

## **KÍSÉRLETI ORVOSTUDOMÁNYI KUTATÓINTÉZET**

1083 Budapest, Szigony u. 43., 1450 Budapest, Pf. 67.

Telefon: 210-9400, Fax: 210-9423

e-mail: info@koki.hu, honlap: www.koki.hu

### **I. A kutatóhely fő feladatai a beszámolási évben**

Az Intézet fő feladata az idegtudományok területén végzett alapkutatás, azaz a céllal, hogy feltárva az idegműködés törvényszerűségeit elősegítse az ember egészségének megóvását és az eredményes gyógyítást. Feladata a művelt tudományterületek korszerű kutatómódjának, módszertanának fejlesztése is. Részt vesz a graduális- és posztgraduális képzésben, továbbá a tudományos ismeretterjesztésben. Hazai és külföldi együttműködések keretében kutatási lehetőségeket teremt az idegrendszerrel foglalkozó szakemberek számára.

A különböző idegtudományi kérdéskörökre szakosodott kutatócsoportok – a legkorszerűbb módszertant és multidiszciplináris megközelítést alkalmazva - elsősorban gyógyszertani, ezen belül molekuláris és celluláris farmakológiai kutatásokkal és módszerek fejlesztésével, endokrin neurobiológiai és molekuláris neuroendokrinológiai kutatásokkal, az agykéreg és a thalamusz kutatásával, celluláris neurobiológiai kutatásokkal, molekuláris neurobiológiai és genetikai- továbbá idegi sejtbiológiai kutatásokkal és magatartás neurobiológiai kutatásokkal foglalkoznak.

A főbb területek: a neurotranszmisszió, a sejtprotekción, a hallási, a tanulási és memóriafolyamatok, a stressz, az agresszió, a szorongás, az addikció, az ischaemiás és epilepsziás agykárosodás, a hormonszekréció központi és perifériás szabályozása, a táplálkozás és az elhízás új kísérleti állatmodellek előállítása és genetikailag módosított modellek tárolása. A stresszel, az ösztrogén szintek kóros változásaival, a pajzsmirigyműködés rendellenességeivel, valamint metabolikus betegségekkel szembeni küzdelem jegyében kutatják a neuroendokrin és autonóm szabályozás összefüggéseit. További célkitűzés a stresszhormonok és az agresszivitás közötti összefüggések, a traumatikus stresszorok következményeinek tanulmányozása, a cannabinoid rendszernek a magatartás szabályzásában játszott szerepének vizsgálata, valamint a vazopresszin krónikus stresszben betöltött szerepének tisztázása. Fejlesztő vállalkozásokkal együttműködve mind eredményesebben törekszenek új vizsgálati eljárások és hatóanyagok kifejlesztésére.

### **II. Az év folyamán elért kiemelkedő kutatási és más jellegű eredmények, azok gazdasági-társadalmi haszna**

#### *Celluláris és hálózatneurobiológiai kutatások*

##### Agykéreg kutatások

Felfedeztek és karakterizáltak egy új típusú összeköttetést a felszálló szerotoninerger rendszer és a hippokampusz között. Kimutatták, hogy e kapcsolat szerotonin mellett glutamátot is tartalmaz és ennek segítségével gyorsan és hatékonyan képes módosítani a hippokampusz működését. Ez az eredmény, mely a Science folyóiratban került közlésre, alapvetően eltér a

serotoninerg rendszerrel kapcsolatos minden korábbi ismerettől, és új megvilágításba helyezi a depresszió neurobiológiai alapjairól alkotott nézeteinket.

Kimutatták, hogy a mielinhévely nélküli C-rostok és a mielinizált A $\delta$ -rostok által formált glomeruláris nociceptív szinapszisokban működik egy endokannabinoid jelátviteli útvonal, amely szinaptikus biztosítékként csökkenti a szinaptikus áttevődés hatékonyságát fokozott preszinaptikus aktivitás esetén a nociceptív pályák szinapszisaiban. További munkáikban, kollaborációs keretek között kimutatták, hogy az endokannabinoidok speciális esetekben pronociceptív hatásúak is lehetnek, például a centrális hiperalgéria jelenségében. Ez, a szintén a Science-ben közölt eredmény, új utakat nyit meg a fájdalomi kórképek kezelésének területén.

A nitrogén monoxid szignalizációs útvonallal kapcsolatos kutatásaik során kimutatták, hogy a glutamát receptoroknak jelentős szerepe van a GABAerg ingerületáttevődés működésében, a nitrogén monoxid jelátvitel beindításán keresztül. Ezenkívül igazolták a nitrogén monoxid útvonal fontosságát az emlős agy korai fejlődési szakaszában. E munkák jelentősek lehetnek a fontos gyógyszer-célpontnak tartott GABAerg ingerületáttevődés működésének jobb megértésében.

Hazai és nemzetközi kollaborációban vizsgálták epilepsziás betegekben a kérgi oszcillációk keletkezési mechanizmusait in vitro és in vivo, illetve tanulmányozták az ezt kísérő morfológiai elváltozásokat. Kimutatták, hogy a patológiás hippocampális CA2 régió is képes spontán interiktális szinkron aktivitást generálni, ami különbözik a korábban a subiculumban talált aktivitási mintázattól. Ezen felül különböző membránproteinek expresszióját tanulmányozták pilocarpin-indukálta epilepszia modellben.

Hasznosíthatóság: humán és rágcsáló kutatásaik egyedülálló lehetőséget teremtenek az epilepszia működési mechanizmusainak megértésében.

#### Celluláris idegéletani kutatások

Kimutatták, hogy a kisgyermeki Purkinje-sejtek axon kollaterálisainak aszimmetrikus elrendeződése következtében a kisagyban létrejövő oszcillációk a kisagy lobulus csúcsától az alapja felé terjednek. Ezeket az eredményeket a Nature Neuroscienceben közölték. Továbbá kimutatták, hogy az eddig használt neurokémiai markerek nem alkalmasak a mély rövid-axonú sejtek altípusainak jellemzésére a szaglógumóban, kivéve a metabotrop glutamát receptor 1 $\alpha$ , mely szelektíven a GL-típusú mély rövid-axonú sejtekben expresszálódik

#### Hálózat idegéletani kutatások

A kérgi oszcillációk mechanizmusainak feltárásakor meghatározták azokat a mérési körülményeket, amelyek mellett elegendő oxigén áll a sejtek rendelkezésére a túlélő agyszövet-preparátumokban, hogy a sejtek tartós aktivitása biztosítva legyen.

