 14C-labeled brain paste or 14C- plastic standards for quantitative autoradiography using LKB Ultrofilm or Amersham Hyperfilm. Neurosci Lett 121:211-4.
Miller JA, Hoffer BJ, Zahniser NR (1988) An improved calibration procedure for computer-based quantitative autoradiography utilizing a mathematical model for the non-linear response of camera and film. J Neurosci Methods 22:233-8.
Miller SG, Kennedy MB (1985) Distinct forebrain and cerebellar isozymes of type II Ca2+/calmodulin- dependent protein kinase associate differently with the postsynaptic density fraction. J Biol Chem 260:9039-46.
Mohr E, Fehr S, Richter D (1991) Axonal transport of neuropeptide encoding mRNAs within the hypothalamo- hypophyseal tract of rats. Embo J 10:2419-24.
Moriya M, Tanaka S (1994) Prominent expression of protein kinase C (gamma) mRNA in the dendrite- rich neuropil of mice cerebellum at the critical period for synaptogenesis. Neuroreport 5:929-32.
Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC (1994) Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. Nature 369:486-8.
Muslimov IA, Santi E, Homel P, Perini S, Higgins D, Tiedge H (1997) RNA transport in dendrites: a cis-acting targeting element is contained within neuronal BC1 RNA. J Neurosci 17:4722-33.
Ni B, Brown IR (1993) Modulation of a neuronal calmodulin mRNA species in the rat brain

stem by reserpine. Neurochem Res 18:185-92.
Ni B, Landry CF, Brown IR (1992a) Developmental expression of neuronal calmodulin mRNA species in the rat brain analyzed by in situ hybridization. J Neurosci Res 33:559-67.
Ni B, Rush S, Gurd JW, Brown IR (1992b) Molecular cloning of calmodulin mRNA species which are preferentially expressed in neurons in the rat brain. Brain Res Mol Brain Res 13:7-17.
Nichols RA, Sihra TS, Czernik AJ, Nairn AC, Greengard P (1990) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II increases glutamate and noradrenaline release from synaptosomes. Nature 343:647-51.
Nicoll RA, Kauer JA, Malenka RC (1988) The current excitement in long-term potentiation. Neuron 1:97-103.
Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S (1992) Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. Annu Rev Pharmacol Toxicol 32:449-70.
Niemeyer BA, Suzuki E, Scott K, Jalink K, Zuker CS (1996) The Drosophila light-activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL. Cell 85:651-9.
Nojima H (1989) Structural organization of multiple rat calmodulin genes. J Mol Biol 208:269-82.
Nojima H, Kishi K, Sokabe H (1987) Multiple calmodulin mRNA species are derived from two distinct genes. Mol Cell Biol 7:1873-80.
Nojima H, Sokabe H (1986) Structure of rat calmodulin processed genes with implications for a mRNA-mediated process of insertion. J Mol Biol 190:391-400.
Nojima H, Sokabe H (1987) Structure of a gene for rat calmodulin. J Mol Biol 193:439-45.
Nojima H, Sokabe H (1989) Structural organization of calmodulin genes in the rat genome. Adv Exp Med Biol 255:223-32.
Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. Nature 316:440-3.
Oh S (1995) The generation of nitric oxide and its roles in neurotransmission and neurotoxicity. Keio J Med 44:53-61.
Olink-Coux M, Hollenbeck PJ (1996) Localization and active transport of mRNA in axons of sympathetic neurons in culture. J Neurosci 16:1346-58.
Orrenius S, Nicotera P (1994) The calcium ion and cell death. J Neural Transm Suppl 43:1-11.
Ouimet CC, McGuinness TL, Greengard P (1984) Immunocytochemical localization of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A 81:5604-8.
Palfi A, Gulya K (1999) Water deprivation upregulates the three calmodulin genes in exclusively the supraoptic nucleus of the rat brain. Mol Brain Res, in press.
Palfi A, Hatvani L, Gulya K (1998) A new quantitative film autoradiographic method of quantifying mRNA transcripts for in situ hybridization. J Histochem Cytochem 46:1141-49.
Palfi A, Tarcsa M, Varszegi S, Gulya K (1999a) Calmodulin gene expression in an inmortalized striatal GABAergic cell line. Acta Biol Hung, közlés alatt.
Palfi A, Vizi S, Gulya K (1999b) Differential distribution and intracellular targeting of mRNAs corresponding to the three calmodulin genes in rat brain. A quantitative in situ hybridization study. J Histochem Cytochem 47:583-600.
Palkovits M (1980) Útmutató és atlasz a patkányagy sejtcsoportjainak izolált kivételére. Budapest: Akadémiai Kiadó.
Pan HS, Frey KA, Young AB, Penney JB, Jr. (1983) Changes in [3H]muscimol binding in substantia nigra, entopeduncular nucleus, globus pallidus, and thalamus after striatal lesions as demonstrated by quantitative receptor autoradiography. J Neurosci 3:1189-98.
Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic

