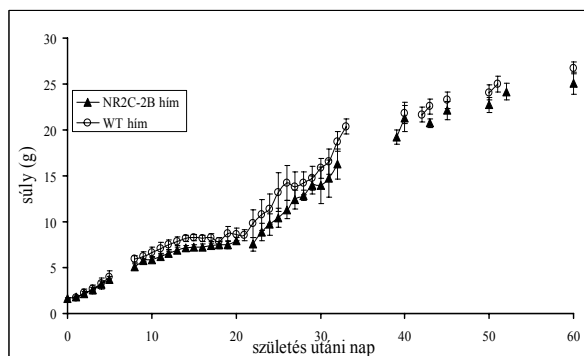


*Szakmai beszámoló az F037769 számú*  
**"Az NMDA receptor alegységek szerepe kisagyi szemcsejtek fejlődésében: vizsgálatok egy transzgenikus egértörzsben" c.**  
 OTKA pályázat keretében 2001-2005. között elvégzett kísérletekről és azok eredményeiről

## I. In vivo vizsgálatok

### I.1. Az NR2C-2B transzgenikus és vad típusú egerek születést követő súlygyarapodásának meghatározása



**1. ábra.** Az NR2C-2B és a vad típusú (WT) egerek súlygyarapodása a posztnatális fejlődés során.

Az NR2C-2B (6 alom), valamint a kontroll, vad típusú (WT; 5 alom) egerek posztnatális súlygyarapodását a születést követő első hónap során naponta, majd az állatok 2 és 3 hónapos kora között hetente meghatároztuk (**1. ábra**). Az első posztnatális héten az állatok testsúlyában semmilyen különbséget nem találtunk. A 2-3. hét során a transzgen állatok testtömege némileg, de nem szignifikánsan kisebb volt, mint a vad típusú állatoké<sup>1</sup>, de ez a retardáció a felnőtt transzgen állatokban már nem volt kimutatható. A 3 hetes kort

követően - az irodalmi adatoknak megfelelően - a hímek testsúlya mind a transzgen, mind a vad típusú állatok esetében meghaladta a nőstényekét, de a transzgen, illetve nem transzgen, azonos nemű állatok testsúlyában nem volt szignifikáns különbség. A testsúlygyarapodás vizsgálata mellett hisztológiai és viselkedési vizsgálataink (ld. később) is alátámasztották, hogy **az NR2C-2B alegységcsere a mutáns egerekben nem vezet súlyosabb fejlődési rendellenességekhez.**

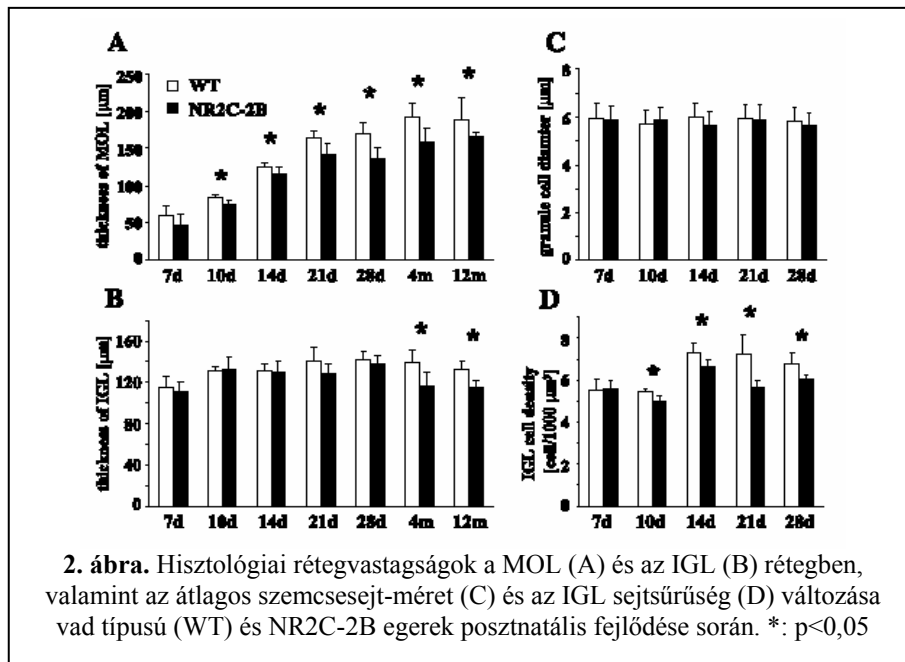
### I.2. Az NR2C-2B alegységcsere kisagyfejlődésre gyakorolt hatásának hisztológiai vizsgálata

#### I.2.a. A kisagykéreg fejlődésének vizsgálata NR2C-2B és NR2C-/- állatok Nissl-festett metszeteiben

Különböző életkorú (7, 10, 14, 21 napos, valamint 1, 4 és 12 hónapos) vad típusú és transzgen állatok kisagyából 30  $\mu$ m-es, Nissl-festett metszeteket készítettünk, majd a Lucia képelemző program segítségével meghatároztuk az egyes kisagykérgi rétegek – külső szemcsejtréteg (EGL), molekuláris réteg (MOL), valamint belső szemcsejtréteg (IGL) – átlagos vastagságát (**2. ábra**). Az eredmények statisztikai kiértékelése megmutatta, hogy a transzgen állatokban az EGL vastagsága kis mértékben, de nem szignifikánsan megnőtt, míg a MOL vastagsága a 10. posztnatális naptól kezdve jellegzetesen lecsökkent. Az IGL vastagságában csak a felnőtt állatokban találtunk különbséget: a transzgen állatokban a rétegvastagság szignifikánsan kisebbnek bizonyult. A NeuroLucida program felhasználásával a kisagyi szemcsejtek átlagos sejttest-méretének, valamint sejtsűrűségének meghatározására is mód nyílt: a szemcsejtek mérete a vad típusú és a transzgen állatokban életkortól függetlenül hasonlóan adódott, de a transzgen állatokban az első 1 hónapos életkor alatt szignifikánsan

<sup>1</sup> Az állatok súlygyarapodását az elválasztásig az alom mérete is befolyásolja. A napi vizsgálatokba bevont vad típusú és NR2C-2B egerek esetében a transzgen almok egyedszáma nagyobb volt, ami az átmenetileg megfigyelhető, kisebb mértékű átlagos súlygyarapodást jól magyarázza.

csökkent sejtsűrűséget kaptunk (2. ábra). Eredményeink bizonyítják, hogy az alegységcsere már a posztnatális fejlődés korai szakaszától kezdve a kisagyi szemcsesejtek számának, valamint a molekuláris réteg vastagságának csökkenéséhez vezet.



Az alegységcsere miatt az NR2C-2B egerekben kettős fenotípus nyilvánul meg - egyrészt az NR2C alegység-fehérje hiányzik, másrészt az NR2B alegység túltermelődik. Ezért annak eldöntésére, hogy a megfigyelt anatómiai változások az NR2C alegység hiányának vagy az NR2B alegység sejt-specifikus túltermelésének köszönhetőek-e, az NR2C alegységre hiányos (k.o.; NR2C<sup>-/-</sup>) egértörzs korai posztnatális kisagyi fejlődésének vizsgálatát is elvégeztük. Erre az adott lehetőséget, hogy heidelbergi laboratóriumokkal végzett együttműködés keretében NR2C k.o. állatokat is kaptunk tenyésztésre.

Az NR2C<sup>-/-</sup> egértörzsről korábban publikált irodalmi adatok csak arról számoltak be, hogy a felnőtt egerek kisagykérgében nagymértékű anatómiai elváltozások nem mutathatóak ki, de a kisagykérgi rétegek kialakulását a korai posztnatális fejlődés során nem vizsgálták. Éppen ezért a kisagykéreg hisztológiai rétegvastagság-mérését 8 és 16 napos korban perfundált NR2C<sup>-/-</sup> és vad típusú egerekben is elvégeztük, és a kapott adatokat az NR2C-2B egértörzsben megfigyelttel összehasonlítottuk (1. táblázat). Az NR2C-hiányos állatok kisagyi rétegeinek fejlődése a vad típusú egerekben megfigyelttel megegyező volt. A rétegvastagság mérések már bizonyítékul szolgáltak arra, hogy az NR2C-2B egerekben megfigyelt korai kisagyi változások elsősorban az NR2B alegység túltermelésének és nem az NR2C alegység hiányának köszönhetőek.

Table 1

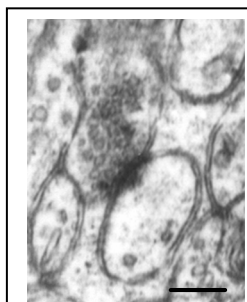
Thickness of cerebellar layers and TAG-1-positive zones in 8- and 16-day-old (P8 and P16, respectively) NR2C-2B and NR2C knock-out animals, measured in midsagittal sections of the vermal region, in the same location of three cerebellar lobules (lobules 3, 4/5, and 9)

Mouse line	P8				P16		
	EGL	TAG-1 positivity	MOL	IGL	MOL	IGL	
NR2C-2B	wt	46.3 ± 4.2	28.4 ± 2.9	96.8 ± 8.6	113.4 ± 8.4	194.7 ± 20.7	119.6 ± 12.5
	mutant	42.7 ± 4.9	28.7 ± 4.8	93.3 ± 6.5	114.3 ± 6.5	158.7 ± 16.7***	113.9 ± 8.6
NR2C k.o.	wt	43.8 ± 4.5	33.5 ± 5.8	101.9 ± 9.1	137.2 ± 9.7	194.1 ± 34.4	146.2 ± 16.03
	k.o.	40.4 ± 3.7	34.6 ± 4.1	106.4 ± 7.2	133.7 ± 5.8	175.6 ± 18.8	159.2 ± 9.75

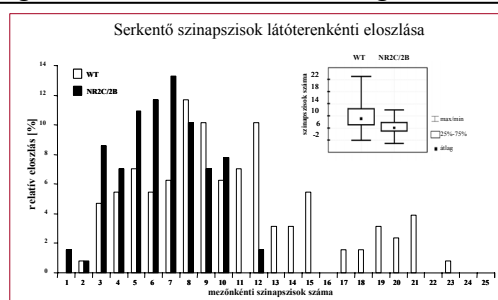
1. táblázat. Az EGL, MOL és IGL, valamint a TAG-1 pozitív premigrátoros zóna vastagságának hisztológiai megállapítása az NR2C-2B, valamint az NR2C<sup>-/-</sup> egértörzs 8 (P8) és 16 (P16) napos egyedeiben.