Hasznosíthatóság: szabadalmaztattak egy új elven működő szeletkamrát, amely optimális körülményeket biztosít az oszcillációk tanulmányozásához in vitro.

#### Talamusz kutatások

Anatómiai és fiziológiai módszerekkel kimutattak egy alapvetően új információ átviteli módot a talamuszban. Igazolták, hogy bizonyos relésejtek nem egy forrásból származó információ „relézését” végzik, hanem két különböző eredetű információ integrálását hajtják végre. Továbbá kimutatták, hogy eltérő bemeneti tulajdonságokkal rendelkező talamikus sejtek a agykérgi oszcillációk különböző fázisaiban tüzelnek.

Hasznosíthatóság: főemlős talamuszban megvizsgálták a működést meghatározó serkentő óriás terminálisok eloszlását, ami alapvető információkat szolgáltat számos a talamokortikális rendszert érintő neurológiai kórkép alapjainak megértéséhez.

## *Farmakológiai kutatások*

### GABAerg interneuronok vizsgálata két-foton képalkotással

2-foton mikroszkópia segítségével szómán kiváltott akciós potenciálok (AP) által létrejött  $\text{Ca}^{2+}$  tranzienseket mértek az axonfában. A nagyaffinitású indikátor (OGB-1) használatával az egy akciós potenciálhoz tartozó  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek is jól elkülöníthetőek ( $dF/F > 0.5$ ). A nagy tranziensek kizárólag a varikozításokon megfigyelhetőek, a varikozítások közötti szakaszon a  $\text{Ca}^{2+}$  jel értéke csak 23 %-a volt az előbbieknél. A fluoreszcens jel felfutási ideje a vonalmenti pásztázás (line scan) időbeli felbontástól függ, értéke alacsony (<ms), a lassú komponens viszont több száz ms-on keresztül fennmarad. Cadmium hatására a  $\text{Ca}^{2+}$  jelek teljesen gátlódtak, mutatva, hogy a kiváltott AP-k által kialakuló  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek létrejöttéért a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák felelősek.

Hasznosíthatóság: A módszer alkalmas arra, hogy gyógyszerkutatási szempontból az agyban gátló GABA-erg transzmisszió pre- és extraszinaptikus szabályozását tanulmányozzuk.

### Dendritikus integráció vizsgálata 3D két-foton képalkotással

Nagyfelbontású, 3-dimenziós 2-foton lézer szkennelő módszert fejlesztettek ki (szabadalommal védett) mely képes hosszú dendritszakaszokat, tüskéket és bemeneteket néhány ms-os felbontással vizsgálni. Úgy találták, hogy helyi dendritikus spike-ok keletkezhetnek a stratum radiatum interneuronjaiban, valamint a spontán hálózati aktivitás is kiválthatja ezeket az NMDA spike-okat. Megállapították, hogy NMDA spike akkor keletkezhet, ha ~15 db, csoportba gyűlt bemenet szinkronban érkezik a sejtre, és szupralineáris integrációt idéz elő. A piramis sejtekben leírt, a számítási alegységek és a dendritikus elágazások közötti négyesemközi viszonyal ellentétben, az interneuronoknak elég kicsi (~14  $\mu\text{m}$  széles), csúszó kölcsönhatási zónájuk van..

Hasznosíthatóság: A műszer és a módszer használatával tanulmányozni lehet hogy az interneuronok mi módon integrálják a szinaptikus információt a dendritikus spike-ok segítségével.

### Automata elektrofiziológiai módszerek metodikai fejlesztése

Olyan protocolokat, illetve elemző módszereket dolgoztak ki, amelyben az anyagi és időbeli ráfordítás és a nyert információ mennyiség arányát optimalizálták. A kísérletekre fordított idő és költség jelentős növelése nélkül sokkal több információt lehet a vizsgált vegyületekről kinyerni.

Hasznosíthatóság: Elektrofiziológiai vizsgálatok egységnyi anyagi költségeinek csökkentése.

### $\text{Na}^+$ -csatornagátlók állapot szelektivitásának elméleti és gyakorlati vizsgálata

Szimulációs kísérletekben egy általuk kifejlesztett  $\text{Na}^+$ -csatorna kinetikai modellt használva ismert hatásmechanizmusú vegyületek kísérletes viselkedését hasonlították össze.  $\text{Na}^+$ -csatornagátlókat teszteltek.

Hasznosíthatóság: Javasoltak egy olyan eljárást, amellyel a gyógyszerek egy részének állapot-preferenciája meghatározható.

### Funkcionális Nav1.7 szelektivitást mutató vegyület fejlesztése

A nátrium( $\text{Na}^+$ )-csatornák Nav1.7 izoformájának kiemelkedő jelentősége van a fájdalomérzékelésben. Kutatásuk célja ezen izoforma szelektív gátlójának előállítás. A  $\text{Na}^+$ -csatornagátló gyógyszerek állapot szelektivitást mutatnak, nagyobb affinitással kötnek az aktivált ill az inaktivált konformációban lévő csatornához. Összehasonlító kinetikai vizsgálattal feltérképezték, mely konformációs állapotok azok, amelyekben a Nav1.7

izofорма relative több időt tölt. Találtak olyan vegyületet amely ehhez az állapothoz különösen nagy affinitást mutat, vagyis funkcionális szelektivitást mutat.

Hasznosíthatóság: A vegyület kiindulási pont lehet egy új fájdalomcsillapító gyógyszer kifejlesztéséhez

#### Alfa7 típusú nikotinikus acetilkolin receptor ( $\alpha 7$ nAChR) mutáció kinetikai elemzése

Kollaborációban az  $\alpha 7$  nAChR működését, az aktiváció és a deszenzitizáció mechanizmusát vizsgálták. A receptor kinetikai modelljét készítették el.