Press.
Persechini A, Moncrief ND, Kretsinger RH (1989) The EF-hand family of calcium-modulated proteins. Trends Neurosci 12:462-7.
Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. Physiol Rev 74:595-636.
Prakash N, Fehr S, Mohr E, Richter D (1997) Dendritic localization of rat vasopressin mRNA: ultrastructural analysis and mapping of targeting elements. Eur J Neurosci 9:523-32.
Price NE, Mumby MC (1999) Brain protein serine/threonine phosphatases. Curr Opin Neurobiol 9:336-42.
Putkey JA, Ts'ui KF, Tanaka T, Lagace L, Stein JP, Lai EC, Means AR (1983) Chicken calmodulin genes. A species comparison of cDNA sequences and isolation of a genomic clone. J Biol Chem 258:11864-70.
Putney JW, Jr. (1990) Capacitative calcium entry revisited. Cell Calcium 11:611-24.
Rasband W (1997) NIH Image 1.59 program, developed at the U.S. National Institutes of Health and available from the Internet by anonymous FTP from zippy.nimh.nih.gov or on floppy disk from the National Technical Information Service, Springfield, Virginia, part number PB95-500195GEI.
Remgard P, Ekstrom AR, Wiklund P, Edstrom A (1995) Calmodulin and in vitro regenerating frog sciatic nerves: release and extracellular effects. Eur J Neurosci 7:1386-92.
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. Eur J Biochem 225:71-82.
Roberts WM (1994) Localization of calcium signals by a mobile calcium buffer in frog saccular hair cells. J Neurosci 14:3246-62.
Roberts WM, Jacobs RA, Hudspeth AJ (1990) Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. J Neurosci 10:3664-84.
Roberts-Lewis JM, Cimino M, Krause RGd, Tyrrell DF, Jr., Davis LG, Weiss B, Lewis ME (1990) Anatomical localization of calmodulin mRNA in the rat brain with cloned cDNA and synthetic oligonucleotide probes. Synapse 5:247-54.
Schulman H, Hyman SE (1999) Intracellular signaling. In MJ Zigmond, FE Bloom, SC Landis, JL Roberts, LR Squire (eds.): Fundamental neuroscience. San Diego: Academic Press, pp. 269-316.
Senterre-Lesenfants S, Alag AS, Sobel ME (1995) Multiple mRNA species are generated by alternate polyadenylation from the human calmodulin-I gene. J Cell Biochem 58:445-54.
Seto-Ohshima A, Kitajima S, Sano M, Kato K, Mizutani A (1983) Immunohistochemical localization of calmodulin in mouse brain. Histochemistry 79:251-7.
Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME (1991) CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. Science 252:1427-30.
Sherbany AA, Parent AS, Brosius J (1987) Rat calmodulin cDNA. Dna 6:267-72.
Sherman TG, Civelli O, Douglass J, Herbert E, Watson SJ (1986a) Coordinate expression of hypothalamic pro-dynorphin and pro-vasopressin mRNAs with osmotic stimulation. Neuroendocrinology 44:222-8.
Sherman TG, McKelvy JF, Watson SJ (1986b) Vasopressin mRNA regulation in individual hypothalamic nuclei: a northern and in situ hybridization analysis. J Neurosci 6:1685-94.
Siman R, Baudry M, Lynch G (1983) Purification from synaptosomal plasma membranes of calpain I, a thiol protease activated by micromolar calcium concentrations. J Neurochem 41:950-6.