### I.2.b. Felnőtt NR2C-2B egerek kisagykérgének elektronmikroszkópos vizsgálata

A szemcsesejtek számának csökkenése a kisagykéreg idegsejtjeinek kapcsolatrendszerét is megváltoztathatja. Ennek bizonyítására 3 vad típusú és 3 NR2C-2B állat kisagyának IX-X. lebenyéből készített mediansagittalis metszetekből a piális felszíntől kiindulva elektronmikroszkópos sorozatfelvételeket készítettünk. A vad típusú és transzgén állatokból készített elektronmikroszkópos felvételek hasonló képet mutattak, szembetűnő ultrastrukturális elváltozásokat nem találtunk (**3. ábra**). A területegységre vonatkoztatott szinapszis-szám<sup>2</sup> eloszlásfüggvénye azonban megmutatta, hogy a transzgén állatokban a Purkinje dendrittűskékre adott serkentő szinapszisok száma szignifikánsan redukálódott (**4. ábra**). Mindez arra utal, hogy **az NR2C-2B állatok Purkinje sejtjein szignifikánsan kevesebb a serkentő szinapszisok száma** – ezt valószínűleg a szemcsesejtek pusztulásával lecsökkenő paralell rostok számának csökkenése magyarázza, és összhangban áll azzal a hisztológiai megfigyelésünkkel, hogy a MOL vastagsága a felnőtt állatokban is szignifikánsan lecsökken.



**3. ábra.** Parallell rost-Purkinje sejt dendrittüske szinapszis. mércse: 0.2  $\mu$ m



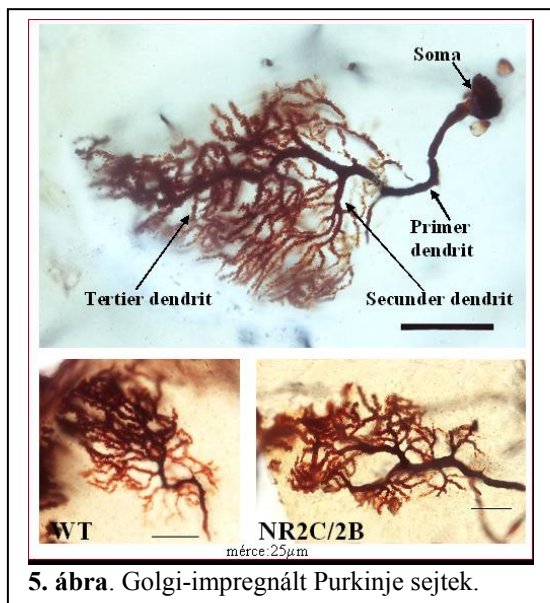
**4. ábra.** A serkentő szinapszisok látóterenkénti megoszlása vad típusú (WT, fehér oszlop) és NR2C-2B (fekete oszlop) állatokban. Az alegységcsere az átlagos szinapszis-szám csökkenéséhez vezetett.

### I.2.c. Felnőtt NR2C-2B egerek Purkinje-sejt morfológiájának vizsgálata Stensaas-féle Golgi impregnációval

In vivo a teljes Purkinje-arborizáció vizsgálata immunhisztokémiai módszerekkel nehezen kivitelezhető. A Stensaas-féle Golgi impregnáció azonban egy-egy sejt teljes nyúlványrendszerének kirajzolására is alkalmas lehet. Azért, hogy az alegységcsere Purkinje sejtek morfológiájára gyakorolt hatását vizsgálni tudjuk, eredeti célkitűzéseinken túl ezt a módszert is alkalmaztuk.

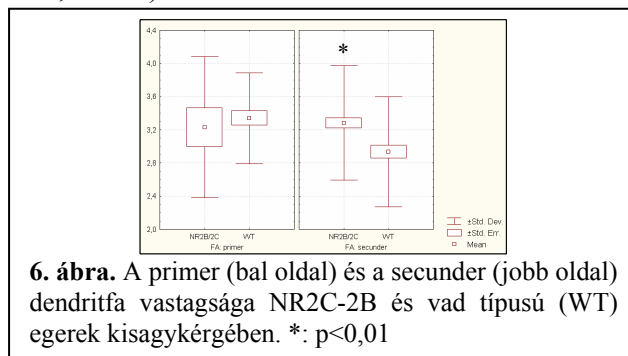
4 vad típusú és 5 NR2C-2B felnőtt állat kisagyát impregnáltuk, majd a IX-X. lebeny mediansagittalis metszeteiből készített felvételeken az egyedileg jelölt Purkinje sejtek morfológiáját (**5. ábra**) NeuroLucida program segítségével értékeltük. A primer és secunder dendritok vastagságát meghatározva a primer dendritfák vastagságában nem találtunk különbséget. A vad típusú Purkinje sejtek secunder ágai az elvárásnak megfelelően szignifikánsan vékonyabbak voltak, mint a primer dendritágak. A transzgén Purkinje sejtek secunder ágvastagságai azonban a primer dendritágakéval megegyeztek és a vad típushoz viszonyítva szignifikánsan vastagabbnak bizonyultak (**6. ábra**). Mindezen eredmények igazolják, hogy **az NR2B alegység felnőttkori termelődése a kisgyi szemcsesejtekben a kisgyi Purkinje sejtek morfológiájának hosszú távú megváltozásához vezet.**

<sup>2</sup> A felvételek elemzésekor csak azokat a serkentő szinapszisokat vettük figyelembe, amelyek a Purkinje sejtek dendrittűskéin végződtek (ld. **3. ábra**).



5. ábra. Golgi-impregnált Purkinje sejtek.

A transzgén állatok Purkinje sejteinek dendritikus arborizációjának fejletlenségét kollaborációban elvégzett in vitro vizsgálatok is alátámasztották. F. Metzger és munkatársai túlélő kisagy-szelet tenyészetekben elvégzett részletes Purkinje-morfológiai elemzések elvégzésével hasonló következtetésekre jutottak (Metzger és mtsai., 2005<sup>3</sup>).

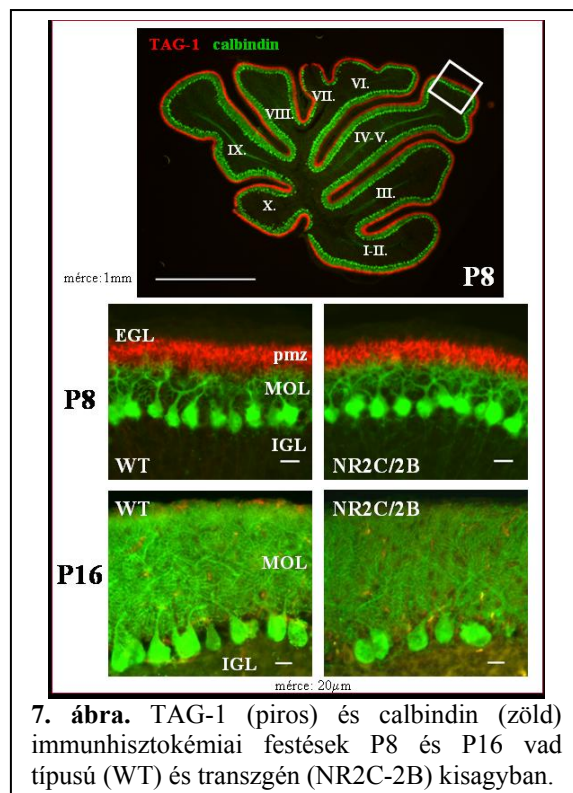


6. ábra. A primer (bal oldal) és a secunder (jobb oldal) dendritfa vastagsága NR2C-2B és vad típusú (WT) egerek kisagykérgében. \*:  $p < 0,01$

### I.2.d. Az alegységcsere hatása transzgenikus kisagyi szemcsesejtek in vivo migrációs képességének megváltozására - immunhisztokémiai vizsgálatok

Az OTKA pályázat eredeti célkitűzései között nem szerepelt a szemcsesejt-vándorlás in vivo elemzése. Németországi együttműködő partnereink azonban túlélő kisagyszeletekben bizonyítani tudták, hogy a migráló szemcsesejtek egyik jellemző markerét, a TAG-1 molekulát kifejező sejtek száma a transzgén állatokban jelentősen feldúsul, emellett az ún. premigrátoros zónában (pmz, ld. 7. ábra) a fiatal, posztmitotikus szemcsesejtek száma is megnő (Metzger és mtsai., 2005<sup>3</sup>). Mindez arra utal, hogy az OTKA pályázat kiindulási hipotézisével összhangban az alegységcsere a szemcsesejtek migrációs tulajdonságait in vivo is befolyásolhatja. Ezért hisztokémiai, kettős immunfestések sorozatával vizsgáltuk, hogy a túlélő kisagyszelet-tenyészetekben in vitro megfigyelt változások in vivo is kimutathatóak-e.

