

Magyar–német (TKA–DAAD) kutatócsere projekt
Záró beszámoló

A projekt adatai:

Nyilvántartási szám: 152214

Projektcím: Nem szövetspecifikus alkalikus foszfatáz (TNAP) idegszervi szerepének vizsgálata egér retina modellben

Magyar projektvezető neve: Dr. Völgyi Béla

Magyar intézmény neve: Pécsi Tudományegyetem

Német projektvezető neve: Dr. Kántor Orsolya

Német intézmény neve: Albert–Ludwigs Institute for Anatomy and Cell Biology,
Department of Neuroanatomy

Támogatási időszak: 2017–2018

A. A projektidőszakban elvégzett munka összefoglalása (max. 2 oldal)

A német–magyar együttműködésben megvalósuló projekt célja a nem szövetspecifikus alkalikus foszfatáz (TNAP) idegszervi szerepének felderítésére irányult. Vizsgálni kívántuk fejlődő egér retinán a TNAP működésének genetikai vagy farmakológiai kikapcsolása után a retina fejlődésében és korai működésében bekövetkező változásokat. Az enzim kikapcsolásának hatásait knock-out (KO) egerek (Freiburgban), illetve TNAP gátlószer adása után (Pécsen) in vitro funkcionális és szövettani eljárásokkal terveztük vizsgálni.

Retina fejlődésének vizsgálata

TNAP génkiütött állatok retináját szerettük volna vizsgálni a születés utáni 8–9. napon szövettani módszerekkel. Mivel a TNAP szerepet játszik a neurogenesisben, a sejtek migrációjában (Langer és mtsai 2007), feltételeztük, hogy a TNAP enzim kiütésének hatására megváltozik a retina felépítése. Ezekben a kísérletekben sztereológiai módszereket terveztünk, melyekben retina egyes rétegeit akartuk vizsgálni sejtípusokra lebontva (fotoreceptorok, bipoláris, amakrin- és ganglionsejtek). Dr. Kántor megrendelte azokat a transzgenikus állatokat, amelyekre alapozva egérkolóniát szerettünk volna létrehozni. A fiziológiai kísérletekben az egérkolónia fiatal (8–9 napos) egyedeként szándékoztunk felhasználni. Azonban problémát jelentett a tenyésztés közben az a tény, hogy az utódgenerációk egyikében sem születtek KO (TNAP^{-/-}) egerek. Minden utód vagy heterozigóta (TNAP^{+/-}) vagy homozigóta TNAP^{+/+} egér volt. A

projekt indulásától eltelt idő alatt folyamatosan próbálkoztunk vizsgálható TNAP-/- állatok létrehozásával, de ez egyetlen esetben sem járt sikerrel. Ebből arra következtettünk, hogy a TNAP-/- utódok életképtelenek voltak és már a méhen belül elpusztultak. Így sajnos a projektnek a TNAP-/- állatok vizsgálatával kapcsolatos célkitűzését el kellett vetnünk.

