

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola
Szabályozásbiológia Doktori Program

PACAP-szerű és CAPA peptidek expressziója és lehetséges funkciói

***Eisenia fetida* kifejlett egyedeiben és embrióiban**

PhD értekezés tézisei

Boros Ákos

Témavezetők:
Dr. Molnár László
Dr. Pollák Edit



PÉCS, 2010.

Bevezetés

Neuropeptidek csoportosítása, elterjedése, vizsgálata gerinctelenekben

A neurotranszmitter, neuromodulátor és neurohormon funkciójú neuropeptidek, mint szignálmolekulák gyakran pleiotróp funkciójúak a különböző állati szervezetben. A neuropeptid-családok egyes rokon tagjaira eltérő aminosav-szekvencia konzerváció és filogenetikai elterjedés jellemző. Egyes, konzervatívnak mutakozó peptideket (oxitocin/vazopresszin-rokon peptidek, FMRFamid-rokon fehérjék) ezért számos, filogenetikailag egymástól távoli gerinces és gerinctelen fajokból sikerült kimutatni. A gerinctelen neuropeptidek eddig azonosított receptorai a G-protein kötött receptorok (GPKR) közé tartoznak, amelyek a gerinces GPKR-hoz hasonló tulajdonságúak. Az immunhisztokémiai módszerek megjelenése a neuropeptidek azonosítását, eloszlásuk feltárását és funkciójuk megismerését is elősegítette.

Számos gerinces neuropeptid (pl. a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP; FMRFamid-rokon fehérjék, oxiocin-rokon fehérjék) expresszióját vizsgálták gerinctelen modellállatokban, amelyek közül több kimutatható volt a trágyagiliszta (*Eisenia fetida*) központi idegrendszeréből is. Ezek közül néhánynak később aminosav-szekvenciáját is sikerült meghatározni. A fehérjék tisztításában és szekvencia meghatározásában elért jelentős technikai előrehaladás ellenére napjainkig viszonylag kevés neuropeptid szekvenciáját sikerült eddig azonosítani Annelidákban.

Kísérleteinkben konzervatív neuropeptidek (PACAP, CAPA peptidek) előfordulását vizsgáltunk egy *Oligochaeta* gyűrűsféreg fajban, a trágyagilisztában, amelynek testfelépítése, idegrendszere és embrionális fejlődése is ismert és alaposan tanulmányozott. Egyszerű szerveződési fokú idegrendszere és könnyen izolálható embriói miatt is fontos modellállata a neuroanatómiai és fejlődésbiológiai kutatásoknak.

A PACAP és specifikus receptora (PAC1R) gerinces és gerinctelen fajokban

A PACAP két izoformáját (PACAP38, PACAP27) birka hypothalamusz kivonatából izolálták. Kifejlett gerinces egyedekben kimutatott széleskörű, több szervet érintő jelenléte mellett fontos pleiotróp funkciójú fejlődésszabályozó faktor a gerincesek embrionális fejlődése során. A PACAP-szerű és a PAC1R-szerű peptidek expresszióját több gerinctelen fajban (pl. *Drosophila melanogaster*, *Helix pomatia*, *Lymnea stagnalis*,) így az oligochaeta gyűrűsféregekben is (*Lumbricus polyphemus*) kimutatták. Jelenlétüket a központi és a perifériás idegrendszer mellett egyes nem neuronális sejtekben (puhatestűekben hemolimfa-lakunák falában, nyálmirigyben és a hemolimfában) egyaránt igazolták. A pleiotróp funkciójú PACAP izoformák expresszióját immunhisztokémiai és bioassay módszerekkel bizonyították

gyűrűsférgekben, de hatásmechanizmusuk háttere, illetve embrionális expressziója és lehetséges funkciói ismeretlen maradtak.

CAPA peptidek expressziója, funkciója gerinctelenekben

Vizsgálataink kiterjedtek a főként rovar peptideket magába foglaló CAPA peptidekre is, amelyeket szekvencia-homológia alapján két csoportba, periviscerokininek (PVK) és pirokininek (PK) közé sorolhatók. A két csoportra konzervatív C-terminális aminosav-motívumok (PVK: PRVamid, PK: FXPRLamid) jellemzők. Rovarokban ezeket a peptideket főleg neuroszekréciós sejtek termelik és neurohormonális funkcióval rendelkeznek, emellett azonban kimutatták a jelenlétüket a központi idegrendszer egyes interneuronjaiban is. Eddigi ismereteink szerint a peptidcsoport tagjainak szekvenciáit még nem azonosították és jelenlétüket sem vizsgálták az ízeltlábúakkal filogenetikai kapcsolatban lévő gyűrűsférgekben.