8 és 16 napos (P8 és P16) állatokban a posztmitotikus szemcsesejteket NeuN, a vándorló szemcsesejteket TAG1, a molekuláris réteg vastagságát jelző Purkinje sejtek dendritfáját pedig calbindin immunoreaktivitásuk alapján azonosítottuk (7. ábra). Mivel az immunreaktivitás erőssége a kimutatandó fehérje mennyiségével nem arányos, a szemcsesejtek in vivo migrációját a TAG1 immunoreaktív rétegek vastagságának összehasonlításával kívántuk követni – a premigrátoros zónát kirajzoló, TAG-1 immunpozitív kisagyi rétegvastagságok kvantitatív elemzése a transzgén és vad típusú állatok között azonban nem mutatott

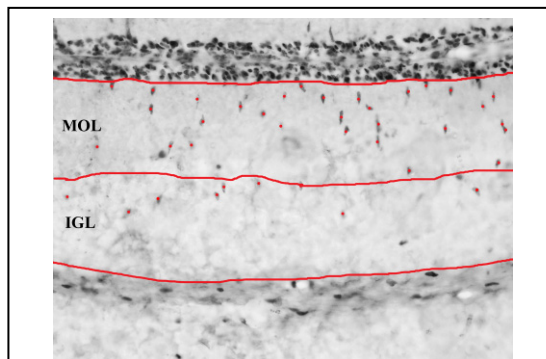


7. ábra. TAG-1 (piros) és calbindin (zöld) immunhisztokémiai festések P8 és P16 vad típusú (WT) és transzgén (NR2C-2B) kisagyban.

<sup>3</sup> Metzger F., Pieri I., Eisel U. (2005) Lack of NMDA receptor subunit exchange alters Purkinje cell dendritic morphology in cerebellar slice cultures. Dev. Brain Res. 155:165–168.

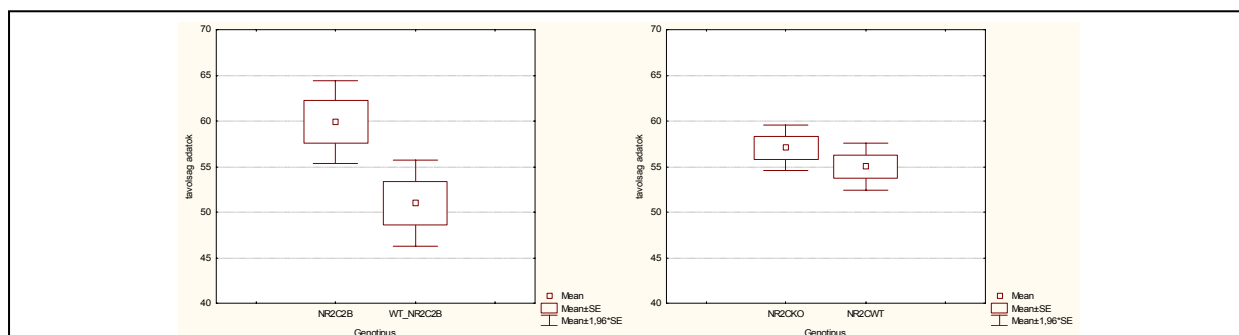
**szignifikáns különbséget** (ld. **1. táblázat**). A 10 napnál idősebb transzgén állatok calbindin-immunoreaktív molekuláris rétegének vastagsága ugyanakkor – egybehangzóan a korábbi, hisztológiai eredményekkel – vékonyabbnak bizonyult.. Mindez azt jelzi, hogy **az alegységcsere sejt-vándorlásra gyakorolt in vivo hatásának kimutatásához a TAG1 immunreaktív sejtek kimutatása, az immunreaktív rétegvastagság meghatározása nem elég érzékeny módszer.**

A szemcses sejtek in vivo vándorlási kapacitásának nyomon követésére ezért másik hisztológiai megközelítést is alkalmaztunk. 10 napos, heterozigóta párosításokból származó, testvér transzgén és vad típusú egereket<sup>4</sup> a tarkó bőre alá beadott 50 µg/testsúly g dózisú bróm-dezoxi uridinnel (BrdU) kezeltünk, majd 36 óra túlélést követően pefundáltunk. A kisagyak 30 µm-es sagittalis metszetein a-BrdU immunhisztokémiai festést végeztünk, majd az azonos lebenyek azonos pontjáról készített mikroszkópos felvételeken a jelölt szemcses sejtek által átlagosan megtett utat meghatároztuk (**8. ábra**). A vizsgálatokat mind az NR2C-2B, mind az NR2C<sup>-/-</sup> egértörzsben elvégeztük (**9. ábra**), az átlagosan megtett utat mindig az egyes almokon belül hasonlítottuk össze. Korábbi



**8. ábra.** 10 napos korban BrdU-val kezelt állat IV-V. kisagylebenyében 36 órával a jelölést követően azonosítható, a-BrdU pozitív szemcses sejtek. A vonalak a réteghatárokat, a pöttyök a premigrátoros zónából már kilépett, jelölt szemcses sejteket jelzik.

eredményeinkkel összhangban **migrációs különbségeket csak az NR2C-2B állatokban tapasztaltunk: az azonos alomból származó NR2C-2B egerekben a kisagyi szemcses sejtek szignifikánsan nagyobb utat tettek meg, mint a vad típusú testvérek szemcses sejtjei** ( $112 \pm 9$  % átlagos megtett út a kontroll állatok átlagának százalékában). Az NR2C<sup>-/-</sup> egerekben ezzel szemben az átlagosan megtett úthosszok között nem volt különbség ( $99,9 \pm 15$  %).



**9. ábra.** Az NR2C-2B (bal oldali ábra) és az NR2C<sup>-/-</sup> (jobb oldali ábra) almok transzgén és vad típusú testvér-állataiban BrdU-val 10 napos korban megjelölt szemcses sejtek átlagos eltávolodása a premigrátoros zónától a IV-V. lebenyben (µm).

<sup>4</sup> Ahhoz, hogy a transzgén és a vad típusú egerek kisagykérgében zajló szemcses sejt-vándorlás mértékét megbízhatóan össze tudjuk vetni, azonos alomból származó állatokat kellett vizsgálnunk. Korábbi vizsgálataink ugyanis megmutatták, hogy a szemcses sejtek in vivo vándorlási ütemét és fejlődését az állatok születése közötti akár fél napos eltérés, valamint az alom egyedszáma is jelentősen befolyásolja. Ezért mind az NR2C-2B, mind az NR2C<sup>-/-</sup> egerek esetében heterozigóta szülőpárokat párosítottunk, majd az almokból a születést követő 3-4. napon farok PCR-rel meghatároztuk a homozigóta vad és transzgén testvéreket. Ezeket a testvéreket kezeltük azonos időben BrdU-val, majd a perfúziót és a BrdU immunhisztokémiai feldolgozást követően a IV-V., a VI. és a VIII. lebeny azonos pontjairól készített mikroszkópos felvételeken meghatároztuk a BrdU-val jelölt szemcses sejtek pozícióját. A sejtek által in vivo megtett távolságot mindig az egyes almokon belül hasonlítottuk össze.

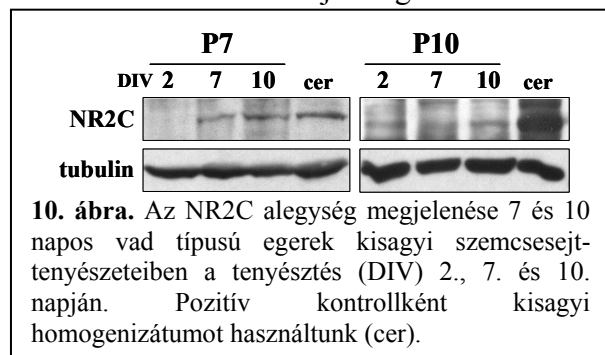


Hisztológiai vizsgálatainkat összegezve elmondhatjuk, hogy az NR2B alegység hosszú távú túltermeltetése a kisagyi szemcsesejtekben rendellenes kisagy-fejlődéshez vezet: a kisagyi szemcsesejtek száma lecsökken, a Purkinje sejtek dendritikus arborizációja kevésbé fejlett, valamint vékonyabbá válik a Purkinje sejtek dendritfája alkotta molekuláris réteg (MOL) is. A pályázat eredeti célkitűzésein felül, in vivo körülmények között is igazoltuk, hogy az NR2B alegység túltermeltetése a kisagyi szemcsesejtek által 36 óra alatt megtett úthosszt megnöveli, azaz valószínűleg fokozza migrációs aktivitásukat. NR2C<sup>-/-</sup> állatok felhasználásával többszörösen bizonyítottuk, hogy a megfigyelt változások nem az NR2C alegység hiányának, hanem az NR2B alegység túltermeltetésének a következményei.

## II. Kisagyi szemcsesejt-tenyészetek in vitro vizsgálata

### II.1. Az in vitro sejtmozgás-elemzésekhez ideális szemcsesejt-tenyésztési feltételek meghatározása

Annak érdekében, hogy az alegységcsere hatása az in vitro tenyésztési körülmények mellett is minél korábban kimutatható legyen, nem csak az általánosan használt posztnatális 6-8 napos, hanem 10 napos állatok kisagyából is megpróbálkoztunk a szemcsesejtek izolálásával. Az in vitro vizsgálatokhoz ugyanis csak olyan tenyésztési feltételek a megfelelőek, amelyek mellett a vad típusú szemcsesejtekben az NR2C mRNS termelődése megindul<sup>5</sup> – ekkor ugyanis a transzgen szemcsesejtekben a bevitt ("ektópiás") NR2B gén is át fog íródni. Ebben a minél későbbi izolálási kor előnyt jelenthet. Ahhoz pedig, hogy a tenyészetekben fejlődő idegsejtek nyúlvány- és sejttestmozgásait követni tudjuk, a kiültetést követő 1-3. nap közötti videomikroszkópos vizsgálatokra van szükség, mert ezt követően az idegsejt-hálózatok "stabilizálódnak" és a sejtmozgások intenzitása nagyon lecsökken.