Siman R, Noszek JC (1988) Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. Neuron 1:279-87.
Skinner TL, Kerns RT, Bender PK (1994) Three different calmodulin-encoding cDNAs isolated by a modified 5'- RACE using degenerate oligodeoxyribonucleotides. Gene 151:247-51.
Skutella T, Probst JC, Blanco E, Jirikowski GF (1994) Localization of tyrosine hydroxylase mRNA in the axons of the hypothalamo-neurohypophysial system. Brain Res Mol Brain Res 23:179-84.
Sobue K, Ichida S, Yoshida H, Yamazaki R, Kakiuchi S (1979) Occurrence of a Ca2+- and modulator protein-activatable ATPase in the synaptic plasma membranes of brain. FEBS Lett 99:199-202.
Sobue K, Morimoto K, Kanda K, Kakiuchi S (1982) Ca2+-dependent binding of [3H]calmodulin to the microsomal fraction of brain. J Biochem (Tokyo) 91:1313-20.
Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M (1977) The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. J Neurochem 28:797-804.
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. Prog Neurobiol 58:207-32.
Sola C, Tusell JM, Serratosa J (1996) Comparative study of the pattern of expression of calmodulin messenger RNAs in the mouse brain. Neuroscience 75:245-56.
Sola C, Tusell JM, Serratosa J (1997a) Calmodulin is expressed by reactive microglia in the hippocampus of kainic acid-treated mice. Neuroscience 81:699-705.
Sola C, Tusell JM, Serratosa J (1997b) Differential response of calmodulin genes in the mouse brain after systemic kainate administration. Neuroscience 78:155-64.
Sonoda M, Takano M, Miyahara J, Kato H (1983) Computed radiography utilizing scanning laser stimulated luminescence. Radiology 148:833-8.
St Johnston D (1995) The intracellular localization of messenger RNAs. Cell 81:161-70.
Steward O (1995) Targeting of mRNAs to subsynaptic microdomains in dendrites. Curr Opin Neurobiol 5:55-61.
Steward O (1997) mRNA localization in neurons: a multipurpose mechanism? Neuron 18:9-12.
Steward O, Banker GA (1992) Getting the message from the gene to the synapse: sorting and intracellular transport of RNA in neurons. Trends Neurosci 15:180-6.
Stewart AA, Ingebritsen TS, Manalan A, Klee CB, Cohen P (1982) Discovery of a Ca2+- and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with calcineurin (CaM-BP80). FEBS Lett 137:80-4.
Swope SL, Moss SI, Raymond LA, Huganir RL (1999) Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res 33:49-78.
Teo TS, Wang JH (1973) Mechanism of activation of a cyclic adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase from bovine heart by calcium ions. Identification of the protein activator as a Ca2+ binding protein. J Biol Chem 248:5950-5.
Tiedge H, Brosius J (1996) Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. J Neurosci 16:7171-81.
Tong G, Shepherd D, Jahr CE (1995) Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin. Science 267:1510-2.
Torre ER, Steward O (1992) Demonstration of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from their