Hasznosíthatóság: Értelmezhető a mutáció hatása az egyes konformációs állapotok szabadenergia szintjeire, és az átalakulások sebességi állandóira lefordítva.

#### Transzmitter diffúzió modellezése

Kidolgoztak egy transzmitter diffúzió modellt, amelynek segítségével tetszés szerinti transzmitter típusra számíthatók a koncentráció eloszlás tér- és időbeli mintázatai. Meghatározható a felszabaduló transzmitter aktív élettideje ("maximum active lifetime") és effektív hatósugara ("maximum effective radius") különböző receptor típusok esetében, és vizsgálható a felszabadulás és a visszavétel kinetikájának hatása is.

Hasznosíthatóság: Neurotranszmisszió kinetikájának tanulmányozása.

#### Az ischemia és az epilepszia intracelluláris patomechanizmusának vizsgálata

Az intracelluláris  $Ca^{2+}$  homeosztázis kiemelt szerepet játszik mind az epilepszia mind az ischémiás agykárosodás (stroke) patomechanizmusában. A perzisztens, nem inaktiválódó  $Na^+$  áram erősödése szintén meghatározó tényező bizonyos epilepszia formák és az agyi ischémia patológiájában. *In vitro* model kísérletekben alkalmazott funkcionális képpalkotó eljárásokkal feltérképezték a kóros  $Ca^{2+}$  koncentráció és a perzisztens, nem inaktiválódó  $Na^+$  áram interakciójának mechanizmusát.

Hasznosíthatóság: Új, az epilepszia és az agyi ischémia gyógyítására alkalmas gyógyszertámadáspontok kifejlesztése.

#### A szenzorineurális halláskárosodások (SNHL) patomechanizmusának vizsgálata

Az ischémia és az excitotoxicitás fontos szerepet játszanak a SNHL-ban. A szőrsejtek túlzott glutamát (Glu) felszabadítása – pl. zajkárosodás alatt – túlaktiválja és károsítja a hallóideget. Ez ellen védelmet nyújtanak a laterális olivocochleáris (LOC) efferensek, amelyek axodendritikus szinapszisokat adnak a hallóneuronok végződéseire. A LOC efferensekből felszabaduló dopamin (DA) protektív hatású. Kimutatták, hogy különböző receptor ligandok ill. a DA-erg metabolizmust befolyásoló anyagok fokozzák a DA-erg neurotranszmissziót, aminek cochleoprotektív hatása van.

Hasznosíthatóság: Új cochleoprotektív támadáspontokat és terápiás lehetőségeket azonosítottak.

#### A CB1 kannabinoid receptorok szerepének vizsgálata az önjutalmazásban

Kimutatták, hogy a drogfüggőség kialakulásában kulcsszerepet játszó *nucleus accumbens* agymagban a CB1 receptorok aktivációja dizinhibíciós mechanizmussal dopamint (DA) szabadít fel. Az elvégzett vizsgálatokban a kannabinoid agonista WIN55212-2 fokozta az elektromos ingerlés által kiváltott DA felszabadulást, ez a hatás azonban megszűnt a GABA<sub>A</sub> receptor antagonistá, bicuculline jelenlétében, ami azt igazolja, hogy a kannabinoidok elsődlegesen a GABA felszabadulást gátolják, és a DA felszabadulásra gyakorolt tónusos GABAerg gátlás csökkenése vezethet a DA felszabadulás növekedéséhez. Vizsgálataik az irodalomban elsőként igazolják, hogy a kannabinoidoknak lokális DA felszabadító hatása is van az önjutalmazási funkciókért felelős agyterületeken.

Hasznosíthatóság: A kannabinoid abuzus molekuláris mechanizmusának megismerése elősegíti új támadáspontok azonosítását a kábítószerfüggőség terápiájára.

#### A purinerg jelátviteli rendszer és a fájdalom csökkentése

Az ionotrop P2X és a metabotrop P2Y receptorok egyes altípusain ható ligandok hatékonyságát vizsgálták meg a neuropathiás, gyulladásos és akut fájdalom állatkísérletes modelljeiben. Kimutatták, hogy a P2X7, P2X1 és P2Y12 receptorok antagonistái, valamint a P2Y1 receptoron ható agonisták potens fájdalomcsillapító hatással rendelkeznek neuropathiás fájdalomban és gyulladásos fájdalomban, a P2Y12 receptor antagonistá MRS2395-nek emellett akut fájdalomban is számottevő hatása volt.

Hasznosíthatóság: A kapott eredmények alapján felmerül a terápiában trombocita aggregáció gátló szerként már eredményesen használt P2Y12 receptor antagonisták fájdalomcsillapító indikációra történő kiterjesztésének lehetősége.

#### P2X7 receptorok szerepe az agyi citokin termelésben

A depressziós betegekben a citokin szint magasabb illetve a bakteriális endotoxin stimuláció hatására termelődő egyik citokin, az IL-1 $\beta$  az agyban maga is depresszió szerű állapotot idéz elő. P2X7 receptor génkiütött egerekben végzett vizsgálataikban kimutatták, hogy a P2X7 receptorok részt vesznek a szisztémás bakteriális lipopoliszaccharid (LPS) kezelés által indukált IL-1 $\beta$  válasz kiváltásában a hippocampusban és az amigdalában. Megállapították, hogy a hippocampális IL-1 $\beta$  produkció nagyobbik része alapállapotban és LPS kezelést követően is perifériás eredetű, és a citokin válasz kiváltásában részt vevő P2X7 receptorok is a periférián, feltehetően a keringő immunsejteken vannak.

Hasznosíthatóság: P2X7 receptor ligandok fejlesztése depresszióban és hangulatzavarokban.

#### Antiparkinson szerek hatásai oxidatív stresszben mitokondriális gátló (rotenone) előkezelés után

Parkinson kór terápiájában használt gyógyszerek hatásait hasonlították össze az oxidatív stressz által kiváltott kóros DA felszabadulásra és toxikus metabolitjainak szintjére a striatumban, mitokondriális inhibitor (rotenon) előkezelést követően. Az L-DOPA jelentősen fokozta a nyugalmi DA kiáramlást, az oxidatív stressz által kiváltott DA felszabadulást nem befolyásolta, ugyanakkor növelte a toxikus oxidatív metabolit DA-kinon képződését. A D2 dopamin receptor agonista ropinirol ez utóbbi paramétert nem befolyásolta, míg a MAO-B inhibitor L-deprenyl és rasagiline csökkentette a kóros DA kiáramlást, a rasagiline emellett a DA-kinon képződést is meggátolta.