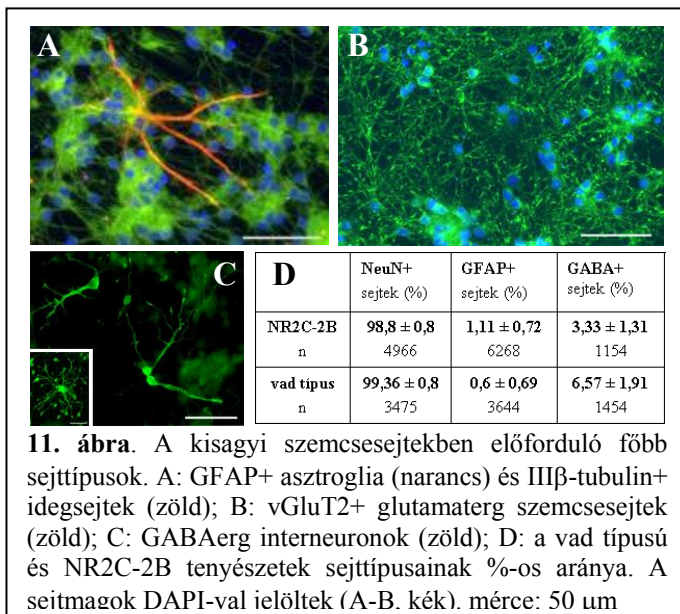
Western blot fehérje-kimutatással sikerült bizonyítanunk, hogy a **10 napos állatokból izolált vad típusú tenyészetekben az NR2C alegység a tenyésztés 1. napjától már fehérje szinten is kimutatható**, míg az általánosan használt 7 napos életkorban izolált tenyészetekben az NR2C alegység csak az első hét végére jelenik meg (**10. ábra**). Bár az öregebb állatokból készített tenyészetekben az izolálást követően valamivel nagyobb volt a sejtpusztulás, sikerült olyan tenyésztési feltételeket kialakítanunk, amelyek mellett mind a 4, a 7 és a 10 napos állatokból készített tenyészetekben a **túlélő sejtek 90-95 %-a szemcsesejtnek bizonyult** (**2. táblázat**). A tenyésztési körülmények változtatása során a legoptimálisabbnak a poli-L-lizinnel, majd 1 µg/cm<sup>2</sup> lamininnal bevont tenyésztési felszín bizonyult. A tenyészetek fejlődését mind a főtális borjú szérumot (MEM-FCS), mind a definiált összetételű NeuroBasal-B27 tápfolyadékban is optimalizáltuk.

sejtpusztulás, sikerült olyan tenyésztési feltételeket kialakítanunk, amelyek mellett mind a 4, a 7 és a 10 napos állatokból készített tenyészetekben a **túlélő sejtek 90-95 %-a szemcsesejtnek**

	NeuN+ Cells (%)	GFAP+ Cells (%)	Total Number of Cells
P4	95.16 ± 1.68	5.68 ± 1.97	4111
P7	96.62 ± 1.65	3.94 ± 1.40	3677
P10	99.36 ± 0.80	0.60 ± 0.69	3644

**2. táblázat.** NeuN és GFAP pozitív sejtek megoszlása 4, 7 és 10 napos (P4, P7, P10) állatokból készített szemcsesejt-tenyészetekben a tenyésztés 4. napján.

<sup>5</sup> Az NR2C-t is tartalmazó NMDA receptorok elektrofiziológiai módszerekkel in vivo elsősorban az IGL-be már bevándorolt, érett szemcsesejtekben mutathatóak ki, bár van adat arra is, hogy az NR2C mRNS termelődése már a premigrátoros zónában is beindul.



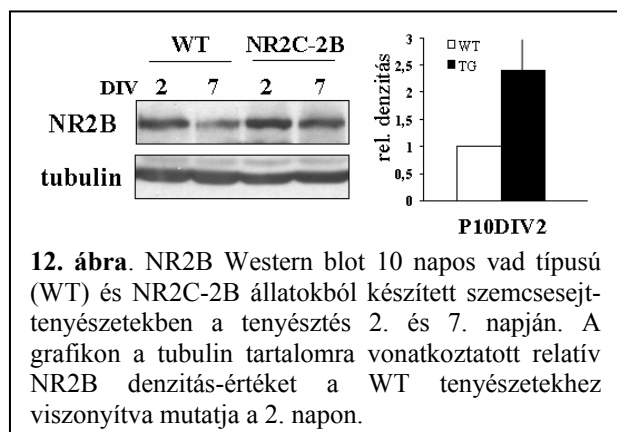
**11. ábra.** A kisagyi szemcsesejtekben előforduló főbb sejtípusok. A: GFAP+ asztroglia (narancs) és III $\beta$ -tubulin+ idegsejtek (zöld); B: vGluT2+ glutamaterg szemcsesejtek (zöld); C: GABAerg interneuronok (zöld); D: a vad típusú és NR2C-2B tenyészetek sejtípusainak %-os aránya. A seitzmagok DAPI-val ielöltek (A-B. kék). mérce: 50  $\mu$ m

A 10 napos korú vad típusú és NR2C-2B állatokból izolált szemcsesejt-tenyészetek összehasonlítását a GABA, neuron-specifikus tubulin, NeuN, illetve vezikuláris glutamát transzporter2 (vGluT2) pozitív sejtek arányának meghatározásával vizsgáltuk. Eredményeink bizonyítják, hogy **az alegységcsere a tenyészetek** - a fenti immuncitokémiai markerekkel meghatározott - **sejtípus-összetételét nem befolyásolja (11. ábra).**

## II.2. A vad típusú és az NR2C-2B szemcsesejt-tenyészetek összehasonlítása

### II.2.a. Az NR2B alegység kifejeződésének vizsgálata

Az NR2B alegység kifejeződését mind Western blottal, mind a-NR2B immuncitokémiai festésekkel is vizsgáltuk. Eredményeink szerint a vizsgált in vitro életkorokban **az NR2B alegység a vad típusú tenyészetekben is kifejeződik<sup>6</sup>, de a kiültetést követően relatív mennyisége alacsonyabb**, és mennyisége a tenyésztés előre haladtával jobban csökken, mint a transzgén tenyészetekben (12. ábra). Ezzel összhangban az NR2B alegység jelenlétét a tenyészeteken elvégzett immuncitokémiai festésekkel is tudtuk detektálni (nincs bemutatva). Az NR2B alegység jelenléte a vad típusú tenyészetekben ugyanakkor sajnálatos módon megnehezíti az



**12. ábra.** NR2B Western blot 10 napos vad típusú (WT) és NR2C-2B állatokból készített szemcsesejt-tenyészetekben a tenyésztés 2. és 7. napján. A grafikon a tubulin tartalomra vonatkoztatott relatív NR2B denzitás-értéket a WT tenyészetekhez viszonyítva mutatja a 2. napon.

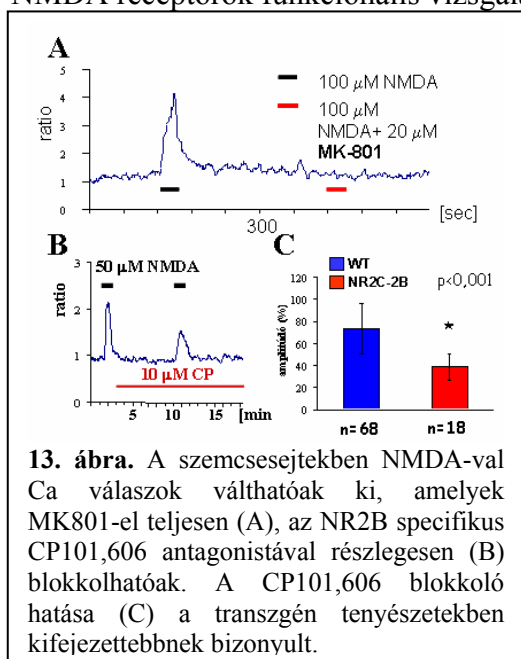
NR2C-2B és a vad típusú tenyészetek között kialakuló funkcionális különbségek kimutatását.

### II.2.b. A vad típusú és NR2C-2B NMDA receptorok funkcionális vizsgálata Ca-image és excitotoxicitási tesztek segítségével

Az egyes alegység-fehérjék immuncitokémiai vagy kvantitatív kimutatása a működő ionszatórnák funkcionális tulajdonságait még nem jelzi közvetlenül. Ezért a vad típusú és transzgén állatokból készített tenyészetekben az NMDA receptorok fiziológiás aktivitását neurofiziológiai módszerekkel bizonyítottuk. Vizsgáltuk azt is, hogy az alegységcsere hatására az NMDA receptorok működésében funkcionális különbségek megfigyelhetőek-e.

<sup>6</sup> Az NR2B kimutatása a vad típusú tenyészetekben nem meglepő, hiszen az NR2B alegység csak az in vivo életkor 3. hetében tűnik el a kisagyból.

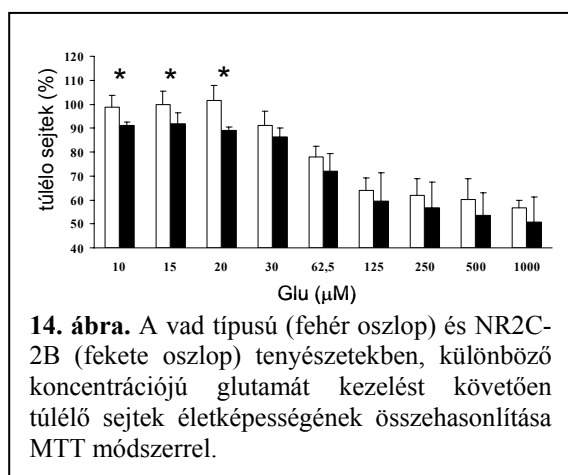
Az eredeti terveken felül lehetőségünk nyílt arra, hogy a tenyészetekben detektálható NMDA receptorok funkcionális vizsgálatát Ca-image technika segítségével végezzük el<sup>7</sup>.