Célkitűzések

A PACAP és specifikus receptora (PAC1R) lehetséges funkcióinak feltárásához szükségesnek tartottuk

1. a gyűrűsférgekben expresszáldó, PACAP-pal és PAC1R-ral feltehetően rokon peptidek háromdimenziós mintázatának meghatározását fejlődő és kifejlett *E. fetida* egyedek központi idegrendszerében;
2. a PAC1R-szerű peptid ultrastrukturális lokalizációjának és molekuláris tulajdonságainak elemzését; továbbá
3. a PACAP-szerű peptid(ek) jelenlétének és koncentráció-változásának vizsgálatát embriókban, kokonfolyadékban illetve a kifejlett állatok reprodukciós folyamataiban szerepet játszó szöveteiben.

A tipikusan rovarokra jellemző CAPA peptidek vizsgálata során arra kívántunk választ kapni, hogy

1. a CAPA peptidek vagy hozzájuk hasonló szerkezetű molekulák expresszáldódnak-e az ízeltlábúakkal filogenetikai kapcsolatban álló gyűrűsférgekben;
2. milyen aminosav-szekvencia jellemző az expresszáldó peptidekre; továbbá
3. milyen a peptideket expresszáldó neuronok mintázata a fejlődő és kifejlett egyedek központi idegrendszerben és perifériás szöveteiben; továbbá
4. mi jellemző a PVK/PK rokon peptidek ultrastrukturális lokalizációjára a kifejlett egyedek központi idegrendszerében?

Anyagok és módszerek

Vizsgálatainkhoz a trágyagiliszta (*Eisenia fetida* Sav. Annelida, Oligochaeta) kifejlett egyedeit és embrióit használtuk fel. A kísérleteinkben felhasznált embriókat morfológiai bélyegeik (szik mennyisége, szelvények záródása, és a véredények megjelenése) alapján 5 csoportba (E0-E4) soroltuk. Egyes kísérleteinkben BALB/c egerek (*Mus musculus*) egyes szerveit és szöveteit gerinces kontrollként alkalmaztunk.

Immunhisztokémiai és immunelektronmikroszkópos vizsgálatok

A kifejlett trágyagiliszták kiboncolt hasdúc-lánc-darabjait és az embriókat a kimutatni kívánt antigén igényeinek megfelelő, pufferolt rögzítő oldatokban, azaz 4%-os paraformaldehidben, 0,25% glutáraldehidet tartalmazó 4%-os paraformaldehidben vagy Boer-oldatban fixáltuk.

Pre-embedding immunhisztokémia

A fixálást és mosást követően a szövetszemcséket az elsődleges antiszérumban inkubáltuk (anti-PACAP27, anti-PAC1R, anti-Pea-PVK II). A jelölt struktúrákat kétféle immunjelölési technikával tettük láthatóvá. A minták egy részét fluoreszcens-festékkel konjugált másodlagos ellenanyaggal kezeltük és konfokális, illetve fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A többi mintát avidin-biotin-peroxidáz komplex (ExtrAvidin kit) segítségével és 3,3'-diaminobenzidin (DAB) oldattal tettük láthatóvá.

Poszt-embedding immunhisztokémiai vizsgálatra szánt minták kezelése

A PAC1R fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatához a mintákat víztelenítés után paraffinba illetve epoxi-gyantába ágyaztuk be. A metszetekre anti-PAC1R illetve anti-Pea-PVK II antiszérumban vittünk fel. Az immunreakciókat ExtrAvidin kittel fejeztük be, és a jelölt struktúrákat DAB oldattal tettük láthatóvá. Az ultravékony metszeteket anti-PAC1R vagy anti-Pea PVK II szérumban cseppjére helyeztük, majd mosást követően a grideket 18 nm-es aranyszemcsé-konjugált anti-nyúl IgG szérumban tartalmazó oldatban inkubáltuk. Ezután desztillált vízzel mostuk, majd kontrasztosítottuk.