Retina korai működésének vizsgálata

A retina korai spontán működésének (retinális hullámok) változását P7 és P8 napos korban, *in vitro* Ca⁺⁺-imaging és multielektrod array módszerekkel TNAP gátlószer (MLS-0039949, Merck) beadása vagy TNAP génkiütés után terveztük vizsgálni (PTE-n és Freiburg-ban). A fenti génkiütött állatokkal kapcsolatos probléma miatt az ezeken tervezett funkcionális vizsgálatokat nem tudtuk végrehajtani. Ugyanakkor a P8 napos vad típusú (WT) egereken tervezett méréseket megterveztük, az ezekben résztvevő kutatók utazásának és szállásának logisztikáját megszerveztük (Dr. Kántor két ízben látogatott Pécsre; Balogh Márton, Tengölics Ádám és Varga Dániel több hétre Freiburgba utazott, Dr. Völgyi pár napos látogatást tett Freiburgban; Somogyvári Zoltán és Benkó Zsigmond pár hetet töltöttek Freiburgban) és a kísérleteket rendben végrehajtottuk. A Ca⁺⁺-imaging kísérletek esetében spontán aktivitást sikerült regisztrálnunk Fluo4 töltött retinális sejteken. Ezeknél a P8 egereknél azonban a fénystimulálás semmiféle aktivitást nem váltott ki, ugyanis a fényválaszok az egér retina sejtjei esetén legkorábban P11 után jelentkeznek. Ezekben a kísérletekben a P8-9 állatok esetén korábban leírt retinális aktivitási hullámokat szerettük volna blokkolni a TNAP gátlószer alkalmazásával. Ugyanakkor a felvételeken a spontán események már a kontroll méréseknél sem hullámok formájában jelentkeztek. E miatt a farmakológiai blokádnak sem eredményezhette a várt hatást. Ugyancsak vizsgáltuk a P8 állatok dúcsejtjeinek aktivitását multielektrod array (MEA) elektrofiziológiai mérésekkel. Nagyjából hasonló eredményeket kaptunk ezzel a megközelítéssel is, azaz a P8 egér retina dúcsejtjei spontán akciós potenciálokot generáltak, ugyanakkor a 64 csatornás elvezetésen már kontroll állapotban sem sikerült megfigyelni az aktivitási hullámok jelenlétét. A MEA kísérleteket a nyári kollaborációs kísérletek során megismételtük Freiburg-ban is, ahol egy új, más rendszerű, de szintén 64 csatornás MEA elvezető rendszert alkalmaztunk. Ezekben a kísérletekben több szerencsénk volt, ugyanis nem csak spontán aktivitást sikerült regisztrálni a P8 és P9 állatok retináin, hanem a dúcsejtek aktivitásának hullámszerű terjedését is detektálhattuk a kontroll kísérletekben. A méréseket elvégeztük mind kontroll esetben, mind TNAP blokkoló szer alkalmazása közben. Mindkét állapotban regisztráltuk az eseményeket és a mérési eredményeket továbbítottuk a projektben részt vállaló Dr. Somogyvári Zoltánnak (Wigner Fizikai Kutatóközpont, Elméleti Idegtudományok és Komplex Rendszerek Csoportja), aki munkatársaival (Cserpán dóra és Benkó Zsigmond) azokat feldolgozták és kiértékeltek.

B. A közös projekt eredményei (max. 2 oldal)

A projekt tervezetében megfogalmazott kísérletes előkészületeket elvégeztük. Dr. Kántor megrendelte a TNAP+/- egereket, melyek a GMO tenyészet alapjául szolgáltak. Megszerveztük a 2017 évre a kollégák utazásait (vonatjegyek, autóutak, repülőjegyek) illetve foglaltunk szállást mind a német-magyar mind a magyar-német irányban utazó kollégák esetében. Ennek eredményeként Dr. Kántor két ízben tett látogatást a PTE laborban, melynek során MEA elektrofiziológiai és Ca⁺⁺-képzőképzési kísérletekben vett részt. A nyári hónapokban a német laborba látogatott a Völgyi labor több képviselője is, Tengölics Ádám PhD hallgató, Balogh Márton és Varga Dániel MSc hallgatók, valamint Dr. Völgyi Béla PI. Freiburgban töltött idejük nagy részét MEA elektrofiziológiai mérésekkel töltötték, illetve a helyi képzőképzési centrum munkatársaival egy mérőállomás létrehozásán munkálkodtak. Ez utóbbi mérőállomás végül az idő rövidsége miatt nem érte el azt a készütségi állapotot, amely a tervezett kísérletek végrehajtásához szükséges lett volna. Az elvégzett kísérletes munka eredményeit az alábbiakban foglalom össze.