**13. ábra.** A szemcsesejtekben NMDA-val Ca válaszok válthatók ki, amelyek MK801-el teljesen (A), az NR2B specifikus CP101,606 antagonistával részlegesen (B) blokkolhatóak. A CP101,606 blokkoló hatása (C) a transzgén tenyészetekben kifejezettebbnek bizonyult.

Méréseink megmutatták, hogy az NMDA receptorokon a glutamát, illetve NMDA kezelés **intracelluláris Ca válaszokat vált ki, amelyek az MK801 non-kompetitív antagonistával teljesen, míg az NR2B alegység-szelektív CP101,606-al (CP<sup>8</sup>) részlegesen kivédhetőek** (13. ábra). Mindezek az NMDA receptorok funkcionális működését bizonyítják a tenyészetekben. **A CP hatása az NR2C-2B sejteken kifejezettebbnek bizonyult.**

Az NR2C-2B és vad típusú (WT) tenyészetek NMDA receptorai közötti funkcionális különbséget a sejtek glutamát-kezelés iránti érzékenysége, azaz a glutamát-kezelés hatására bekövetkező sejtpusztulás mértéke is jelezheti. Ezt a feltételezést a kisagyi szemcsesejt-tenyészetek tápközegébe juttatott glutamát-kezelés hatására bekövetkező sejtpusztulás mérésével vizsgáltuk.



**14. ábra.** A vad típusú (fehér oszlop) és NR2C-2B (fekete oszlop) tenyészetekben, különböző koncentrációjú glutamát kezelést követően túlélő sejtek életképességének összehasonlítása MTT módszerrel.

Eredményeink alapján **az NR2C-2B tenyészetek a fiziológiás mértékű, kis koncentrációjú (10-20 μM Glu) glutamát-kezelésre nézve kis mértékben ugyan, de szignifikánsan érzékenyebbnek bizonyultak** (14. ábra). A 30 μM feletti Glu már azonos mértékű, dózis-függő sejtpusztulást váltott ki a különböző tenyészetekben. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az NR2B/2C állatok kisagyában in vivo megfigyelt szemcsesejt-pusztulás egyik oka pl. az lehet, hogy az alegységcsere hatására megváltozott konduktanciájú NMDA receptorok "érzékenyebbé" tehetik a szemcsesejteket a sejtek

folyadék környezetében található glutamát iránt, ami excitotoxikus sejtpusztulásukhoz vezethet.

### II.3. A vad típusú és NR2C-2B szemcsesejtek in vitro migrációs tulajdonságainak összehasonlítása videomikroszkópia segítségével

#### II.3.a. A vad típusú és NR2C-2B szemcsesejt nyúlványok és a sejttest-elmozdulások összehasonlítása

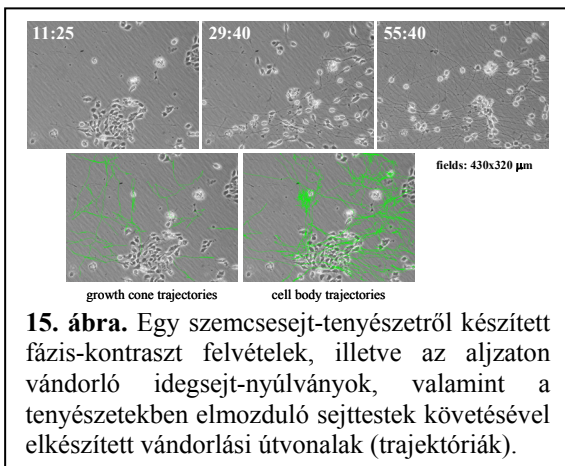
Hisztológiai munkánk során arra következtettünk, hogy az NR2C-2B állatokban lezajló alegységcsere a szemcsesejtek in vivo migrációját felgyorsíthatja. Mivel a komplex szöveti környezet jelentősen megnehezíti a szemcsesejtek vándorlására ható faktorok in vivo vizsgálatát, migrációs vizsgálatainkhoz kis sejtűségű kisagyi szemcsesejtek in vitro tenyészetéről készített videomikroszkópos felvételek elemzését választottuk.

<sup>7</sup> Az első Ca image méréseket az MTA-KOKI-ban végeztük racimetricus Fura2 feltöltéssel. A későbbiekben a méréseket az ELTE Immunológia Tanszék konfokális mikroszkóp rendszerén, Fluo3 jelölésekkel folytattuk. Mivel ez utóbbi eljárás nem racimetricus, a mérések kalibrálása még folyamatban van.

<sup>8</sup> A CP101,606 a Pfizer cég még fejlesztés alatt álló, ifenprodil-származék NR2B-alegységre specifikus gátlószere. Kísérleteinkben történő felhasználást a cég külön engedélyezte.



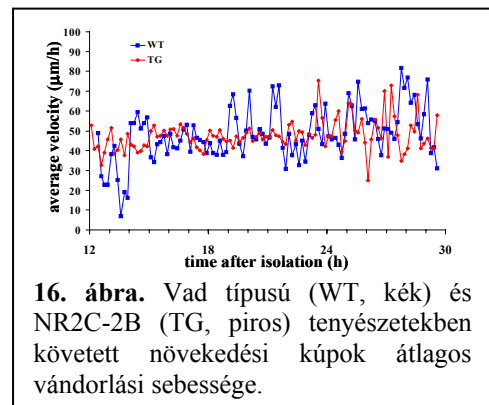
Az ELTE Biológiai Fizika Tanszék munkatársai a videomikroszkópos felvételek készítését, valamint a sejtmozgások kiértékelését vezérlő számítógépes programokat optimalizálták, illetve továbbfejlesztették, így a videomikroszkópos felvételek rögzítése akár napokon keresztül, gyakorlatilag automatikusan történt<sup>9</sup>.



**15. ábra.** Egy szemcsesejt-tenyészetéről készített fázis-kontraszt felvételek, illetve az aljzaton vándorló idegsejt-nyúlványok, valamint a tenyészetekben elmozduló sejttestek követésével elkészített vándorlási útvonalak (trajektóriák).

Az alacsony sejtsűrűségű szemcsesejt-tenyészetekben az idegsejt-nyúlványok az aljzaton történő növekedését, valamint a már kialakult nyúlványhálózatok mentén a sejttestek elmozdulását 10 perces felbontással, 48-72 óra hosszú felvételsorozatokon követtük, majd a sejtmozgások nagy esetszámú, statisztikai elemzését is elvégeztük. Eredményeink alapján a disszociált kisagyi szemcsesejtek intenzív sejtvándorlási periódusa a kiültetést követő 60. órára lezajlik<sup>10</sup>, ezért a videomikroszkópos felvételeket a kiültetést követő 6. és 50. óra között rögzítettük.

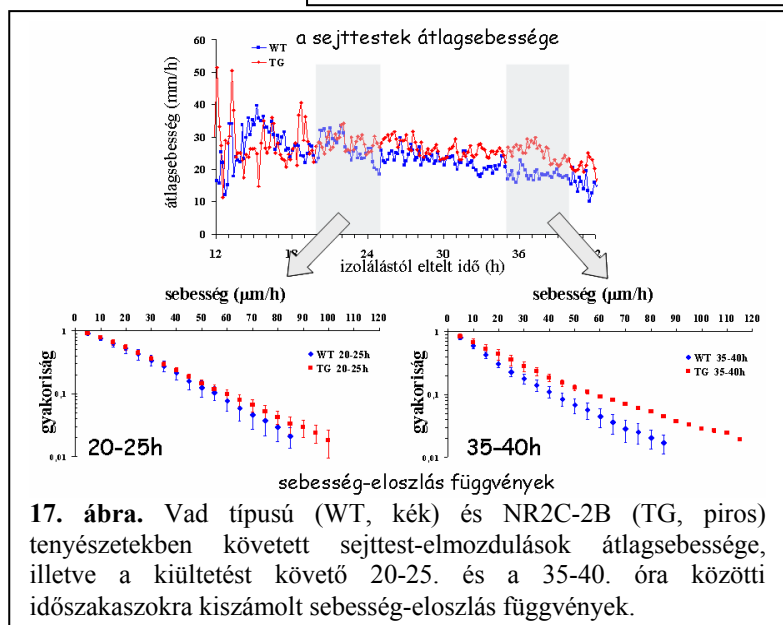
Több száz idegsejt mozgási aktivitásának elemzésével bizonyítani tudtuk, hogy az NR2B-2C alegységcsere a nyúlványok növekedési kúpjának in vitro mozgását nem befolyásolta (**16. ábra**). Mindez nem meglepő, hiszen az NMDA receptorok elsősorban a sejttesten, illetve a dendriteken lokalizálódnak, és a növekedési kúp irányításában közvetlen szerepet nem játszanak.



**16. ábra.** Vad típusú (WT, kék) és NR2C-2B (TG, piros) tenyészetekben követett növekedési kúpok átlagos vándorlási sebessége.

A tenyészetekben megfigyelhető **sejttest-mozgások időtartamát és átlagsebességét ezzel szemben az alegységcsere szignifikánsan megnövelte (17. ábra)**. A

kiültetést követő első nap során a vad típusú és a transzgén szemcsesejtek elmozdulásában még nem tapasztaltunk különbséget. A második nap folyamán a vad típusú tenyészetekben a szemcsesejtek vándorlása lelassult, ezzel szemben az NR2C-2B sejtek átlagsebessége közel azonos maradt. Mindezt a sebesség-eloszlás függvények<sup>11</sup> "szétválása" is jól szemlélteti - azaz az NR2C-2B tenyészetekben nagyobb maradt a gyors sejtek aránya.