cell bodies. J Neurosci 12:762-72.
Torre ER, Steward O (1996) Protein synthesis within dendrites: glycosylation of newly synthesized proteins in dendrites of hippocampal neurons in culture. J Neurosci 16:5967-78.
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 23:323-38.
Trembleau A, Melia KR, Bloom FE (1995) BC1 RNA and vasopressin mRNA in rat neurohypophysis: axonal compartmentalization and differential regulation during dehydration and rehydration. Eur J Neurosci 7:2249-60.
Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, Fox AP (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. Trends Neurosci 11:431-8.
Unnerstall JR, Niehoff DL, Kuhar MJ, Palacios JM (1982) Quantitative receptor autoradiography using [3H]ultrofilm: application to multiple benzodiazepine receptors. J Neurosci Methods 6:59-73.
Vendrell M, Aligue R, Bachs O, Seratosa J (1991) Presence of calmodulin and calmodulin-binding proteins in the nuclei of brain cells. J Neurochem 57:622-8.
Victor RG, Thomas GD, Marban E, O'Rourke B (1995) Presynaptic modulation of cortical synaptic activity by calcineurin. Proc Natl Acad Sci U S A 92:6269-73.
Wainwright MS, Perry BD, Won LA, O'Malley KL, Wang WY, Ehrlich ME, Heller A (1995) Immortalized murine striatal neuronal cell lines expressing dopamine receptors and cholinergic properties. J Neurosci 15:676-88.
Wakerley JB, Poulain DA, Brown D (1978) Comparison of firing patterns in oxytocin- and vasopressin-releasing neurones during progressive dehydration. Brain Res 148:425-40.
Wallace CS, Lyford GL, Worley PF, Steward O (1998) Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence. J Neurosci 18:26-35.
Wang JH, Stelzer A (1994) Inhibition of phosphatase 2B prevents expression of hippocampal long- term potentiation. Neuroreport 5:2377-80.
Watterson DM, Sharief F, Vanaman TC (1980) The complete amino acid sequence of the Ca2+-dependent modulator protein (calmodulin) of bovine brain. J Biol Chem 255:962-75.
Weinman J, Della Gaspera B, Dautigny A, Dinh DP, Wang J, Nojima H, Weinman S (1991) Developmental regulation of calmodulin gene expression in rat brain and skeletal muscle. Cell Regul 2:819-26.
Weinman S (1991) Calcium-binding proteins: an overview. J Biol Buccale 19:90-8.
Wensley CH, Stone DM, Baker H, Kauer JS, Margolis FL, Chikaraishi DM (1995) Olfactory marker protein mRNA is found in axons of olfactory receptor neurons. J Neurosci 15:4827-37.
White LA, Eaton MJ, Castro MC, Klose KJ, Globus MY, Shaw G, Whittemore SR (1994) Distinct regulatory pathways control neurofilament expression and neurotransmitter synthesis in immortalized serotonergic neurons. J Neurosci 14:6744-53.
Wilhelm JE, Vale RD (1993) RNA on the move: the mRNA localization pathway [published erratum appears in J Cell Biol 1993 Dec;123(6 Pt 1):1625]. J Cell Biol 123:269-74.
Wood JG, Wallace RW, Whitaker JN, Cheung WY (1980) Immunocytochemical localization of calmodulin and a heat-labile calmodulin-binding protein (CaM-BP80) in basal ganglia of mouse brain. J Cell Biol 84:66-76.
Zhang J, Madden TL (1997) PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. Genome Res 7:649-56.

A PhD értekezés összefoglalása

A kalmodulin génexpresszió élettani és kísérleti körülmények közötti összehasonlító vizsgálata patkányagyban

A kálciumion (Ca^{2+}) a baktériumoktól a legspecializáltabb eukarióta sejtekig a szignáltranszdukció egyik általánosan előforduló másodlagos hírvivője. A Ca^{2+} intracelluláris hatásait annak specifikus és reverzibilis megkötésére adaptálódott, ún. Ca^{2+}-kötő fehérjék (KKF-k) révén fejti ki. E fehérjék működésük alapján két típusba sorolhatók. Egyik csoportjukat az ún. "puffer" fehérjék, a másikat az ún. "trigger" fehérjék alkotják. A kalmodulin (CaM) a gerincesekben 148 aminosavból felépülő, "trigger"-típusú KKF, amely minden eddig vizsgált eukarióta sejtben megtalálható sokfunkciós, intracelluláris Ca^{2+}-receptor. A CaM különösen magas koncentrációban fordul elő az emlős idegszövetben, ahol legnagyobb mennyiségben az idegsejtekben található meg. A Ca^{2+}-jel CaM-on keresztül történő transzdukciója több, mint húszféle enzim aktiválása révén valósul meg, ezek közül idegsejtekben a II-es típusú CaM kináz és a kalcineurin a legfontosabb.