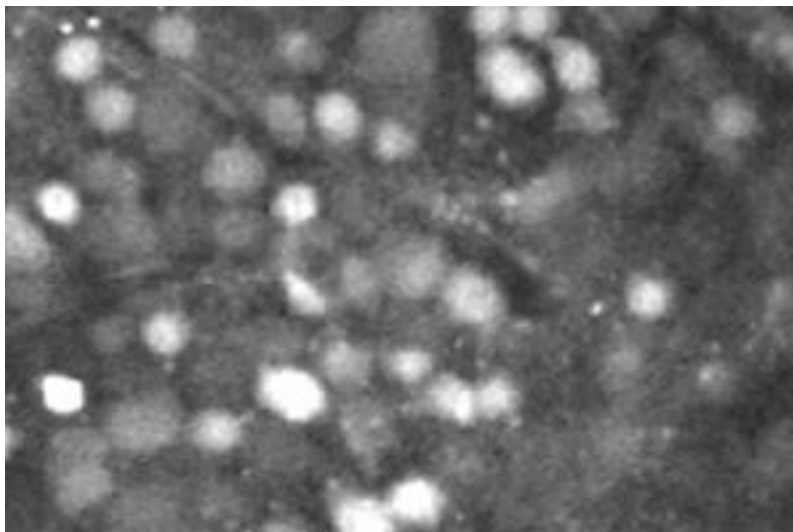
Retina fejlődésének vizsgálata

Amint azt a fentiekben vázoltam, a TNAP génkiütött állatok retináját szeretnénk volna vizsgálni a születés utáni 8-9. napon szövettani módszerekkel és a retina egyes rétegeit akartuk vizsgálni sejttípusokra lebontva (fotoreceptorok, bipoláris, amakrin és ganglionsejtek). A kísérletekhez szükséges transzgenikus egereket Dr. Kántor megrendelte és azok meg is érkeztek Freiburgba. A terveinkben az szerepelt, hogy egérkolóniát hozunk létre, melyből a fiatal (8-9 napos) egyedeket használjuk a kísérletekhez. Ezek egy része TNAP-/-, más része TNAP+/+ (kontroll) állatok lettek volna. Ugyanakkor nem várt nehézséggel kellett szembenéznünk, ugyanis az utódgenerációk egyikében sem születtek KO (TNAP-/-) egerek. Minden utód vagy heterozigóta (TNAP+/-) vagy homozigóta TNAP+/+ egér volt. Ennél fogva a projektnek a TNAP-/- állatok vizsgálatával kapcsolatos kísérleteket nem sikerült elvégezni, az azzal kapcsolatos célkitűzéseinket el kellett vetnünk.

Retina korai működésének vizsgálata

A retina korai spontán működésének (retinális hullámok) változását P7 és P8 napos korban, in vitro Ca⁺⁺-imaging és multielektrod array módszerekkel TNAP gátlószer (MLS-0039949, Merck) beadása vagy TNAP génkiütés után vizsgáltuk (PTE-n és Freiburg-ban). A kísérleteket P8 napos vad típusú (WT) egereken végeztük. Míg sikeres Ca⁺⁺-képzőképzési kísérleteket csak Pécsen sikerült végeznünk. Az elektrofiziológiai MEA méréseket sikerült beállítanunk és elvégeznünk mind a két laboratóriumban. A Ca⁺⁺-imaging kísérletek esetében azt figyeltük meg, hogy a fénystimulálás semmiféle aktivitást nem vált ki. Ennek az az oka, hogy a P8 állat retinája még folyamatos átalakulásokon megy keresztül, a végleges neuronális kapcsolatok még ekkorra nem alakulnak ki. E miatt a fényválaszok az egér retina sejtjei esetén legkorábban P11 után

jelentkeznek. Ezzel szemben a képkalkotási kísérletek esetében sikerült spontán aktivitást regisztrálni a P8 állatoknál.



Ábra 1. A P8 egér retina felszíne Fluo4 Ca^{++} -indikátorral való feltöltése után. A képen különböző méretű és alakú retinális dúcsejtek láthatók. Ezek fluoreszcencia változása utalt a sejtek aktivációjára.

Ezekben a kísérletekben a P8–9 állatok esetén korábban leírt retinális aktivitási hullámokat szerettük volna blokkolni a TNAP gátlószer alkalmazásával. Bár spontán eseményeket rendszeresen regisztráltunk, azok még a kontroll méréseknél sem hullám formájában jelentkeztek. E miatt a TNAP blokkoló szer alkalmazására a Ca^{++} -képkalkotási kísérletekben nem került sor.