**17. ábra.** Vad típusú (WT, kék) és NR2C-2B (TG, piros) tenyészetekben követett sejttest-elmozdulások átlagsebessége, illetve a kiültetést követő 20-25. és a 35-40. óra közötti időszakaszokra kiszámolt sebesség-eloszlás függvények.

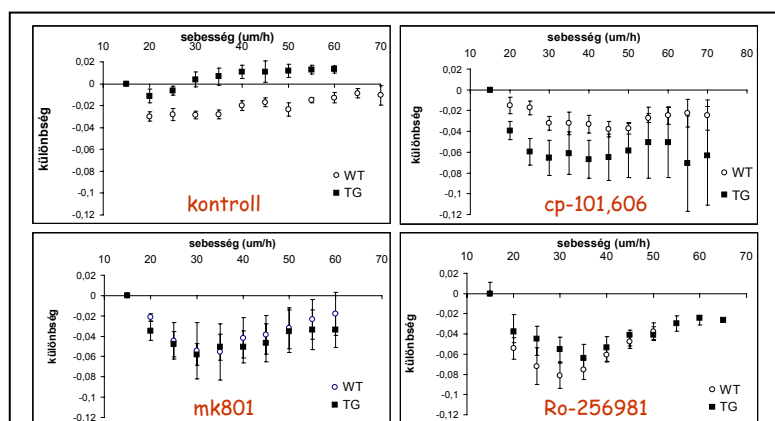
<sup>9</sup> A megvalósításban eredetileg részt vállaló Kovács János doktorandusz PhD munkáját abbahagyta, így feladatát Czírók András, illetve Tárnok Krisztián vették át.

<sup>10</sup> A különböző életkorú állatokból izolált szemcsesejt-tenyészetek mozgási aktivitásának összehasonlítását külön közleményben közzétettük.

<sup>11</sup> A sebesség-eloszlás függvény azoknak a sejteknek a gyakoriságát adja meg, amelyek egy adott - az x tengelyen feltüntetett - sebesség-értéknél nagyobb sebességgel vándorolnak. Azaz: minél gyorsabb sejtek találhatóak a tenyészetben, annál "laposabb" képet ad log skálán az eloszlásfüggvény.

### II.3.b. Az NR2B alegység szerepe a vad típusú és NR2C-2B szemcsesejtek között megfigyelhető migrációs különbség kialakításában

Annak bizonyítására, hogy az NR2C-2B szemcsesejtekre mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között jellemző nagyobb migrációs aktivitás valóban az NR2B alegység túltermelésének a következménye, a videomikroszkópos vizsgálatokat különböző NMDA receptor blokkolók jelenlétében is el kellett végeznünk. Ezeknek a méréseknek a végrehajtása nem várt technikai akadályokba ütközött - a videomikroszkópos mérések kezdetén használt inkubátoros kamrában ugyanis egyszerre csak egy tenyészet vizsgálatára nyílt lehetőség, ami több gátlószer párhuzamos alkalmazását nem tette lehetővé. Ezen nehézségek leküzdésében az ELTE Biológiai Fizika Tanszék munkatársai által kifejlesztett, 4 kamrás videomikroszkópos rendszer használata nagy segítséget nyújtott. A kiültetések során így 4 párhuzamos tenyészetet készíthettünk. A kezeletlen tenyészetekről a kiültetést követő 8-25. óra között felvételeket készítettünk, majd a 25. órában a testvér-tenyészeteket vagy tápfolyadékkal (kontroll), 20  $\mu\text{M}$  MK801-el, 1  $\mu\text{M}$  CP-101,606-tal (CP) vagy 1  $\mu\text{M}$  Ro-256981-el (Ro) kezeltük és a sejtek mozgását min. 10 további órán keresztül követtük. Irodalmi adatok alapján a CP csak az NR2B alegységet tartalmazó NR1/NR2B diheteromer receptorokhoz köt, az Ro viszont mind az NR1/NR2B di- és az NR1/NR2A/NR2B triheteromer receptorokat is képes blokkolni<sup>12</sup>.



**18. ábra.** Különböző NMDA receptor antagonisták hatása vad típusú (WT) és NR2C-2B (TG) szemcsesejtek vándorlási sebességére. Az ábrán a 15  $\mu\text{m}/\text{h}$  sebességnél gyorsabban mozgó sejtek adataiból számolt, a kezelést követő, illetve megelőző 5 órás időtartamra meghatározott sebesség-eloszlás függvények egyes sebesség-kategóriáiban megfigyelt különbség-értékei vannak feltüntetve. Minél negatívabb a különbség, az adott sebesség-kategóriájú sejtek aránya annál jobban csökken (=lassulás). A pozitív értékek az adott sebesség-kategóriájú sejtek gyakoriság-növekedését (azaz a gyorsulást) jelentik.

csökkentette a vándorló sejtek arányát. A vad típusú és az NR2C-2B tenyészetekben a CP és az Ro azonban nem egyformán hatott: a CP a transzgén szemcsesejtek vándorlási sebességét igen jelentősen csökkentette, míg a vad típusú tenyészetekben kisebb mértékben hatott. Az Ro ezzel szemben mind a vad típusú, mind az NR2B/2C sejtek migrációját lassította. Mindez arra utal, hogy az NR2C-2B szemcsesejtekben az NR2B alegység túltermelése elsősorban az NR1/NR2B diheteromer receptorok feldúsulását eredményezi, és a migrációs sebesség megnövekedéséért az NR1/NR2B diheteromer receptor-komplex lehet felelős.

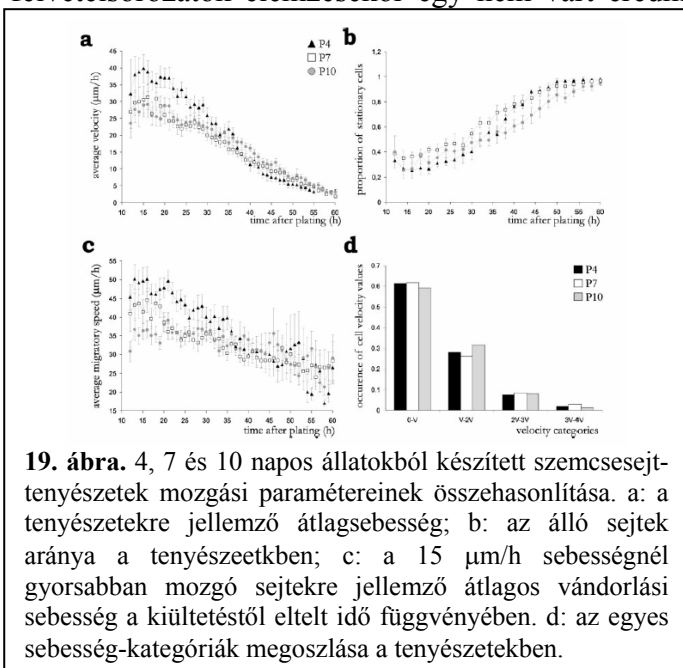
A gátlószer jelenlétében megfigyelhető vándorlási sebességeket a gátlószer adása előtti sebességekhez viszonyítottuk úgy, hogy a sebesség-eloszlás függvények adott sebesség-tartományba eső gyakoriság-értékeit kivontuk egymásból (18. ábra). A korábbi eredményekkel összhangban a kezeletlen (kontroll) tenyészeteknél a vad típusú mozgó sejtek aránya csökkent, azaz ezekben a tenyészetekben a sejtmozgás lelassult, míg az NR2C-2B tenyészetekben a mozgó sejtek sebesség-eloszlása közel állandó maradt. A nem-kompetitív NMDA receptor blokkoló MK801 a kétféle tenyészet-típusban közel azonos módon

<sup>12</sup> Chazot P.L., Lawrence S., Thompson C.L. (2002) Studies on the selectivity of CP-101,606: evidence for two classes of NR2B-selective NMDA receptor antagonists. *Neuropharmacology* 42:319-324.

A kisgyi szemcsesejt-tenyészetekben végzett *in vitro* vizsgálatok eredményét összegezve megállapíthatjuk, hogy sikerült olyan tenyésztési és izolálási feltételeket teremtenünk, amelyek esetén a vad típusú és NR2C-2B szemcsesejtekben kifejeződő NMDA receptorok összetétele és funkcionális sajátságai különböznek. A videomikroszkópos mozgáskövetés alapján megmutattuk, hogy az NR2C-2B alegységcsere a tenyésztő felületen növekvő nyúlványok, növekedési kúpok mozgására nincs hatással, ezzel szemben a szemcsesejt sejttetek transzlokációját, vándorlási átlagsebességét megnöveli. Az NR2B alegység-specifikus gátlószerekkel végzett mozgáselemzések adatai arra utalnak, hogy a vad típusú és NR2C-2B szemcsesejtek NMDA receptorainak összetétele eltér: a transzgén sejtekben nagyobb az NR1/NR2B diheteromer receptorok aránya. Adataink alapján a diheteromer NMDA receptorok arányának és/vagy működésének növekedése állhat a transzgén sejtekre jellemző, megnövekedett migrációs sebesség mögött, azaz az NMDA receptor alegység-összetételének megváltozása közvetlen hatással bír a sejtek migrációs képességeinek változására is.