Biokémiai vizsgálatok

PACAP mennyiségi meghatározása Radioimmunoassay (RIA) módszerrel

A vizsgálatra szánt szövetmintákat homogenizáltuk, centrifugáltuk, és a felülúszókat használtuk a PACAP mennyiségi meghatározásához. A 0,05M-os foszfát puffert tartalmazó

polipropilén csőhöz hozzámértünk 100 µl kihígított antiszérumot (anti-PACAP), 100µl RIA tracers (jó radioaktív izotópjával jelölt PACAP fragmens) és 100-100µl-t a standard hígítási sor elemeiből (szintetikus PACAP38 ismert koncentrációban) vagy az ismeretlen mintákat. Inkubációt követően az antitesthez kötött peptid komplexet elválasztottuk a szabad antitestektől. A precipitátum radioaktivitását gamma-számlálóval megmértük.

A kokonfolyadék szemi-kvantitatív fehérje-analízise dot blot módszerrel

A kigyűjtött kokonfolyadékot homogenizáltuk, centrifugáltuk, majd a felülúszókból származó mintákat polivinilidindifluorid membránra szárítottuk, ezután blokkoló oldatban inkubáltuk. Az elsődleges, anti-PACAP antitestel történő inkubáció után, mosó pufferben mostuk. A membránokat ezután a másodlagos antitestet (infravörös festék konjugált IgG) tartalmazó oldatba helyeztük át, és mosás után az infravörös fény-intenzitását infravörös olvasóval mértük le.

Western blot, immunprecipitációs western blot, far western blot

Western blot (WB) kísérleteinkhez a különböző szövetekből készült homogenizátumok centrifugálás utáni felülúszóját használtuk fel. A PAC1R-szerű peptidok immunprecipitációjához (IP) a felülúszókat protein-G-Sepharose gyöngyökhöz kötött anti-PAC1R antiszérum felhasználásával affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A lecentrifugált szövet homogenizátumokhoz (konvencionális-WB, far-WB) és a PAC1R- IP után kapott mintákhoz 2x Laemmli-puffert mértünk, majd melegítettük. A nátrium-dodecilszulfát tartalmú, 10%-os poliakrilamid gélben történő elektroforézis után az elválasztott fehérjéket átvittük nitrocellulóz membránra. A far-WB kísérleteinkben a nitrocellulóz lapokra átvitt fehérjéket szintetikus PACAP38-at tartalmazó oldatban inkubáltuk. Mosás után a lapokat anti-PACAP antitest tartalmú oldatban úsztattuk. A WB és IP-WB membránokat anti-PAC1R antitest oldatában inkubáltuk. Mindhárom WB technikával kapott membránokon tormaperoxidáz-enzim konjugált IgG-t alkalmaztunk másodlagos antitestként. A jelölt sávok láthatóvá tételéhez ECL (enhanced chemiluminescent) reagenst és fényérzékeny röntgen-filmet használtunk.

CAPA peptidok tisztítása, tömegspektrometriai mérések

E. fetida lecentrifugált szövetkivonatát IDM protein-A gyöngyökhöz kötött Pea-PVK II antiszérum felhasználásával affinitás kromatográfiával tisztítottuk. Az antitesthez kötött peptidokat 50%-os (v/v%) acetonitril -0,5% trifluoroecetsav oldatával eluáltuk, majd tömegspektrométerrel vizsgáltuk. Az eluált PVK/PK peptidokat online fordított fázisú nanoméretű kapilláris folyadékkromatográfiás módszerrel tisztítottuk, az így kapott frakciókat electrospray tandem tömegspektrométerrel analizáltuk. A kapott tömegeredményekből kézi *de novo* szekvencia elemzéssel állapítottuk meg a célpeptidok aminosav-szekvenciáit.

Eredmények és megvitatásuk

A PACAP- és PAC1R-szerű peptideket expresszáló neuronális struktúrák funkcionális anatómiája kifejlett és fejlődő állatokban

A kifejlett állatok hasdúcláncában a PACAP- és PAC1R-IR neuronokat anatómiai pozíciójuk és nyúlványaik lefutása alapján kisméretű interneuronként azonosítottuk. Leírtunk két interganglionáris rostköteget, amelyeket anatómiai pozíciójuk alapján interneuronális és szenzoros rostkötegenként azonosítottunk. A varikózus PACAP IR rostok szorosan az interneuronális PAC1R-IR rostok mellett futottak, továbbá PACAP-tartalmú vezikulákat azonosítottunk számos szinapszisban, ami alapján feltételezhetjük, hogy a PACAP(-szerű peptid) az interneuronális rendszerben betöltött neuromodulátorként és transzmitterként is kifejtheti hatását.