Hasznosíthatóság: A fiziológias és kóros DA felszabadulást szelektíven befolyásoló és a kóros DA metabolitok képződését egyidejűleg gátló szerek fejlesztése egy jövőbeni gyógyszerfejlesztési stratégia lehet a Parkinson kór terápiájára.

#### A(2B) adenosin receptorok az immunitásban és gyulladásban

Kimutatták, hogy az A(2B) receptorok stimulációja limitálja az endothel sejtek gyulladásos válaszait és a permeabilitást, csökkenti a makrofágok aktivációját ezáltal megelőzi a hypoxia és ischemia utáni szövet károsodást.

Hasznosíthatóság: Az A(2B) receptorok farmakológiai célpontok lehetnek az immunrendszeri betegségek és a gyulladás kezelésében.

## *Endokrin neurobiológia kutatások*

Igazolták, hogy a hipotalamusz paraventriculáris magjában (PVN) elhelyezkedő hipofiziotróf TRH idegsejteket egyes típusú kannabinoid receptort tartalmazó axonok idegzik be. Kimutatták, hogy a PVN TRH idegsejtjeit beidegzik az agytörzsi noradrenerg idegsejtek. Leírták a PVN elülső parvocelluláris almagjában és a perifornikális területen elhelyezkedő TRH idegsejtek vetületeit. Kimutatták, hogy a 3. kamra falát bélelő taniciták termelnek TRH-t bontó pyroglutamyl peptidase II és ezáltal részt vesznek a pajzsmirigyműködés centrális szabályozásában.

Jellemezték a Teb4 ubikvitin ligáz pajzsmirigyhormon metabolizmusban játszott szerepét és feltérképezték idegrendszeri expresszióját.

Azonosították a pajzsmirigyhormonok lebomlását katalizáló 3-as típusú dehidrogenáz enzim első in vivo ko-faktorát.

Molekuláris és hisztokémiai vizsgálatokkal igazolták, hogy a glutamát marker, VGLUT1 szelektíven megjelenik az adenohypophysis kortikotróf sejtjeiben faktorát.

Microarray metódikát használó génexpressziós vizsgálatokkal feltárták a prefrontális agykéreg ösztadiol hatására regulálódó génjeit. Az akut ösztadiol adására bekövetkező transzkriptoma változásokat TaqMan vizsgálatokkal is megerősítették. Az ösztrogén regulálta géneket tartalmazó adatbázis megteremtette olyan további kutatások alapjait, melyek célja posztmenopauzális ösztrogén hiány okozta idegrendszeri kórképek keletkezésének megértése. Kimutatták, hogy az I-es típusú kannabinoid receptor (CB1) agonista WIN55,212 csökkentette az akciós áramok és a GABA<sub>A</sub> receptor mediálta mini posztzinaptikus áramok (mPSCk) frekvenciáját a GnRH sejtekben. A CB1 antagonistá AM251 növelte az mPSCk frekvenciáját, jelezvén, hogy a GABA hatása a GnRH neuronokon egy kannabinoidok által közvetített tónikus gátlást szenved. Ezt a növekedést blokkolni lehetett az endokannabinoid 2-AG termelésének intracelluláris gátlásával.

## *Molekuláris neuroendokrinológiai kutatások*

### A stressz és a metabolikus szabályozás kapcsolata

Kimutatták, hogy az orexigén hatású neuropeptid Y (NPY) gén expressziója stresszor-specifikus módon és eltérő génexpressziós szabályozó mechanizmusok részvételével regulálódik a hipotalamuszban. Az NPY hnRNS és mRNS szintje megemelkedik inzulin-indukálta hipoglikémiában és ez negatív korrelációt mutat a plazma glükóz szintjével. Ezzel szemben pszichogén stresszorok hatására az NPY hnRNS szintje csökken röviddel a stresszhatás után, ugyanakkor a mRNS szint nem változik ami a *de novo* transzkripcióval szemben a mRNS stabilitás fokozódását jelzi és a szervezet szintjén összefüggésben van a táplálékfelvétel megszűnésével akut stresszben. A táplálékfelvételt serkentő neuropeptid expresszió a stresszhatás megszűnése után fokozatosan emelkedik, ezzel párhuzamosan nő az állatok táplálékfelvétele, ami segít helyreállítani az energia egyensúlyt. Az anorexigén hatású neuropeptidek gyors génexpressziós változásai ellentétes irányúak, mint az orexigén hatásuaké.

### A morfium függőség és megvonás valamint a stressz-reguláció kapcsolata

Összefüggést mutattak ki a morfium függőség, mint krónikus stressz, a táplálékfelvételi magatartás és a stressz- illetve a metabolikus szabályozásért felelős neuropeptidek expressziója között.

## Neuro-endokrin-immunológiai vizsgálatok

Felderítették, hogy a chemokinek családjába tartozó fraktalkinek fontos szerepet játszanak a stresszel és a metabolizmussal kapcsolatos központi idegrendszeri és perifériás szabályozásban.

Hasznosíthatóság: eredményeik hozzájárulnak az elhízás és a stresszel kapcsolatos betegségek és a drog addikció neurobiológiai hátterének megismeréséhez és megfelelő kezelési stratégiák kidolgozásához, valamint a későbbiekben alapul szolgálnak gyógyszerkérdések fejlesztéséhez.

#### *Molekuláris biológiai és genetikai kutatások*

A fluoreszkáló GABAerg idegsejteket tartalmazó transzgenikus egérmodelljeik segítségével széles nemzetközi együttműködésben folytatták ennek az idegsejt csoportoknak a funkcionális jellemzését és fejlődésük tanulmányozását. Az eredményeiket számos nagy presztízsű folyóiratban közzétették (Cell, Nature Neurosci, Mol Psychiatr, Development, J Neurosci). Többek között először bizonyították, hogy a szaglógumó glutamaterg sejtjei is képződnek a felnőtt idegrendszerben, meghatározták a gerincvelői preszinaptikus GABAerg gátló hálózatok kialakulásának génszintű alapjait és kimutatták azt, hogy a szerotonin is befolyásolja az interneuronok vándorlását.