#### II.4. Különböző életkorban izolált kisgyi szemcsesejtek *in vitro* fejlődésének, morfológiai és molekuláris jellemzőinek, valamint migrációs tulajdonságainak összehasonlítása

A szemcsesejt-tenyészetek tenyésztési feltételeinek optimalizálása során különböző életkorú állatokból készített szemcsesejt-tenyészeteket is megvizsgáltunk. A videomikroszkópos felvételsorozatok elemzésekor egy nem várt eredményünk is született: megfigyeltük, hogy a



**különböző életkorú állatokból származó szemcsesejtek mozgási aktivitása** azonos tenyésztési feltételek mellett is jelentősen különbözik. Habár a tenyészetek morfológiája, valamint számos molekuláris jellemzője az izolálási életkortól függetlenül rendkívül hasonló, több száz sejt mozgási adatainak statisztikai kiértékelése megmutatta, hogy a fiatalabb állatokból származó idegsejtek mozgása gyorsabb, mint az öregebb állatokból származó idegsejteké (19. ábra), és eltérő mozgási mintázattal jellemezhető. Megfigyeléseink során konkrét kísérleti adatokkal alátámasztva igazoltuk, hogy az izolálási életkor jelentősen befolyásolja a tenyésztett sejtek migrációs aktivitását, még akkor is, ha számos más paraméter

tekintetében a tenyészetek azonosnak tűnhetnek. A sejtmigrációt vizsgáló különböző kísérletes rendszerekből levont következtetések értelmezésekor és összevetésekor a sejtekre az izoláláskor jellemző fejlettséget is figyelembe kell venni. Ezen eredményeinkből önálló publikációt készítettünk<sup>13</sup>.

A laboratóriumban folyó kutatásokba több biológus hallgató is bekapcsolódott. A pályázati időszak alatt az ismertetett témákban irányításom alatt 3 egyetemi szakdolgozat, valamint 3 tudományos diákköri (TDK) dolgozat is készült. A TDK dolgozatok az ELTE Kari Biológus TDK versenyén 1-3., a 2005. évi országos fordulóban 3. helyezést értek el.

<sup>13</sup> Tárnok K., Czirik A., Czöndör K., Schlett K. (2005) Cerebellar granule cells show age-dependent migratory differences *in vitro*. *J. Neurobiol.*, 65(2):135-45.

**A pályázatban eredetileg tervezett, valamint a pályázat futamideje alatt elvégzett további kísérletek rövid eredményeinek és az ezekből készített beszámolók összefoglalása**

eredeti vállalás	teljesítés	rövid eredmény	publikációk, konferenciák (ld. hivatkozások) és egyéb közlések
NR2C-2B transzgenikus és vad típusú egerek születést követő súlygyarapodásának meghatározása	✓	az állatok súlygyarapodásában nincs számottevő különbség	Kirilly D. (2001) Szakdolgozat
vad típusú és NR2C-2B egerek kisagykérgében az EGL, MOL és IGL réteg-fejlődés összehasonlítása	✓	<b>a transzgén állatokban a MOL vastagsága, valamint a szemcsesejtek száma az IGL-ben szignifikánsan lecsökkent</b>	Kirilly D. (2001) Szakdolgozat Schlett és mtsai (1-8) Schlett és mtsai (2004) Mol. Cell. Neurosci. 27:215-226.
kifejlett vad típusú és NR2C-2B egerek kisagykérgi fejlődésének ultrastrukturális vizsgálata	✓	<b>a transzgén állatokban a Purkinje dendrittűskékre adott serkentő szinapszisok száma szignifikánsan kisebb</b>	Schlett és mtsai (1-8) Barabás B. (2003) TDK dolgozat Schlett és mtsai (2004) Mol. Cell. Neurosci. 27:215-226. Barabás B. (2006) Szakdolgozat
vad típusú és NR2C-2B egerek kisagykérgének immunhisztokémiai festésekkel történő összehasonlítása	✓	a transzgén állatokban a TAG1, NeuN immunoreaktív rétegek vastagsága nem, a calbindin immunreaktív Purkinje dendritek kiterjedése azonban csökkent	Schlett és mtsai (5-8) Barabás B. (2003) TDK dolgozat Schlett és mtsai (2004) Mol. Cell. Neurosci. 27:215-226. Barabás B. (2006) Szakdolgozat
az optimális szemcsesejt-tenyésztési körülmények meghatározása Western blottal	✓	a 10 napos állatokból izolált vad típusú tenyészetekben az NR2C alegység a tenyésztés 1. napján már kimutatható; az NR2B alegység mennyisége a transzgén tenyészetekben magasabb	Schlett és mtsai (13,16,17) Czöndör K. (2003, 2005) TDK dolgozat Czöndör K. (2005) Szakdolgozat Czöndör és mtsai (2006) J. Neurochem. közlésre benyújtva
az optimális szemcsesejt-tenyésztési körülmények meghatározása immuncitokémiai vizsgálatokkal	✓	GABA, neuron-specifikus tubulin, NeuN, illetve vezikuláris glutamát transzporter2 festés alapján a tenyésztett sejtek min. 95%-ban szemcsesejtek	Schlett és mtsai (13,16,17) Czöndör K. (2003, 2005) TDK dolgozat Czöndör K. (2005) Szakdolgozat Czöndör és mtsai (2006) J. Neurochem. közlésre benyújtva
vad típusú és NR2C-2B kisagyi szemcsesejt tenyészetek glutamát-, illetve NMDA iránti érzékenységének meghatározása excitotoxikus tesztek segítségével	✓	a transzgén tenyészetek a kis koncentrációjú (10-20 $\mu$ M) glutamát-kezelésre nézve érzékenyebbek; az NR2B-specifikus gátlószer a Glu-okozta sejtpusztulást az NR2C-2B tenyészetekben a vad típusú tenyészetekhez képest jobban kivédi	Schlett és mtsai (13,16,17) Czöndör K. (2003, 2005) TDK dolgozat Czöndör K. (2005) Szakdolgozat Czöndör és mtsai (2006) J. Neurochem. közlésre benyújtva
videomikroszkópos felvételek készítése és elemzése vad típusú és NR2C-2B kisagyi szemcsesejt tenyészetekben	✓	az idegsejt-nyúlványok és a sejttestek elmozdulását 10 percenként készített, 48-72 óra hosszú felvételsorozatokon követtük, majd a sejtmozgások sebességének és irányának statisztikai elemzését is elvégeztük	Schlett és mtsai (10-13,15-18) Tárnok és mtsai (2005) J. Neurobiol., 65(2):135-45. Czöndör K. (2003, 2005) TDK dolgozat Czöndör K. (2005) Szakdolgozat Czöndör és mtsai (2006) J. Neurochem. közlésre benyújtva
a nyúlványnövekedés és a sejttest-mozgások kvantitatív elemzése és összehasonlítása	✓	az NR2C-2B alegységcsere a nyúlványok növekedési kúpjának in vitro mozgását nem befolyásolja, de <b>a sejttest-mozgások időtartamát és átlagsebességét megnöveli</b>	Schlett és mtsai (13,15-18) Czöndör K. (2003, 2005) TDK dolgozat Czöndör K. (2005) Szakdolgozat Czöndör és mtsai (2006) J. Neurochem. közlésre benyújtva



NR2B-specifikus gátlók vagy agonisták hatásának vizsgálata vad típusú és NR2C-2B kisagyi szemcsejtek tenyészetekben	✓	az NR1/NR2B összetételű receptorokat blokkoló antagonisták (CP-101,606) a transzgén tenyészetek sebességét jobban csökkentik	Schlett és mtsai (17-18) Czöndör K. (2005) TDK dolgozat Czöndör K. (2005) Szakdolgozat Czöndör és mtsai (2006) J. Neurochem. közlésre benyújtva
a motilitási adatok a tenyészetekben megfigyelhető fehérje-szintű változásokkal történő összevetése	✓	<b>az NR2C-2B szemcsejtek megnövekedett in vitro vándorlási sebességét az NR2B alegység túlermelletése okozza</b>	Czöndör és mtsai (2006) J. Neurochem. közlésre benyújtva
az automatikus sejtjelismerő program fejlesztése	részben	a sejt követés a komplex képi információk miatt egyelőre nem automatizálható; az adathalmazok statisztikai kiértékelése a már elkészített programok segítségével, automatikusan történik	Schlett és mtsai (10-13,15-18) Czöndör K. (2003, 2005) TDK dolgozat Czöndör K. (2005) Szakdolgozat Tárnok és mtsai (2005) J. Neurobiol. 65(2):135-45. Czöndör és mtsai (2006) J. Neurochem. közlésre benyújtva
legalább 2, nemzetközi lapban megjelenő publikáció	✓		Schlett és mtsai (2004) Mol. Cell. Neurosci. 27:215-226. Tárnok és mtsai (2005) J. Neurobiol. 65(2):135-45. Czöndör és mtsai (2006) J. Neurochem. közlésre benyújtva
az eredeti munkatervben nem szereplő kísérletek			
NR2C <sup>-/-</sup> állatok kisagykérgi fejlődésének hisztológiai és immunhisztokémiai vizsgálata	+	az NR2C-hiányos állatok kisagyi rétegeinek fejlődése a vad típusú egerekével megegyező	Schlett és mtsai (2004) Mol. Cell. Neurosci. 27:215-226.
Stensaas-féle Golgi impregnáció a Purkinje sejtek dendrit-morfológiájának in vivo vizsgálatára	+	a transzgén Purkinje sejtek secunder ágvastagsága szignifikánsan vastagabb a vad típusú egerekre jellemző értékeknél	Barabás B. (2003) TDK dolgozat Barabás B. (2006) Szakdolgozat
NR2C-2B és vad típusú szemcsejtek in vivo vándorlási képességének nyomon követése BrdU jelöléssel és hisztokémiai detektálással	+	<b>a szemcsejtek szignifikánsan nagyobb utat tesznek meg az NR2C-2B egerekben, mint a vad típusú testvérek kisagyában</b>	Czöndör és mtsai (2006) J. Neurochem. közlésre benyújtva
NR2C <sup>-/-</sup> állatok BrdU jelölése	+	<b>az NR2C alegység hiánya az in vivo migrációs képességet nem befolyásolta</b>	Czöndör és mtsai (2006) J. Neurochem. közlésre benyújtva
a vad típusú és NR2C-2B szemcsejtek-tenyészetek NMDA válaszainak elemzése Ca-image segítségével	+	a tenyészetekben az NMDA receptorok aktiválása intracell. Ca szint emelkedést okoz, amit az MK801 teljesen, az NR2B-specifikus gátlók pedig részlegesen kivédnek	Schlett és mtsai (17-18) Czöndör K. (2005) TDK dolgozat Czöndör K. (2005) Szakdolgozat Czöndör és mtsai (2006) J. Neurochem. közlésre benyújtva
különböző életkorból készített szemcsejtek-tenyészetek összehasonlítása videomikroszkópos és biokémiai módszerekkel	+	<b>a tenyészetek morfológiája, valamint számos molekuláris jellemzője az izolálási életkortól függetlenül rendkívül hasonló, ugyanakkor a fiatalabb állatokból származó idegsejtek mozgása gyorsabb, mint az öregebb állatokból származó idegsejteké</b>	Schlett és mtsai (10-13,15-18) Tárnok és mtsai (2005) J. Neurobiol, 65(2):135-45.