PAC1R-IR szenzoros rostok a 3. szegmentális idegekben is nagy számban fordultak elő, és ipszilaterálisan a ventrolaterális, a ventromediális, vagy az intermedio-mediális hosszanti axonkötegekbe léptek be. A 3. szegmentális idegek, valamint a két hosszanti szenzoros axonköteg (ventrolaterális és az intermedio-mediális) PACAP-IR rostokat is tartalmaztak, ami arra utal, hogy a PACAP(-szerű peptid) neuromodulátorként funkcionálhat a szenzoros rendszer perifériás és centrális részén egyaránt.

PAC1R-IR neuronokat találtunk a második és a harmadik szegmentális ideg kilépési helyének közelében, amelyek anatómiai pozíciójuk alapján kis motoneuronok, illetve centrális szenzoros neuronok lehetnek. A PACAP-IR neuronok egy részét morfológiai tulajdonságaik és anatómiai elhelyezkedésük alapján neuroszekrécións sejtként azonosítottuk.

A központi idegrendszerben immunhisztokémiai módszerrel kimutatható PACAP- IR neuronokat csak a közvetlen kikelés előtt álló (E4) embriókban találtunk, míg az első PAC1R-szerű fehérjét expresszáló struktúrák már az embrionális fejlődés első szakaszában (E1) megjelentek az embriók központi és perifériás idegrendszerében is. A központi idegrendszerben gangliononként néhány PAC1R immunpozitív sejtet és antero-poszterior irányban lefutó poliszegmentális rostrendszert találtunk. A szegmentális idegek egyik fejlődési stádiumban sem tartalmaztak PACAP-, illetve PAC1R-IR rostokat, ami az embrionális idegrendszer jelölt sejtjeinek interneuronális jellegét valószínűsíti.

A kikelt és kifejlett egyedek központi idegrendszerének eltérő PACAP/PAC1R-IR mintázata arra utal, hogy a peptid - specifikus receptor rendszer posztembrionális fejlődése jelentős mértékű.

Fénymikroszkópos vizsgálatokkal gömb alakú, látható nyúlvány nélküli PACAP-IR és PAC1R-IR sejteket azonosítottunk az E1 fejlődési stádiumú embriók testfalában, ami a PACAP(-szerű peptid) perifériás felszabadulására és parakrin hatására utal. Későbbi fejlődési állapotban (E3, E4), a testfalban a nyúlvány nélküli PAC1R-IR sejtek helyén henger alakú nyúlványos, primér érzékhámsejteket találtunk, ami PACAP(-szerű peptid) primer érzékhámsejtek differenciálódásában betöltött szerepét valószínűsíti. Egy a PACAP-IR rostok által létrehozott plexust is azonosítottunk a formálódó szájnyílás szubepidermális szöveteiben, melyből a PACAP(-szerű peptid) más gerinctelen szervezetekben leírtakhoz hasonló, a kemoszenzoros információ feldolgozásában betöltött szerepére következtethetünk.

A PAC1 receptor ultrastrukturális lokalizációja fejlődő és kifejlett egyedekben

Ultrastrukturális vizsgálataink szerint mind a kifejlett mind a fejlődő egyedek központi idegrendszeri neuronjaiban a PAC1R a durva felszínű endoplazmatikus retikulum (DER) ciszternáiban, és különböző méretű és denzitású vezikulákban, illetve a plazmamembránban lokalizálódik. Ezek alapján feltételezhető, hogy a PAC1R-szerű peptid a DER ciszternáin szintetizálódik és a vezikuláris transzport útján szállítódik a plazmamembránhoz.

Számos szinapszisban találtunk PAC1R immunpozitivitást. Erősen jelölődtek a szimmetrikus szinapszisok pre-, és posztszinaptikus membránjai, ami arra utal, hogy a PACAP(-szerű peptid) neurotransmitter illetve modulátor funkciójú bioaktív anyag az *E. fetida* központi idegrendszerében. Plazmamembránhoz kötött PAC1R immunreaktivitást a csak a kisméretű, sötét citoplazmájú, vélhetően szenzoros neuronok nyúlványain találtunk. Kifejlett állatokban az extraszinaptikus szubmembrán ciszternák is immunpozitivitást mutattak, ami a PACAP extraszinaptikus felszabadulására utal, azaz a PACAP más peptidekhez hasonlóan neuromodulátorként is funkcionálhat gyűrűsférgék központi idegrendszerében.

Mivel a központi idegrendszer kisméretű vérereinek endothelje is PAC1R-IR volt, valószínű, hogy a PACAP a véreozslás szabályozásában is szerepet játszhat.