Továbbá leírták, hogy a CCK tartalmú interneuronokból döntően szinkronizáltan és a célsejttől függetlenül szabadulnak fel a neurotranszmitterek és kimutatták, hogy a szaglóideg végződések fázikus és tónikus preszinaptikus gátlását két intraglomerális hálózat különböző módon szabályozza.

Molekuláris- és sejtbiológiai valamint immunhisztokémiai módszerek ötvözésével differenciálatlan, pluripotens egér embrionális őssejtekben (ES) sikerült RNS és fehérje szinten is kimutatniuk a GABA-t és jelátvitelének molekuláris komponenseit: a GABA szintetizáló enzimeket, számos GABA<sub>A</sub> receptor alegységet, a GABA<sub>B</sub> receptor mindkét alegységét valamint a vezikuláris és membrán GABA transzportereket. Farmakológiai és „Ca-imaging“ vizsgálatokkal először sikerült igazolniuk, hogy mindkét GABA receptor típus aktív az ES sejtekben és aktivációjuk az sejtenbelüli kalcium-szint emelkedést eredményezi, de különböző mechanizmussal. Továbbá azt is kimutatták először az irodalomban, hogy a GABA két receptortípuson keresztül ellentétesen hat az ES sejtek proliferációjára: a GABA<sub>A</sub>R aktivációja gátolja, míg a GABA<sub>B</sub> aktivációja fokozza azt.

Olyan új transzgenikus technológia kidolgozását is megkezdték, amellyel a kolecisztoxinin tartalmú idegsejtek GABAerg-szubpopulációja fluoreszcensen jelölhető.

Folytatták a sejtadhéziós molekulák, ezek közül is 2 cadherin (Cdh2, Cdh13) szerepének tanulmányozását idegrendszer fejlődésében. A funkcionális vizsgálatok felgyorsítása érdekében bevezették a Magyarországon még nem alkalmazott szomatikus géntranszfer-technikát, az in utero elektroporációt, ami a korai migrációs és differenciációs folyamatok vizsgálatát könnyítheti meg. A Cdh13-nak a ventrikuláris zóna osztódó sejtjeiben történő túltermelésével megállapították, hogy ennek a cadherinnek jelentős szerepe van az agykérgi principális sejtek radiális migrációjában és differenciációjában.

#### *Idegi sejt és fejlődésbiológiai kutatások*

Az embrionális neuroektoderma eredetű NE-4C, az emx2 gént „over-expresszáló” NE-4C<sup>Emx2+</sup> és az embrionális agyból klónozott RG1 (radiális glia) sejt vonalak sajátosságainak összehasonlításával megmutatták, hogy őssejt sajátosságokat az idegi szövetfejlődés különböző fejlődési stádiumaiban levő sejtek is hordozhatnak; fejlődhetnek belőlük ideg- asztroglia és oligodendroglia sejtek is. A különböző fejlődési stádiumokból klónozott idegi őssejtek

bioelektromos őssejt sajátosságai mikroelektrofiziológiai vizsgálatokkal bizonyíthatók. A különböző fejlődési állapotokat reprezentáló idegi őssejt-klónok idegsejt irányú differenciálódását eltérő külső hatásokkal lehet megindítani.

A hisztológiai jelzést hordozó idegi őssejtek agyi implantációjával és in vitro vizsgálataival bizonyították, hogy az alacsony O<sub>2</sub> tenzió - sem in vivo, sem in vitro körülmények között - nem károsítja az elkötelezetlen idegi ő/progenitor sejtek túlélését és szaporodását. Az idegsejt irányú differenciálódás azonban hypoxia-s környezetben gátolt. Az agyba beültetett idegi őssejtek idegsejt-képzését hiperbarikus oxigen kezeléssel fokozni lehet.

Megállapították, hogy az idegszövet fejlődésében fontos morfogenetikus szerepet játszó retinsav (az A-vitamin aktív származéka) előállításához és lebontásához szükséges enzim- és tároló fehérje- készlet jelen van az őssejtekben és az agy bármely részéről izolált asztrogliá sejtekben. A retinsav agyszintű morfogenetikus hatásait, a fentiek alapján, az A-vitamin elérhetősége szabályozza.

Szintetikus adhezív peptid-konjugátum (AK-c(RGDfC)) alkalmazásával sikerült radiális glia-típusú őssejteket izolálni posztnatális és fiatal felnőtt egerek előagyából is. A dorzális és ventrális agyterületről izolált – in vivo eltérő sejttypusokat létrehozó - sejtek sajátosságainak összehasonlító elemzése folyamatban van.

Az emx2 (pozicionális) gént „over-expresszáló” NE-4C<sup>Emx2+</sup> idegi őssejtek adhéziós sajátosságai jelentősen különböznek az NE-4C sejtektől; a pozicionális gén hatása a sejtek térbeli elrendeződését, egymással való kapcsolódását alapvetően befolyásolja.

A sejtek adhezív sajátosságainak video-mikroszkópos, optikai szenzor (OWLS) detekciós és biokémiai elemzésével megmutatták, hogy a sejtek letapadását és új felületre való bevándorlását jelentős mennyiségű extracelluláris mátrix molekula (ECM) kibocsátása előzi meg. A szekretált ECM anyag minőségét és mennyiségét a letapadást kínáló felület sajátosságai szabályozzák.

Hasznosíthatóság: A MicroVákuum Kft-vel együttműködve OWLS bioszenzorok fejlesztését végzik. Az NTP BIO\_SURF projekt keretében – az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportjával, Metrimed Kft-vel, Creative Cell Kft-vel együttműködve, biokompatibilis implantátum-felzín kialakításán dolgoznak. A SoftFlow Hungary Kft.-vel közösen mikrogyöngy rendszereket fejlesztenek adhézió alapú sejt-válogatás és izolálás céljára (szabadalom benyújtása folyamatban).