A CaM fehérjét gerincesekben több gén is kódolja, a géntermékek aminosav szekvenciája adott fajon belül, sőt, a magasabbrendű gerincesek között is, megegyezik. A patkányban három működö CaM gén (CaM I, CaM II és CaM III) ismert, amelyekről alternatív poliadeniláció révén összesen hétféle mRNS molekula íródik át. A CaM gének expressziója az emlős idegrendszerben különösen magas. A három CaM gén bazális differenciált expressziójára, valamint a génexpresszió in vivo és in vitro kísérleti körülmények között megfigyelhető differenciált szabályozására több példa is ismert. A fejlődő patkányagyban a CaM I mRNS-ek, a patkány feokromocitóma sejtvonal (PC12) sejtjeiben pedig a CaM I és a CaM II mRNS-ek dendritikus lokalizációját korábbi vizsgálatok már kimutatták.

Állati szövetekből származó metszetekben a radioaktivitás nyomonkövetésének egyik lehetősége a film autoradiográfia. A film sötétségének mértéke és az exponált radioaktivitás között fennáló kapcsolatra jellemző, hogy nem lineáris. Explicit elmélet hiányában az összefüggés leírására csak empirikus megfigyelésekre hagyatkozhatunk, ami jelentősen nehezíti a film autoradiogrammok kvantitatív analízisét.

Az állatkísérletekben hím, Sprague-Dawley patkányokat (200-250 g) használtunk. A különböző vizsgálatokhoz az állatokat dekapitáltuk, majd az agyakat kiemeltük a koponyából. Az in situ hibridizációhoz az agyakból kriosztát metszeteket készítettünk, az RNS tisztításhoz az agyakat lefagyasztottuk. Az in vitro kísérletekhez embrionális patkány striátumból származó sejtvonal (M26-1F) immortalizált sejtjeit használtuk.

A CaM I, CaM II és CaM III mRNS-ek 3'-nemtranszlálódó régióinak egy-egy szakaszát klónoztuk, majd azokról in vitro RNS szintézissel [^{35}S]cRNS próbákat készítettünk. A patkányagy koronasíkú kriosztát metszeteit és a fedőlemezeken tenyésztett sejteket in situ hibridizáltuk,

majd a reprezentatív mintákat felülfestettük. Az agyszövetből a teljes RNS tartalmat a guanidin izotiocianát-módszerrel tisztítottuk, denaturáló gélelektroforézissel elválasztottuk, membránra blottoltuk, végül hibridizáltuk.

A radioaktívan jelölt mintákat autoradiográfiás filmre exponáltuk. A kvantifikációhoz különböző radioaktív standard sorozatokat használtunk. Az autoradiográfiás filmeket számítógépes mikrodenzitometriával analizáltuk. A különböző kísérletekben legalább öt állat tartozott a kísérlet szempontjából azonos csoportba. Az eredményeket 1 mm^3 szövettérfogatra vonatkoztatva mRNS kópiaszám értékben adtuk meg. A reprezentatív mintákat β-sugárzásra érzékenyített emulzióval vontuk be.

Kísérleteink során az alábbi eredményeket értük el:

1. A kvantitatív film autoradiográfia leírására teoretikus megfontolásokból kiindulva a következő nemlineáris regressziót vezettük be:

$$\mathrm{ROD} = p_1(1 - \exp[-p_2 x]),$$

ahol a p_1 és a p_2 paraméterek, a ROD a relatív optikai denzitás és x a radioaktivitás.