A PACAP és a PAC1R kvantitatív és szemikvantitatív meghatározása

Radioimmunoassay-vel (RIA) kimutattuk, hogy az expresszáldó PACAP(-szerű peptid) koncentrációja közel azonos az embriók E1 és E3 fejlődési stádiuma között, de a kikelést közvetlenül megelőző stádiumban (E4) szignifikáns, hozzávetőlegesen háromszoros koncentrációemelkedés mérhető.

A dot blot vizsgálatokkal PACAP-IR vegyületek jelenlétét mutattunk ki a zigótákat (E0) körülvevő kokonfolyadékban (albumen), amelyben a PACAP koncentrációja folyamatos csökkent a kikelést megelőző (E4) fejlődési stádiumig. RIA vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy

testfal szöveteiben is megtalálható a PACAP(-szerű peptid) amely a legnagyobb mennyiségben az ivarérett egyedek kokon albumen termelő szervében (nyereg) fordult elő. Mindezekből arra következtethetünk, hogy a kokonban megjelenő PACAP(-szerű peptid) a nyeregből származhat és a PACAP(-szerű peptid) a gerincesekben leírt folyamatokhoz hasonlóan, szerepet játszhat az *E. fetida* reprodukciós folyamataiban, illetve az embriogenezisében.

A vérben a PACAP(-szerű peptid) koncentrációja közel tízszerese volt a hasdúcláncban mért értéknek. A PACAP(-szerű peptid) feltételezésünk szerint a hasdúclánc 3. szegmentális idegyökerénél elhelyezkedő PACAP-IR, neuroszekrécións sejtenként azonosított neuronokból származik. A vérben mért magas koncentráció, és a PAC1R(-szerű peptid) endotheliális lokalizációja a PACAP neurohormon szerepére és vazóaktív funkciójára utalhatnak.

A felnőtt állatok központi idegrendszeréből és a különböző fejlődési stádiumba tartozó embriókból WB és IP-WB technikákkal kimutatott PAC1R-szerű fehérje molekulatömege 50 kDa körüli volt. Far WB kísérletekkel kimutattuk, hogy a szintetikus előállított PACAP38-at kötő molekula szintén 50 kDa tömegű.

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy az *E. fetida* teljes életciklusa alatt expresszálódik egy PAC1R immunreaktív, az *in vitro* előállított PACAP-hoz is kötődő peptid, amely a PAC1R egy új, eddig még nem azonosított alternatív hasítási terméke lehet. Jól ismert, hogy a gerincesekben is változó a PAC1R mérete, és tömege az eddig azonosított 5 különböző splice-variánsban jelentős mértékű különbséget mutatott.

Kísérleteink eredményeink szerint a PACAP(-szerű peptid) pleiotróp funkciójú az *E. fetidában*, mind fejlődésszabályozó, mind neurotranszmitter és neuromodulátor hatása valószínűsíthető a fejlődő és a kifejlett állatokban.

Az *E. fetida* PVK/PK rokon neuropeptidjeinek azonosítása és szekvencia-elemzése

Immunprecipitációt követő tömegspektrometriai mérési módszerrel hat eddig még nem azonosított neuropeptidet (SPFPRI/La, APFPRI/La, SPLPRI/La, SFVRI/La, AFVRI/La, SPAFVRI/La) izoláltunk az *E. fetida* központi idegrendszeréből, amelyeket C-terminálisuk konzerválódott aminosavai alapján XRI/Lamidoknak neveztünk el. Az izolált peptidek C-terminális szekvenciái hasonlóságot mutatnak az eddig azonosított periviscerokininekkal és pirokininekkal, ami az izolált peptidjeink ősi jellegére utalnak.

Az XRI/Lamid rendszer jellemzése kifejlett *E. fetida* a hasdúcláncban

Az IR perikaryonok gangliononkénti száma 112 és 124 között változott, nem mutatkozott a sejtszámban szignifikáns eltérés a tanulmányozott hasdúclánc-szakaszokban. Változatos méretű, morfológiájú és nyúlványlefutású IR sejtek főleg a ganglionok hátsó 2/3-ában

helyezkedtek el. A legtöbb jelölt rost a neuropilben futó longitudinális, interganglionáris rostköteg formálásában vett részt. A számos ipszilaterális nyúlvány mellett néhány kereszteződő rostot is találtunk, amelyek az első szegmentális ideg felől a harmadik szegmentális idegyökér felé haladtak. Mindhárom szegmentális ideg tartalmazott IR rostokat. Az immunpozitív sejtek és a rostok jelentős része nyúlványlefutásuk és anatómiai pozíciójuk alapján a központ interneuronális, illetve motoros rendszeréhez tartozhatnak. Morfológiai jellegzetességeik és a vezikulák mérete alapján 6 különböző idegsejt típust azonosítottunk a hasdúclánc ganglionjaiban. A 3. szegmentális idegyökereknél található, látható nyúlvány nélküli IR sejteket ultrastrukturális tulajdonságaik alapján neuroszekrécións sejtekként azonosítottuk.