### *Magatartás neurobiológiai kutatások*

#### Az abnormális agresszivitás idegrendszeri hátterének kutatása

Az antiszociális típusú, ún. "hypoarousal" agresszió idegrendszeri mechanizmusainak kutatása során azonosítottak egy olyan vegyületcsaládot, amely ezen agressziótípus kezelésének új klinikai fejlesztési célpontjává válhat. A vegyületcsalád hatékonyságát a "hypoarousal" agresszió csökkentésében magatartásfarmakológiai, immuncitokémiai és neuron-specifikus léziós eljárásokkal egyaránt igazolták.

#### Cannabinoidok magatartási hatásainak vizsgálata

Magatartás farmakológiai, és stressz-élettani eszközökkel igazolták, hogy az endocannabinoidok családjába tartozó anandamid hatása a szorongásra a környezet



averzivitásának függvénye, és az anandamid jelátvitelt fokozó ún. FAAH gátlók elsősorban az averzív környezet által kiváltott szorongást, és nem a szorongás alapszintjét befolyásolják. Feltárták a cannabinoid jelátvitel és a szerotonerg neurotranszmisszió kölcsönhatásának egy új útját, nevezetesen igazolták, hogy a szerotonin 3-as (5-HT<sub>3</sub>) receptorának blokkolása a cannabinoid jelátvitellel összefüggésben csökkenti a szorongást. Ez a lelet, amellett, hogy a cannabinoid rendszer működésének egy új mechanizmusát tárta fel, potenciálisan az új szorongásgátlók fejlesztése szempontjából is fontos információt szolgáltat.

#### A vazopresszin szerepe a stresszválaszban

Azonosították a vazopresszin szerepét a különböző stresszhelyzetekre adott válaszreakciókban. E kutatások során klasszikus endokrinológiai kutatási módszerekkel, és lokális agyi vazopresszin kezelésekkel igazolták, hogy a vazopresszin szerepe stresszor-specifikus, és a stresszválaszok kialakulásának érzékeny periódusában függ az anya-kölyök kölcsönhatástól is. Leírtrák a vazopresszin parakrin jellegű szerepét a hypothalamus paraventriculáris központjában. A feltárt jelenségek alapján hipotézist állítottak fel a vazopresszinnek a depresszióban játszott szerepéről.

#### Növényi szorongásgátló gyógyszer kifejlesztése

A 2008. évben az új, gyógynövény alapú szorongás gátló gyógyszer fejlesztése gyógyszeripari fázisba lépett (a fejlesztés a 2007. évben kezdődött el). A 2009. évben a laboratóriumi fejlesztés szakaszát új adatokkal egészítették ki, és elkezdődött a készítmény humán vizsgálata is.

#### Hasznosíthatóság

A Celluláris és Hálózatneurobiológiai Osztállyal együttműködésben fejlesztett új szorongásgátló gyógyszer az ipari és kereskedelmi hasznosításhoz közeli fázisba került. Amennyiben a 2009-ben elkezdett humán vizsgálatok igazolják a várakozásokat, a gyógynövény alapú gyógyszer 2-3 éven belül kereskedelmi forgalomba kerülhet.

Az abnormális agresszióknak egy új gyógyszer-célpontját azonosították, amely új utat nyithat az ún. "hyoarousal" (antiszociális) agresszió kezelésében.

A cannabinoid rendszernek a szorongásban, és a vazopresszinnek a depresszióban játszott szerepével kapcsolatos kutatásaik hosszabb távon hozzájárulhatnak új gyógymódok kifejlesztéséhez.

### **III. Hazai és nemzetközi kapcsolatok bemutatása**

#### *Hazai kapcsolatok*

Semmelweis Egyetem, ELTE, Pázmány Péter Katolikus Egyetem, Információs Technológiai Kar, Szent István Egyetem, TEVA Magyarország Zrt., Richter Gedeon Nyrt., Chinoin Zrt.

Epilepszia Műtéti Program - OITI, Epilepszia Centrum, MTA Pszichológiai Intézet, SZBK; MBK; SZE Biokémia Intézet; MikroVakuum Kft, MetriMed Kft., SoftFlow Hungary Kft, Creative Cell Kft.; Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ, Gödöllő; MTA Kémiai Kutatóközpont, Bimolekuláris Kémiai Intézet, Neurokémiai Osztály; Szegedi Tudományegyetem