2. Különböző elnyelésű standard sorozatok (b és m) szenzitometrikus görbéi a transzformációs hányados (γ) segítségével egymásba transzformálhatók:

$$\gamma = p_2^{\,b} / p_2^{\,m}$$

ebből az m sorozat b sorozatra transzformált egyenlete:

$$\mathrm{ROD} = p_1^{\,m}(1 - \exp[-\gamma p_2^{\,m} x])$$

A transzformáció legfontosabb gyakorlati alkalmazása a különböző standard sorozatok szövet-ekvivalens radioaktivitásra történő kalibrációja.

3. Kifejlesztettünk egy új, dot blot alapú [^{35}S]-membrán standard sorozatot. A standard sorozat által lefedett radioaktív tartomány pontosan meghatározható és reprodukálható, ugyanakkor a különböző kísérleti elvárásokhoz alkalmazkodva könnyen változtatható. A radioaktivitás beépítésére [^{3}H]-, [^{32}P]-, [^{33}P]- vagy [^{35}S]-jelölt RNS, oligo vagy DNS próbák is alkalmasak.
4. In situ hibridizációs vizsgálataink több, mint 70 agyterületen kvantitatív módon jellemzik a CaM gének bazális expresszióját a felnőtt patkányban. Mindhárom CaM gén expressziója esetében jelentős területi különbségeket és számos agyterületen a három CaM gén differenciált expresszióját figyeltük meg.
5. A neuron-specifikus CaM mRNS megoszlás vizsgálata a különböző idegsejttípusokban eltérő CaM génexpressziós mintázatot tárt fel.
6. In vivo intracelluláris lokalizációs kísérleteink szerint az érett neuronokban a CaM mRNS-ek dendritikusan transzlokálódnak a felnőtt patkányagy több területén is. A dendritikus transzlokáció differenciált, a dendritikus mRNS-ek mennyisége minden vizsgált agyterületen a CaM I, CaM III, CaM II sorrendben csökken.
7. Az M26-1F sejtekben a neuronokra jellemző intenzitású CaM génexpressziót detektáltunk. A CaM I és CaM II mRNS-ek esetében a hibridizáció mind a sejtek szómájában, mind azok nyúlványaiban megfigyelhető volt.

8. A 10 napos vízmegvonás hatására a nucleus supraopticusban a CaM mRNS szintek jelentősen és differenciált módon emelkedtek: 138% (CaM I), 126% (CaM II) és 169% (CaM III). A nucleus paraventricularis hypothalamiban és az extrahypothalamikus területeken megtartott vagy kissé csökkent CaM mRNS tartalmat mértünk. Noha a nucleus supraopticus és a nucleus paraventricularis hypothalami egyazon funkcionális rendszerhez tartozik, CaM génexpressziójuk eltérő szabályozása eltérő szerepükre utalhat.

Az irodalmi adatok és saját eredményeink azt mutatják, hogy az emlősökben élettani körülmények között a különböző agyterületek, idegsejttípusok, de még az idegsejtek különböző kompartmentjei is, eltérő mennyiségben tartalmazzák a CaM mRNS-eket. Ezek feltehetően különböző mértékben járulnak hozzá a sejtekben és azok kompartmentjeiben aktuálisan jelenlevő CaM fehérje tartalomhoz. A differenciált bazális expresszión túl a különböző agyterületeken, illetve a különböző idegsejtekben és azok kompartmentjeiben, a különböző stimulusok egyedi, egymástól lényegében független hatást gyakorolhatnak a három CaM gén expressziójára. Ez a CaM mRNS mintázat térben és időben koordinált változásait eredményezheti, amely biztosítja a megváltozott igényeknek megfelelő mennyiségű és lokalizációjú CaM fehérje szintézisét.