A P8 állatok dúcsejtjeinek aktivitását multielektrod array (MEA) elektrofiziológiai mérésekkel is regisztráltuk. A képkalkotási kísérleteket megerősítve, a MEA mérések alapján is egyértelmű volt, hogy a regisztrált dúcsejtek egy része spontán aktivitást mutat, mely akciós potenciál burst-ök formájában nyilvánul meg. Ezeket a kísérleteket első alkalommal a pécsi laborban végeztük, de ezeken az elvezetésekben (a Ca^{++} -képkalkotási kísérletekhez hasonlóan) kontroll állapotban sem sikerült megfigyelni az aktivitási hullámokat. Ettől függetlenül a TNAP blokkoló szert alkalmaztuk néhány kísérletben annak reményében, hogyha az aktivitási hullámokra kifejtett hatást nem is, de esetleg más fiziológiai paraméterben (burst-ök hossza, interspike intervallum, spike-ök lefutása stb.) kifejtett hatást sikerül majd rögzíteni. A MEA kísérletek többségét Freiburg-ban megismételtük szintén egy 64 csatornás rendszeren. Ezekben a kísérletekből több adatot tudtunk produkálni, ugyanis a spontán aktivitás mellett a P8 és P9 állatok retináin a várt aktivitásának hullámokat is detektálhattuk. Ennek értelmében tehát mind kontroll, mind TNAP blokkolt méréseket is végeztünk ugyanazonokon a preparátumokon, ugyanazokból a dúcsejtekből. Ezeket a regisztrátumokat csakúgy, mint a kevésbé sikeres pécsi MEA méréseket továbbítottuk a projektben részt vállaló Dr. Somogyvári Zoltánnak (Wigner Fizikai Kutatóközpont, Elméleti Idegtudományok és Komplex Rendszerek Csoportja), aki munkatársaival (Cserpán dóra és Benkő Zsigmond) azokat feldolgozták és kiértékelték. Az adatok analízise során azonban sem a spike-ök,

sem a burst-ök lefutásában nem sikerült kimutatni TNAP blokkolószer hatást. Legnagyobb meglepetésünkre a TNAP gátlószer sem a detektált aktivitási hullámok gyakoriságát, sem pedig azok időbeli/térbeli lefutását nem változtatták meg.

C. Az együttműködés további szempontjai: (max. 3 oldal)

A tervezett kísérletek egy részét nem sikerült elvégezni a fent részletezett problémák miatt. Ezek közül a TNAP génkiütött állat hiánya jelentette a legnagyobb problémát. A vad típusú egereken tervezett kísérleteket sikerült a tervek szerint elvégezni vagy az egyik, vagy a másik (a MEA elvezetések esetében mindkét) laboratóriumban. Ezekben a kísérletekben tehát értékelhető eredményeink voltak, de azon elemzése után nyilvánvalóvá vált, hogy a munkahipotézisünk alapján várt eredményektől eltérőek voltak a megfigyeléseink; a P8 állat retina dúcsejtjeinek sem a spike, sem a burst-lefutásában nem figyeltünk meg egyértelmű változást, de a spontán aktivációs hullámok idő- és térbeli lefutása sem változott. Ennél fogva megbeszélés tárgyát képezte az, hogy a munkakapcsolat második évére a célkitűzéseinket módosítjuk és ezzel kapcsolatban a pályázat kiírója irányában kérvényt fogalmazunk meg. Erre azért nem került sor, mert a német kollaborációs partner, Dr. Kántor Orsolya státuszában változás állt be 2017. 09. 01-től. Dr. Kántor olyan új munkakört tölt be, amely sajnos nem teszi lehetővé a további kollaborációs munkát. E miatt a változás miatt a költségvetési periódus végével nem projekt-közi elszámolást, hanem záró elszámolást végzünk.