#### *Nemzetközi kapcsolatok*

University College. London; Biozentrum University of Basel, Svájc; Rutgers University, Newark NJ; Université Louis Pasteur, Strasbourg; University College London UK; Université Laval-Robert Giffard, Quebec, Canada; University. College London UK; IRIBHN, Belgium; University of California, Irvine; University of Heidelberg; University of Washington, Seattle; University of California, Los Angeles, USA; Oxford University, UK; NIPS, Okazaki, Japan; MRC ANU, Oxford University, UK; RIKEN Brain Science Institute, Japan; University of Zurich, Switzerland; University of Bonn, Germany; Queen's University, Kingston, Ontario, Canada; University of Hedielsberg Germany; École Normale Supérieure, Paris; Hokkaido University, Japan; University of Valencia, Spain ; Universitätsklinikum Tübingen, Germany; Janelia Farm Research Campus-HHMI, Columbia University, New York, USA; Lab. of Neurobiology, National Inst. Of Environmental Sc., NIH, Dept. of Health and Human Services, USA; Center for Biomolecular Medicine and Pharmacol., Inst. of Pharmacol., Medical Univ. of Vienna, Austria; Sophion Bioscience A/S, Ballerup, Denmark; Inst. of Neurophysiology, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Germany; Rudolf-Boehm-Institute for Pharmacology und Toxicology, University of Leipzig, Germany; Inst. of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria; Campus Erasme, Brussels, Belgium, Institute of Chemical and Engineering Sciences, A\*STAR, Singapore; Université de Toulouse, Toulouse, France; Department of Pharmacological Sciences, University of Milan, Italy; Institut Pasteur, Collège de France, Paris, France; Venetian Institute of Molecular Medicine, Padova, Italy Dept. of Biology; Univ. of Victoria, Victoria, BC, Canada; Tupper Research Institute and Department of Medicine, Division of Endocrinology, Diabetes, Metabolism and Molecular Medicine, New England Medical Center, Boston, MA; Thyroid Section, Division of Endocrinology, Diabetes and Hypertension, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA; Miller School of Medicine, University of Miami, Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism; William Harvey Research Institute, Barts and the London Medical School, London; Department of Anatomy, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan; Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany; King's College London, UK; Dipartimento di Endocrinologia ed Oncologia Molecolare e Clinica, Faculty di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli, Naples, Italy; Department of Translational Neurobiology, NeuroSearch A/S, Denmark School of Medicine, Nagoya City University, Nagoya, Japan; Choju Medical Institute, Fukushima Hospital, Toyohashi, Japan; Department of Neurosciences, University Medical Center, University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland; Department of Anatomy and Neurobiology, Program in Neuroscience, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, USA; Institute for Stem Cell Research, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Neuherberg, Germany; Department of Physiology, Anatomy and Genetics, Oxford University, Oxford, UK; Laboratory of Cellular and Synaptic Neurophysiology, National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, Maryland, USA; Instituto de Neurociencias de Alicante, CSIC & Universidad Miguel Hernández, Sant Joan d'Alacant, Spain; Mammalian Locomotor Laboratory, Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden; Department of Zoology and Physiology, University of Wyoming, Laramie, WY, USA; Howard Hughes Medical Institute, Kavli Institute of Brain Science, Departments of Neuroscience, Biochemistry and Molecular Biophysics, Columbia University, New York, NY, USA; Institute of Experimental Endocrinology, Laboratory of Functional Neuromorphology (Slovak Academy of Sciences); National Institutes of Health, Biomedical Research Center, Baltimore, USA; Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA; Ghent University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Belgium; Dr Harisingh Gour University, Department of Zoology and Biotechnology, Sagar, India; University of Cincinnati, Department of Psychiatry, USA; Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of

Sciences, St Petersburg, Russia; Otto-von-Guericke-Universität, Institut für Biochemie und Zellbiologie Magdeburg, Germany; Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany; Groningen Univ., Hollandia; Cranfield Univ., Dept. of Material Sci., U.K.; Inst. of Nanosturctures, CNR, Bologna Italy; Université de la Méditerranée, CNRS, France; División de Neurociencias Universidad Pablo de Olavide, Spain; ETH, Zürich, Switzerland; University College Dublin, Ireland; CSIR, Johannesburg, South-Africa; Ludwig Maximillian Univ. Munich, Germany; Dept. Molecular Biol., University of Salzburg, Austria

#### **IV. Fontosabb elnyert hazai és nemzetközi pályázatok rövid értékelése**

A KOKI alap kutatásait és fejlesztő kutatásait a költségvetési forráson túlmenően OTKA, EüM-ETT, NKTH, TÉT Alapítvány illetve EU-s, brit, francia és amerikai pályázati forrásokból, valamint hazai és külföldi vállalkezési megbízások keretében végezte.

Az év során öt EU FP6 és egy FP7 szerződés, egy European Young Investigator Award szerződés a European Science Foundation-tól, továbbá négy Wellcome Trust támogatási szerződés keretében végzett kutatási projektünk folyt.

A külföldi források között szerepelt egy Fogarty ösztöndíj, öt NIH (USA) szerződés, egy Howard Hughes Medical Institute grant, illetve egy Institute de Recherche Servier-vel, egy Millipore Corp.-nel, két MERCK Co.-val kötött megbízási szerződés az év során.

Jelentős a gyógyszergyári szerződésekből származó bevétel is (Richter, EGIS). Az e forrásokból származó összegek a kutatás mellett lehetővé teszik a kutatáshoz szükséges infrastruktúra fejlesztését is. A pályázatok követelményeinek függvényében az intézeti kutatócsoportok belső együttműködések alakítanak ki, ami mindig az aktuális feladathoz rendeződik. Az Intézet részt vesz számos olyan pályázatban is, amelyek különféle tudományterületek, valamint a köz- és magánszféra együttműködésének lehetőségeit kívánják kiaknázni az innovációban.

2009-ben három Jedlik Ányos Pályázat és egy Nemzeti Technológiai Program keretében elnyert támogatást vett igénybe az MTA KOKI, kettőben hozzá kapcsolódó „spin-off” cég is támogatást kapott.

#### **V. Az év folyamán megjelent jelentősebb publikációk, szabadalmak**

1. Betley JN, Wright CV, Kawaguchi Y, Erdelyi F, Szabo G, Jessell TM, Kaltschmidt JA  
Stringent specificity in the construction of a gabaergic presynaptic inhibitory circuit  
CELL **139**: (1)161-174 (2009)
2. Brill MS, Ninkovic J, Winpenny E, Hodge RD, Ozen I, Yang R, Lepier A, Gascon S,  
Erdelyi F, Szabo G, Parras C, Guillemot F, Frotscher M, Berninger B, Hevner RF,  
Raineteau O, Gotz M  
Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons  
NAT NEUROSCI **12**: (12)1524-1533 (2009)
3. Deli L, Wittmann G, Kallo I, Lechan RM, Watanabe M, Liposits Z, Fekete C  
Type 1 cannabinoid receptor (CB1)-containing axons innervate hypophysiotropic  
thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons  
ENDOCRINOLOGY **150**: (1) 98-103 (2009)