Az XRI/Lamid IR elemek eloszlása az *E. fetida* embrionális fejlődése során

A központi idegrendszerben XRI/Lamid-szerű fehérjét expresszáló struktúrák antero-posterior irányú fejlődése, az IR sejtszám folyamatos növekedése, és az interganglionáris rostrendszer differenciálódása volt jellemző. A megjelenő IR sejtek legtöbbje nyúlványaik lefutása alapján poliszegmentális, illetve lokális interneuron lehet, amelyeket a későbbi fejlődési stádiumokban is ki lehet mutatni, ami az adott sejtek állandó peptid-profiljára utal. A 3. szegmentális idegek gyökereinél megjelenő sejtek a neuroszekrécións sejtek lehetnek.

Az embrionális testfal XRI/Lamid-szerű fehérjét expresszáló rendszere egy permanens és egy átmenetileg jelen lévő, kikeléskor már nem kimutatható (tranziens) részre osztható. A két rendszer fejlődése párhuzamosan, de térben eltolva, eltérő mintázatot alkotva zajlik.

A tranziens rendszer immunpozitív uni- és bipoláris neuronjai vékony, a szenzoros sejtekre jellemző apikális dentrit-szerű nyúlvánnyal rendelkeztek. Ezek először az E1-es stádiumú embriók testvégén jelentek meg, nyúlványaik egy része belenőtt a fejlődő hasdúcláncba.

A permanens rendszer jelölt perifériás sejtjei először az E2-stádiumú embriók elülső testfalában jelentek meg. A rendszer tipikus eleme a minden testszelvényben előforduló bipoláris sejt pár, amelynek nyúlványai nem léptek be a kontalaterális ganglionfélbe, ezért feltételezhetjük, hogy ezek a sejtek perifériás érzékszettek lehetnek.

Elsőként azonosítottuk az embrionális bőrizomtömlőben megjelenő, jelölt rostokból álló négyzethálós rendszert, amelynek rostjai mindhárom szegmentális idegben illetve a sertetokok körül is megjelentek. A rostrendszerben valószínűleg megtalálhatók a sertetokok elmozdulását érzékelő, mechanoreceptor funkcióval rendelkező szabad idegvégződéses és/vagy a sertemozgató izmok kontrakcióját kiváltó mozgatórostok. Az általunk leírthoz hasonló perifériás struktúrát sem oligochaetákban, sem hirudinoidákban, sem polychaetákban nem mutattak ki. Szerkezetének differenciálódása és lehetséges funkcióinak feltárása további vizsgálatokat igényel.

Összefoglalás

A neurotranszmitter, neuromodulátor vagy neurohormon funkciójú neuropeptidok mint szignálmolekulák szerteágazó, gyakran pleiotróp funkciót látnak el mind az embrionális fejlődés alatt mind a kifejlett állati szervezetben. Jelen dolgozat a kifejlett és fejlődő *Eisenia fetida* egyedekben két konzervatív neuropeptid csoport, a gerinces hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptidet (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP) és a rovar CAPA-peptideket (periviscerokininek és pirokininek) expresszáló struktúrák funkcionális anatómiai szerveződését tárgyalja.

Kimutattuk mind a PACAP-szerű, mind a PAC1 receptor (specifikus PACAP receptor-szerű) peptidok expresszióját a trágyagiliszta teljes életciklusa alatt. Ezek jelenlétét, illetve koncentrációváltozását radioimmunoassay, dot blot, immunhisztokémiai és különböző western blot módszerekkel vizsgáltuk kifejlett állatokban, illetve különböző fejlődési szintű embriókban. A PACAP-szerű peptid a teljes embrionális fejlődés alatt kimutatható volt nemcsak az embriókban, hanem az azokat körülvevő kokonfolyadékban is. Az ivarérett állatoknak a kokonfolyadék termeléséért felelős szerve (nyereg) illetve vérmintái is magas koncentrációban tartalmaztak PACAP-szerű peptidet. Emellett az embriogenezis alatt, és a kifejlett állatokban is kimutatható volt egy 50 kDa tömegű, szintetikus PACAP38-at kötő, PAC1R-szerű peptid jelenléte. Immunhisztokémiai vizsgálataink feltárták a PACAP-szerű, és a PAC1R-szerű peptidok eloszlását a hasdúccláncban és a periférián (bélcsatorna, testfal) fejlődő és kifejlett egyedekben egyaránt. Eredményeink a PACAP-szerű peptidnek gerincesekhez hasonló pleiotróp funkciójú fejlődésszabályozó, illetve későbbi életszakaszokban neurotranszmitter és neurohormon szerepére utalnak.