Ugyanakkor a projekt első évében végzett kollaborációs munka sok szempontból kifejezetten hasznos volt. A projektben megfogalmazott kérdések egy részére ugyan nem sikerült választ adnunk a fent megnevezett nehézségek miatt, ugyanakkor nyilvánvalóvá váltak azok a gátló tényezők, melyekkel nem voltunk korábban tisztában (p. a TNAP-/- állatok életképtelensége, a blokkoló-szernek az alkalmazott koncentrációban nem vagy csak kis mértékben hatnak etc.). Ezek ismerete egy potenciális későbbi projekt munkája során hasznos információkként fognak szolgálni. A szakmai tapasztalatok mellett szintén hasznosnak tekinthetők a projekt egy éve alatt szerzett külföldi labortapasztalat és a külföldi intézetben elért szocializáció. Ez az utóbbi szempont különösen a hallgatók (Balogh Márton, Varga Dániel, Tengölics Ádám és Benkó Zsigmond) szempontjából nagyon fontos, ugyanis hallgatók lévén ők a kutatói pálya elején tartanak. Ebben a fázisban nagyon hasznos, ha a leendő kutató minél több ismeretségre tesz szert, amelyet a későbbi kutatómunka során laborépítése és kollaborációk kiépítése esetén tud majd kamatoztatni. Ebben a tekintetben a Freiburg-ba látogató magyar hallgatók maximálisan teljesítettek, ugyanis nem csak a laboratóriumi tagokkal ismerkedtek meg és ápoltak kollegiális viszonyt, hanem munkájukkal és pozitív hozzáállásukkal az intézet vezetőségének elismerését is elnyerték. A szocializációt és a

projekt munkájának ismertetését/terjesztését ugyancsak elősegítette az a bemutatkozó előadás, melyet Dr. Völgyi tartott Freiburgban, látogatása ideje alatt az intézet munkatársainak. Az utóbbi eredmények folyamánya volt egyértelműen, hogy az intézetvezető, Dr. Andreas Vlachos és Dr. Völgyi Béla tárgyalásai alkalmával több ízben szó volt hosszabb távú együttműködésről is a két intézet munkatársai között.

1. Mennyiben alapulnak a projekt elért eredményei a német–magyar együttműködésen? A projekt kísérleteinek megvalósításához feltétlenül szükség volt a két labor közötti kutatócserére. Az ezzel járó utazás finanszírozásában a DAAD pályázat elengedhetetlen volt.
2. Hogyan befolyásolta a támogatás a projekt előmenetelét? A támogatás elősegítette a projekt előmenetelét.
3. Hogyan csatlakozott a második évi munka az első év eredményeihez? Csak egy évig futott a projekt.
4. Milyen szempontból volt jelentős a projekt a fiatal kutatók tapasztalatszerzése, szakmai fejlődése szempontjából? A projektben részt vett fiatal kutatók (Benkő Zsigmond, Balogh Márton, Tengölics Ádám és Varga Dániel) németországi laboratóriumi munkája nem csak a projekt szempontjából volt hasznos, hanem amiatt is, hogy betekintést nyertek egy külföldi laboratórium munkájába és az intézet életébe.
5. Sorolja fel azokat a hazai vagy külföldi tudományos közleményeket és publikációkat, amelyek az együttműködés eredményeként jelentek meg! A kísérletek nem hozták a várt eredményt, így közlemény nem született.
6. Milyen akadályokat vagy problémákat érzékelt a projekt végrehajtása során? Technikai problémáink voltak a használni kívánt KO állatokkal (lásd fent).
7. Mi a legjelentősebb szakmai eredmény, amit kiemelne a projektegység együttműködés kapcsán? A P7/P8 állatok retináin detektált spontán aktivitási hullámok, melyeket a TNAP gátló szerrel a szakirodalmi adatok alapján kalkulált koncentrációban nem sikerült blokkolni.
8. Van-e olyan javaslat, amivel módosítaná a pályázati felhívás és végrehajtás szempontjait a jövőre nézve? nincs

Kelt: Pécs, 2017. 11. 27.


Aláírás

Abstracts submitted by potential contributors are strictly for your use as the Topic Editor. They allow you to assess the intended contributions for both quality and scope and will not be published anywhere on the website.