4. Fekete A, Franklin L, Ikemoto T, Rozsa B, Lendvai B, Sylvester Vizi E, Zelles T  
Mechanism of the persistent sodium current activator veratridine-evoked ca elevation:  
implication for epilepsy.  
J NEUROCHEM **111**: ( )745-756 (2009)
5. Hádinger N, Varga\* BV, Berzsenyi S, Környei Z, Madarász E, Herberth B  
Astroglia genesis in vitro: distinct effects of retinoic acid in different phases of neural  
stem cell differentiaion  
INT J DEV NEUROSCI **27**: (4)365-375 (2009)
6. Haller J, Barna I, Barsvari B, Gyimesi Pelczer K, Yasar S, Panlilio LV, Goldberg S  
Interactions between environmental aversiveness and the anxiolytic effects of enhanced  
cannabinoid signaling by FAAH inhibition in rats  
PSYCHOPHARMACOLOGY **204**: (4)607-616 (2009)
7. Hasko G, Csoka B, Nemeth ZH, Vizi ES, Pacher P  
A(2B) adenosine receptors in immunity and inflammation  
TRENDS IMMUNOL **30**: (6)263-270 (2009)
8. Kiraly M, Porcsalmy B, Pataki A, Kadar K, Jelítai M, Molnar B, Hermann P, Gera I,  
Grimm WD, Ganss B, Zsembery A, Varga G  
Simultaneous pkc and camp activation induces differentiation of human dental pulp  
stem cells into functionally active neurons  
NEUROCHEM INT **55**: (5)323-332 (2009)
9. Madarász E  
Sejt- és szövettenyésztés: módszertani alapismeretek  
In: Szabó G (szerk.)  
Sejtbiológia.  
Budapest: Medicina Könyvkiadó, 2009. pp  
2. bővített kiadás
10. Nunez C, Foldes A, Perez-Flores D, Garcia-Borron JC, Laorden ML, Kovacs KJ,  
Milanes MV  
Elevated glucocorticoid levels are responsible for induction of tyrosine hydroxylase  
mrna expression, phosphorylation, and enzyme activity in the nucleus of the solitary  
tract during morphine withdrawal  
ENDOCRINOLOGY **150**: (7)3118-3127 (2009)
11. Pernia-Andrade AJ, Kato A, Witschi R, Nyilas R, Katona I, Freund TF, Watanabe M,  
Filitz J, Koppert W, Schuttler J, Ji G, Neugebauer V, Marsicano G, Lutz B, Vanegas H,  
Zeilhofer HU  
Spinal endocannabinoids and cb1 receptors mediate c-fiber-induced heterosynaptic  
pain sensitization  
SCIENCE **325**: (5941)760-764 (2009)
12. Sperlagh B, Windisch K, Ando RD, Sylvester Vizi E  
Neurochemical evidence that stimulation of cb1 cannabinoid receptors on gabaergic  
nerve terminals activates the dopaminergic reward system by increasing dopamine  
release in the rat nucleus accumbens  
NEUROCHEM INT **54**: (7)452-457 (2009)

13. Szekacs A, Adanyi N, Szekacs I, Majer-Baranyi K, Szendro I  
Optical waveguide light-mode spectroscopy immunosensors for environmental monitoring  
APPL OPTICS **48**: (4)151-158 (2009)
14. Varga B, Marko K, Hadinger N, Jelitai M, Demeter K, Tihanyi K, Vas A, Madarasz E  
Translocator protein (tspo 18kda) is expressed by neural stem and neuronal precursor cells  
NEUROSCI LETT **462**: (3)257-262 (2009)
15. Varga V, Losonczy A, Zemelman BV, Borhegyi Z, Nyiri G, Domonkos A, Hangya B, Holderith N, Magee JC, Freund TF  
Fast synaptic subcortical control of hippocampal circuits  
SCIENCE **326**: (5951)449-453 (2009)
16. Varju P, Chang KC, Hrabovszky E, Merchenthaler I, Liposits Z  
Temporal profile of estrogen-dependent gene expression in LHRH-producing GT1-7 cells  
NEUROCHEM INT **54**: (2)119-134 (2009)
17. Watt AJ, Cuntz H, Mori M, Nusser Z, Sjöstrom PJ, Hausser M  
Traveling waves in developing cerebellar cortex mediated by asymmetrical Purkinje cell connectivity  
NAT NEUROSCI **12**: (4)463-473 (2009)
18. Wittmann G, Fuzesi T, Singru PS, Liposits Z, Lechan RM, Fekete C  
Efferent projections of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons residing in the anterior parvocellular subdivision of the hypothalamic paraventricular nucleus  
J COMP NEUROL **515**: (3)313-330 (2009)
19. Zavacki AM, Arrojo E Drigo R, Freitas BC, Chung M, Harney JW, Egri P, Wittmann G, Fekete C, Gereben B, Bianco AC  
The E3 ubiquitin ligase TEB4 mediates the degradation of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2)  
MOL CELL BIOL **29**: (19)5339-5347 (2009)
20. Zelena D, Langaese K, Domokos A, Pinter O, Landgraf R, Makara GB, Engelmann M  
Vasopressin administration into the paraventricular nucleus normalizes plasma oxytocin and corticosterone levels in brattleboro rats  
ENDOCRINOLOGY **150**: (6)2791-2798 (2009)

Szabadalmak:

1. US patent: Use of R (+) -N-propargyl-1-aminoindan to treat or prevent hearing loss, Pub Number: 20090076160, App Number: 12283946
2. Laser Scanning Microscope for Scanning Along a 3DTrajectory (2009)  
Vizi E, Szilveszter, Katona Gergely, Rozsa J Balazs  
EP2146234, WO2009HU00057, HU20080000433

3. Method and measuring system for scanning a region of interest (2009)

Rozsa Balazs, Katona Gergely, Vizi E. Szilveszter

P0800690, P0800782, PCT/HU2009/00095

4. Focusing system comprising acousto-optic deflectors for focusing an electromagnetic beam

(2009) Maak Pal, Rozsa Balazs, Katona Gergely, Vizi E. Szilveszter., Mate Veress, Attila

Csakanyi, Gergely Szalay

P0800781, PCT/HU2009/00112

5. Method and Measuring System for Scanning Multiple Regions of Interest (2009)

Rozsa Balazs, Katona Gergely, Vizi E. Szilveszter , Attila Kaszas, Gergely Turi

P0800688, E08462011, PCT/HU2009/000094

6. Laser scanning microscope (2009)

Rozsa Balazs, Katona Gergely, Vizi E. Szilveszter

P0800686, E08462010, PCT/HU2009/000096

7. Preparation and use of 7-nitroindoline and 5,7-dinitroindoline salts (2009)

Péter Viski, Gergely Katona, Balázs Rózsa, Csilla Lukácsné, Attila Potor, Szilveszter E

Vizi., Dorina Gundisch

P0900647