Summary of PhD Thesis

A Comparative Study of the Calmodulin Gene Expression under Physiological and Experimental Conditions in the Rat Brain

From bacteria to the most sophisticated eukaryotic cells calcium ion (Ca^{2+}) plays a common role as second messenger in signal transduction. Intracellular effects of Ca^{2+} are mediated by a group of proteins, called the Ca^{2+}-binding proteins (CBPs), that are adapted to the specific and reversible binding of Ca^{2+}. These proteins are divided into two groups: the buffer and the trigger types. Calmodulin (CaM), composed of 148 amino acids, belongs to the trigger type CBPs. It is present in all eukaryotic cells and acts as a multifunctional intracellular Ca^{2+}-receptor. CaM is especially concentrated in the mammalian nervous tissue, where it is most abundant in the nerve cells. The transduction of the Ca^{2+}-signal through CaM is realized by the activation of at least twenty different enzymes; among them type II CaM kinase and calcineurin are the most important in neurons.

In vertebrates, CaM is encoded by a gene family, the amino acid sequences of their products are identical within species and even among higher vertebrates. Three bona fide CaM genes (CaM I, CaM II and CaM III) are known in the rat, which transcribe seven mRNA species by alternative polyadenylation. The CaM genes are highly expressed in the mammalian nervous system. Differential basal expression and differential regulation under several in vivo and in vitro experimental conditions of the three CaM genes have already been described. Dendritic localization of CaM I mRNAs in the developing rat brain and CaM I and CaM II mRNAs in the rat pheochromocytoma cell line (PC12) have also been demonstrated.

A possible choice for tracing radioactivity in tissue sections is film autoradiography. One of the characteristics of the relationship between the exposed radioactivity and the grayness of the film is that it is not linear. Because of the lack of an explicit theory describing this relation, it is approximated by functions based on empirical observations, which renders the quantitative analysis of film autoradiograms difficult.

Male Sprague-Dawley rats (200-250 g) were used in these experiments. The animals were decapitated and the brains were quickly removed. Cryostat sections were cut for in situ hybridization, or brains were frozen for RNA isolation. The M26-1F immortalized cell line, prepared form embryonic rat striatum, was used in in vitro experiments.

Parts of the 3'-untranslated regions of the CaM mRNAs were cloned and used for in vitro RNA synthesis to prepare [^{35}S]cRNA probes. Coronal cryostat sections of rat brain and cells cultured on glass coverslips were in situ hybridized, then representative specimens were counterstained. Total RNA was isolated from brain tissue by the guanidine-isothiocyanate method, separated by denaturing gel electrophoresis, blotted onto nylon membrane and finally hybridized.

Radiolabeled specimens were exposed to autoradiographic film. Different radioactive standard scales were used for quantification. Autoradiograms were analyzed by computer-assisted microdensitometry. At least five animals composed each experimental group. Results were expressed as mRNA copy numbers corresponding to 1 mm^3 tissue volume. Representative specimens were dipped into nuclear emulsion sensitive to β-radiation.

The following results were established in these experiments:

1. In order to describe the quantitative autoradiography, setting out from theoretic considerations, the following nonlinear regression was introduced:

$$\mathrm{ROD} = p_1(1 - \exp[-p_2 x])$$

where p_1 and p_2 are parameters, ROD is the relative optical density and x is the radioactiviy.

2. Sensitometric curves corresponding to different standard series with different quenching properties (b and m) can be interconverted through the use of the transformation quotient γ:

$$\gamma = {p_2}^b / {p_2}^m$$

from this, the transformed equation of series m to series b is:

$$\mathrm{ROD} = {p_1}^m(1 - \exp[-\gamma {p_2}^m x])$$

The most important practical application of this conversion is the transformation of different standard series to tissue-equivalent radioactivity.