### **Publikációk:**

- Schlett K., Pieri I., Metzger F., Marchetti L., Steigerwald F., Dere E., Kirilly D., Tárnok K., Barabás B., Kis Varga Á., Gerspach J., Huston J.P., Pfizenmaier K., Köhr G., Eisel U.L.M. (2004) Long-term NR2B expression in the cerebellum alters granule cell development and leads to NR2A downregulation and motor deficits. *Mol. Cell. Neurosci.*, 27:215-226.
- Tárnok K., Czirók A., Czöndör K., Schlett K. (2005) Cerebellar granule cells show age-dependent migratory differences in vitro. *J. Neurobiol.*, 65(2):135-45.
- Czöndör K., Tárnok K., Czirók A., Schlett K. (2006) NMDA receptor NR2B subunit overexpression increases granule cell migratory activity. *J. Neurochem.*, elbírálás alatt

### **További, a pályázat során kialakított módszereket felhasználó publikációk:**

- Marchetti L., Klein M., Schlett K., Pfizenmaier K., Eisel U.L.M. (2004) TNF mediated neuroprotection against glutamate induced excitotoxicity is enhanced by NMDA receptor activation: essential role of a TNF receptor 2 mediated, PI3 kinase dependent NF- $\kappa$ B pathway. *J. Biol. Chem.* 279:32869-32881.
- Farkas B., Tantos A., Schlett K., Friedrich P., Vilagi I. (2004) Ischemia-induced increase in long-term potentiation is warded off by specific calpain inhibitor PD150606. *Brain Res.*, 1024:150-158.

### **Kongresszusi részvételek, előadások, poszterek:**

1. Schlett K. (2001) Altered cerebellar development in transgenic mice with NMDA receptor 2B/2C exchange. "Drug Discovery 2001" Conference, organized by Pfizer Ltd; Sandwich, UK.
2. Schlett K., Metzger F., Herzog KH., Pieri I., Eisel U. (2001) Altered cerebellar granule cell development and Purkinje cell dendritic morphology in mice with NMDA receptor 2C/2B subunit exchange. 31<sup>st</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA (902.12).
3. Schlett K., Kirilly D., Kovács J., I. Pieri, P. Neuscheler, F. Steigerwald, G. Köhr, U. Eisel (2001) Az NMDA receptor 2B alegységének hosszú távú, kisagyi expressziójának vizsgálata transzgenikus egerekben. MITT VIII. Vándorgyűlés, Szeged.
4. Schlett K., Kirilly D., Kovács J., I. Pieri, P. Neuscheler, F. Steigerwald, G. Köhr, U. Eisel (2001) Az NMDA receptor 2B alegységének hosszú távú, kisagyi expressziójának vizsgálata transzgenikus egerekben. IX. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Debrecen
5. Schlett K., Kirilly D., Barabás B., Metzger F., Steigerwald F., Köhr G., Pieri I., Eisel U. (2002) Downregulation of the NMDA receptor 2B subunit during postnatal granule cell maturation is required for accurate cerebellar development. IBRO International Workshop on Signaling Mechanisms in the Central and Peripheral Nervous System, Debrecen, Hungary
6. Schlett K., Pieri I., Metzger F., Steigerwald F., Dere E., Kirilly D., Barabás B., Marchetti L., Gerspach J., Huston J.P., Pfizenmaier K., Köhr G., Eisel U. (2002) Long-term NR2B expression in cerebellar granule cells leads to decreased Purkinje cell innervation and reduced motor performance. poster 172.31; p429. 3<sup>rd</sup> FENS Forum, Paris, France
7. Schlett K., F. Metzger, E. Dere, G. Köhr, U. Eisel (2002) Long-term NR2B expression in cerebellar granule cells alters granule cell migratory activity, leads to granule cell loss, decreased Purkinje cell innervation and reduced motor performance. 1<sup>st</sup> INMED Conference, Marseilles, France
8. Schlett K., Kirilly D., Barabás B., F. Metzger, F. Steigerwald, E. Dere, I. Pieri, G. Köhr, U. Eisel (2002) A kisagyi szemcsesejtekben az NR2B NMDA receptor alegység expressziójának megszűnése a normális kisagyi fejlődéshez szükséges. X. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok
9. Schlett K. (2002) In vitro és in vivo modellek az NMDA-vezérelt ioncsatornák kutatásában. MBKE Gyógyszerbiokémiai Szakosztály XVII. munkaértekezlete; Balatonöszöd
10. Tárnok K., Hegedűs B., Kirilly D., Kovács J., Schlett K. (2003) Sejtmozgások elemzése kisagyi szemcsesejt tenyészetekben. MITT X. Vándorgyűlés, Balatonfüred
11. Tárnok K., Hegedűs B., Kirilly D., Kovács J., Schlett K. (2003) Sejtmozgások elemzése kisagyi szemcsesejt tenyészetekben. XI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok
12. Tárnok K., Czirók A., Schlett K. (2004) Investigations on cerebellar granule cell motility in vitro. IBRO International Workshop, Budapest, Hungary

13. Czöndör K., Jelítai M., Schlett K. (2004) The effects of NR2B NMDA receptor subunit overexpression in cerebellar granule cell cultures. IBRO International Workshop, Budapest, Hungary
14. Kovács L., Galgóczy K., Kis-Varga Á., Dezső P., Nagy J., Bárdos Gy. Hotváth Cs., Schlett K. (2004) Acute and persistent pain perception in NR2C/2B mice overexpressing the NR2B subunit of the NMDA receptor complex. IBRO International Workshop, Budapest, Hungary
15. Tárnok K., Czirók A., Schlett K. (2004) Idegsejtmozgások elemzése kisagyi szemcsesejt tenyészetekben. XII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs
16. Schlett K., Czöndör K., Tárnok K., Jelítai M., Czirók A. (2004) Az NMDA receptor alegység-összetételének hatása kisagyi szemcsesejtek vándorlására. XII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs
17. Czöndör K., Tárnok K., Jelítai M., Czirók A., Schlett K. (2005) The effects of NR2B NMDA receptor subunit overexpression on the migration of cerebellar granule cells in vitro. XI. MITT Kongresszus, Pécs
18. Tárnok K., Czirók A., Czöndör K., Schlett K. (2005) Cerebellar granule cells show age-dependent migratory differences in vitro. XI. MITT Kongresszus, Pécs
19. Czöndör K., Borbély S., Urbán V., Uher F., Schlett K., Világi I. (2006) Multielectrode method for recording electrical activity of cultured cells. IBRO International Workshop, Budapest, Hungary
20. Bende M., Kovács L., Watanabe M., Schlett K. (2006) Investigations on NMDA receptor composition in the spinal cord of transgenic mice following formalin induced pain. IBRO International Workshop, Budapest, Hungary

#### **TDK dolgozatok:**

- Barabás Brigitta: Az NMDA receptor NR2B alegységének hosszú távú expressziója a kisagyi kapcsolatrendszer megváltozásához vezet. Biológus TDK Konferencia, ELTE, 2003; 2. helyezés
- Czöndör Katalin: Funkcionális NMDA csatornák vizsgálata transzgenikus kisagyi szemcsesejt-tenyészetekben. Biológus TDK Konferencia, ELTE, 2003; 3. helyezés
- Kovács László: Az NMDA receptor alegység-összetétel hatásának vizsgálata laboratóriumi egerek fájdalom-érzékelésében. Biológus TDK Konferencia, ELTE, 2003; 1. helyezés
- Czöndör Katalin: Funkcionális NMDA csatornák vizsgálata transzgenikus kisagyi szemcsesejt-tenyészetekben. Biológus OTDK Konferencia, Pécs, 2005; 3. helyezés

#### **Szakedolgozatok:**

- Kirilly Dániel (2001) Az NR2B/2C transzgenikus egértörzs kisagyi fejlődésének in vivo és in vitro vizsgálata.
- Kovács László (2004) Az NMDA receptor alegység-összetétel hatásának vizsgálata laboratóriumi egerek fájdalom-érzékelésében.
- Czöndör Katalin (2005) Az NMDA receptorok alegység-összetételének hatása kisagyi szemcsesejtek in vitro migrációjára.
- Barabás Brigitta (2006) A kisagyi kapcsolatrendszer és a Purkinje sejtek morfológiájának vizsgálata transzgenikus egértörzsben.