Immunprecipitációt követő tömegspektrometriai vizsgálatokkal, valamint szekvenciaanalízissel, illetve fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémiai módszerekkel hat új CAPA-peptidekkel rokon neuropeptid expresszióját mutattuk ki kifejlett *E. fetida* hasdúccláncában. Az immunpozitív neuronoknak hat különböző morfológiai típusát sikerült elkülönítenünk a kifejlett hasdúccláncban, ami a CAPA-peptid tartalmú neuronok morfológiai, és valószínűleg funkcióbeli heterogenitására utal. Kimutattuk a CAPA-peptid tartalmú neuronális elemek jelenlétét és folyamatos differenciálódását a trágyagiliszta embrionális fejlődése alatt is. Eredményeink alapján a filogenetikailag konzervatív CAPA-peptidok nemcsak ízeltlábúakban illetve puhatestűekben, hanem gyűrűsférgekben is megjelennek és azok idegi és neuroendokrin szabályozásban játszanak szerepet.

PUBLIKÁCIÓK

1. A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények

Molnár, L., Pollák, E., **Boros, Á.**, Reglődi, D., Tamás, A., Lengvári, I., Arimura A., Lubics, A. (2006): Comparative anatomy of PACAP-immunoreactive structures in the ventral nerve cord ganglia of lumbricid oligochaetes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1070: 427-430.

IF.: 1,971

Molnár, L., Pollák, E., **Boros, Á.**, Shioda, S., Nakajo, S., Tamás, A., Lengvári, I., Reglődi, D., Lubics, A. (2007): PAC1 receptor localization in a model nervous system: light and electron microscopic immunocytochemistry on the earthworm ventral nerve cord ganglia. *Reg. Peptides*, 145: 96-104.

IF: 2,442

Boros, Á., Reglődi, D., Herbert, Zs., Kiszler, G., Németh, J., Lubics, A., Kiss, P., Tamas A., Shioda S., Matsuda, K., Pollák, E., Molnár, L. (2008): Changes in the expression of PACAP-like compounds during the embryonic development of the earthworm *Eisenia fetida*. *J. Mol. Neurosci.* 36:157-165.

IF.: 2,555

Herbert, Zs., Zougman, A., Pollák, E., **Boros, Á.**, Neval, K., Molnár, L. (2009): Identification of novel neuropeptides in the ventral nerve cord ganglia and their targets in an annelid worm, *Eisenia fetida*. *J. Comp. Neurol.* 514: 415-432.

IF.: 3,855

Boros, Á., Somogyi, I., Engelmann, P., Lubics, A., Reglődi, D., Pollák, E., Molnár, L. (2010): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 (PAC1) receptor is expressed during embryonic development of the earthworm. *Cell Tissue Res.* 339: 649–653.

IF.: 2,700

2. A disszertáció témakörében készült konferencia előadások és poszterek

Lubics, A., Pollák E., **Boros, Á.**, Tamás, A., Lengvári, I., Reglődi, D., Molnár, L. (2006): Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor in the nervous system of oligochaeta. 5th Forum of European Neuroscience, 8-12 July, Vienna, Austria. *FENS Abstr.*, vol.3, A187.5, 2006

Reglődi, D., Pollák, E., **Boros, Á.**, Shioda, S., Nakajo, S., Lubics, A., Tamás, A., Lengvári, I., Molnár L. (2006): PAC1 receptor localization in a model nervous system: light and electron microscopic immunocytochemistry on the earthworm ventral nerve cord ganglia.

23rd Conference of European Comparative Endocrinologists (CECE), Manchester, England, Aug 29-Sept 2. Abstract book. pp139, P140.

Lubics, A., Pollák, E., **Boros, Á.**, Tamás, A., Lengvári, I., Reglődi, D., Molnár, L. (2007): Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor in the nervous system of *Oligochaeta*. Neuroptides 2007: Functions, Dysfunctions and Therapeutic options. 19-21 April, Santorini, Greece. Neuroptides. 42: 498-499.