3. A new dot blot-based [^{35}S]-membrane standard series was developed. The radioactivity range of the series can be exactly determined and reproduced. Moreover, it can be adapted easily to the requirements of different experiments utilizing [^{3}H]-, [^{32}P]-, [^{33}P]- or [^{35}S]-labeled RNA, oligo and DNA probes.
4. The results of our in situ hybridization studies described quantitatively the basal expression of the CaM genes in more than 70 brain areas of the adult rat. Significant differences in the CaM gene expression corresponding to different brain areas and the differential expression of the three CaM genes in several brain areas were revealed.
5. A differential pattern of the gene expression was determined when the cell type-specific distribution of the CaM mRNAs was analyzed.
6. According to our in vivo intracellular localization experiments, the CaM mRNAs are dendritically targeted in several areas of the adult rat brain. The dendritic targeting is differential, the levels of dendritic mRNAs are decreased in the order of CaM I, CaM III and CaM II in all brain regions investigated.
7. CaM gene expression characteristic in its intensity to neurons was detected in the immortalized M26-1F cells. In case of the CaM I and CaM II mRNAs the hybridization signal was detected in both the soma and the processes of the cells.
8. After 10 days of water deprivation CaM mRNA levels increased significantly and differentially in the supraoptic nucleus: 138% (CaM I), 126% (CaM II) and 169% (CaM III). Normal or slightly decreased CaM mRNA levels were measured in the hypothalamic paraventricular

nucleus and the extrahypothalamic areas. Although the supraoptic and the hypothalamic paraventricular nuclei belong to the same functional system, the differential regulation of their CaM gene expression might indicate their differential role.

Previous results together with our data indicate that under physiological conditions different brain areas, neuron types and even compartments of nerve cells contain different quantities of CaM mRNA populations. These may contribute differentially to the actual CaM protein level of the cells and their compartments. Beyond the differential basal expression, in different brain areas, nerve cells and their compartments, different stimuli might regulate the expression of the three CaM genes in a unique and independent manner. This could result in the spatially and temporally coordinated changes of the distribution pattern of the CaM mRNAs, which, in turn, could assure the appropriate amount and localization of the CaM protein upon local demands.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm feleségemnek, hogy bízott bennem és munkám sikerében, köszönöm megértését és támogatását. Köszönöm szüleimnek, hogy hosszú éveken keresztül oly sok szeretettel és odaadással támogatták tanulmányaimat.

Köszönöm Dr. Kása Péter professzornak, a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Alzheimer kór Kutatócsoport vezetőjének, hogy Intézetében diákkörösként dolgozhattam és figyelmemet a neurobiológia felé irányította.

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Gulya Károly professzornak, a József Attila Tudományegyetem (JATE) Állattani és Sejtbiológiai Tanszéke vezetőjének, témavezetőmnek, hogy tanszékén lehetővé tette szakdolgozatom elkészítését, majd ezt követően a Molekuláris neurobiológia PhD alprogram keretében lehetőséget biztosított tanulmányaim posztgraduális folytatásához. Köszönöm, hogy kutatásaimat laboratóriumában lehetővé tette, megteremtve annak mind személyi, mind anyagi feltételeit, munkámat szakmailag nagy hozzáértéssel irányította és kritikai észrevételeivel segítette.

Köszönöm a dolgozathoz felhasznált közlemények társszerzőinek hozzáértő munkáját. Köszönöm Dr. Hatvani Lászlónak, a JATE Bolyai Intézete tanszékvezető professzorának, akadémikusnak, a módszertani közleményben, és Vízi Sándor egyetemi tanársegédnek, munkatársamnak, az összehasonlító vizsgálatot tartalmazó közleményben nyújtott nélkülözhetetlen közreműködését. Köszönöm Várszegi Szilviának és Tarcsa Mónikának a sejttenyészetek készítését és fenttartását.

Köszönöm a JATE Állattani és Sejtbiológiai Tanszéke munkatársainak, kollégáimnak, Bakota Lidia és Körtvély Előd egyetemi tanársegédeknek a mindennapi munkában nyújtott pótolhatatlan segítségét. Külön köszönet illeti Ambrus Józsefné szakasszisztenst, akinek odaadó munkája nélkül egyetlen kísérlet sem jöhetett volna létre. Köszönetet mondok Győrfiné Kosztka Mária laborasszisztensnek, Kiss Györgyné, Hovanyecz Andrea és Dudás Szilvia tanszéki adminisztrátoroknak munkámhoz nyújtott segítségükért.