Boros, Á., Kiszler, G., Pollák, E., Reglődi, D., Molnár, L. (2007): PACAP expression during embryonic development of *Eisenia fetida* 8th International Symposium for VIP, PACAP and Related Peptides Sept 3 - 8, Manchester, Vermont (USA). Poster Abstract.

Boros, Á., Molnár L., Pollák E., Herbert Zs. (2008): Embryonic development of a neuropeptidergic system in the earthworm *Eisenia fetida*. International Brain Research Organization workshop 2008. 2008 Jan. 24-26, Debrecen, Hungary.

Lubics, A., **Boros, Á.**, Engelmann, P., Somogyi, I., Herbert, Zs., Reglődi, D., Pollák, E., Molnár, L. (2008): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has an influence on development and differentiation of embryonic tissues of the earthworm *Eisenia fetida*. 24th Conference of European Comparative Endocrinologists (CECE), Genoa, Italy. 2008 sept. 2-6. Abstract book. pp119, P048

Boros, Á., Engelmann, P., Somogyi, I., Lubics, A., Reglődi, D., Pollák, E., Molnár, L. (2009): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) selective receptor (PAC1R) expression during the earthworm embryogenesis. 8th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Germany, March 25-29. Abstract: T5-2A.

Molnár, L., Pollák, E., **Boros, Á.**, Herbert, Zs. (2009): Is the medial neurosecretory brain region of the earthworm the anatomical correlates of the pars intercerebralis? 8th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Germany, March 25-29. Abstract: T22-3A.

3. Egyéb tudományos közlemények:

Somogyi I, Boros A, Engelmann P, Várhalmi E, Németh J, Lubics A, Tamás A, Kiss P, Reglődi D, Pollák E, **Molnár L**, (2009) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like compounds could modulate the activity of coelomocytes in earthworm. Annals of New York Academy of Sciences, 1163: 521–523 **IF.: 1,971**

Boros, Á., Új, M., Pankovics, P., Reuter, G. (2010): Detection and characterization of human parechoviruses in archived cell cultures in Hungary. *J. Clin. Virol.* 47: 379-381.

IF: 3,320

Reuter, G., **Boros, Á.,** Pankovics, P., Egyed, L. (2010): Kobuvirus in domestic sheep, Hungary. *Emerg. Inf. Dis.* 16: 869-870.

IF: 6,794

Reuter G., Pankovics P., **Boros Á.** (2010): Identification of a novel astrovirus in a domestic pig in Hungary. *Arch. Virol.* DOI 10.1007/s00705-010-0827-5.

IF: 1,909

4. Egyéb konferencia szereplések:

Molnár L, Gunszt D, Boros A, Pollák E, Somogyi I, Horváth B, Nemeth J, Reglodi D, Lubics (2009) A The role of the circulatory system in the transportation of PACAP-like compounds in earthworms. 9th Symposium on VIP, PACAP and related peptides. October 5th-8th, 2009, Kagoshima, Japan.

Horváth B, Somogyi I, Gunszt D, Boros A, Pollák E, Németh J, Reglődi D, Lubics A, and **Molnár L** (2009) Brain extirpation stimulate PACAP expression in the central nervous system of the earthworm. Satellite 9th Symposium on VIP, PACAP and related peptides. “Phylogenetic aspects of neuropeptides – from invertebrates to humans” October 2-3, 2009, Yakushima, Japan.

Lubics A, Horváth B, Somogyi I, Gunszt D, Boros A, Pollák E, Németh J, Reglődi D and **Molnár L** (2010) Brain extirpation stimulate PACAP expression in the central nervous system of the earthworm. 25th Conference of European Comparative Endocrinologists, Pécs 2010 31st August-4th September. Abstract: 108.

Reuter, G., Boldizsár, Á., **Boros, Á.,** Pankovics, P. (2010) Kobuviruses and a potential new picornavirus genus in different host species. 4th European Congress of Virology, Como, Italy, 2010. apr. 7-11. Abstract book. pp300, Abstract No.: 202.

Reuter, G., Boldizsár, Á., **Boros, Á.,** Pankovics, P. (2010): Detection and characterization of kobuvirus (in family Picornaviridae) in human and in new host species in Hungary. 20th European Congress of Clinical Microbiology, Wien, Austria, 2010. apr. 10-13. *Clin. Microbiol. Inf.* 16: S133–S634. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03239.x