

A PACAP és receptorának vizsgálata az anyatejben, különböző tejalapú készítményekben, az emlő szövetében és sejttenyészetekben

Doktori (PhD)-értekezés tézisei

Dr. Csanaky Katalin Andrea

Témavezetők: Dr. Reglódi Dóra, egyetemi tanár
Dr. Tamás Andrea, egyetemi docens

Programvezető: Dr. Csernus Valér, egyetemi tanár

Doktori iskola vezetője: Dr. Lénárd László, egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Anatómiai Intézet

Pécs, 2014

BEVEZETÉS

A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) és receptorai

A PACAP egy 38 aminosavból álló C-terminálisán α -amidált peptid, melyet 1989-ben Arimura és munkatársai izoláltak birka hypothalamusból. Nevét hypophysis sejt kultúrán kifejtett adenilát cikláz aktiváló és következményes cyclic adenosine mono-phosphate (cAMP) emelő hatása révén kapta. A szekretin/glükagon/growth hormone releasing hormone (GHRH) peptidcsalád tagja. Szerkezetileg leginkább a vazóaktív intesztinális polipeptidhez (VIP) hasonló. N-terminális struktúrája az evolúció során rendkívül konzervált, bizonyítva a peptid fontos biológiai szerepét. Lebomlása során rövidebb fragmensek keletkeznek, melyek főleg antagonistaként viselkednek, közülük a kísérletes vizsgálatokban leggyakrabban használt forma a PACAP6-38.

A PACAP legnagyobb mennyiségben a hypothalamusban fordul elő, de megtalálható a kéregállomány, a középagy, az agytörzs, az amygdala, a bazális ganglionok, a hippocampus, a tobozmirigy, a kisagy és a híd területében. PACAP-immunreaktív (PACAP-IR) rostok detektálhatók a perifériás idegrendszerben. Az idegrendszeren kívül azonosítható például a petefészek, a méh, a méhlepény, a mellékvese, a mellékpajzsmirigy és az emlő szövetében, valamint a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteinek sejtjeiben.

A PACAP három receptora ismert, így a PAC1, a VPAC1 és a VPAC2. A PACAP receptorok szinte minden emberi szervben expresszálódnak, azonban az altípusok eloszlása szervrendszerenként változó.

Az egészséges szöveteken kívül a PACAP és receptorai kimutathatóak különböző daganatokban is.

A PACAP általános élettani hatásai

A PACAP szerepet játszik számos élettani folyamatban, így például a táplálkozás, a termoreguláció, a cirkadián ritmus és az alvás szabályozásában. Endokrin hatásai is bizonyítottak, így befolyásolja a pajzsmirigyműködést, stimulálja a mellékvese katekolaminszintézisét, valamint a hasnyálmirigy inzulintermelését. Vizsgálataink szempontjából a reprodukcióra, a sejt túlélésre és proliferációra, valamint a differenciációra kifejtett hatásai érdemelnek kiemelt figyelmet.

A PACAP serkenti a hypophysis follikuláris sejtjeinek interleukin (IL)-6 termelését, és ezen keresztül növekedési hormon, prolaktin (PRL), follikulus stimuláló hormon és luteinizáló hormon elválasztását. Fokozza a gonádok strómasejtjeinek szteroidszintézisét, nőben előmozdítja az oogenezist, férfiben a spermiogenezist. Humán kísérletek bizonyítják a PACAP/VIP erekcióban betöltött szerepét. A tubamotilitásra hatva növeli a megtermékenyülés valószínűségét. Terhesség esetén magas a PACAP szint az uteroplacentáris egységben. *In vitro* kísérletek szerint PACAP adásával az uteroplacentáris artériák relaxációja váltható ki, és feltételezhető, hogy ezen keresztül befolyásolhatja annak vérellátását.

Neurális sejtvédő hatását számos *in vitro* és *in vivo* kísérletben vizsgálták. Védelmet nyújt agyi ischaemia, neurodegeneratív betegségek és agyi trauma állatkísérletes modelljében.

Nem sokkal a PACAP felfedezését követően kisagyi szemcse- és agyalapi mirigy adenómasejteken végzett kísérletekkel bizonyították a peptid antiapoptotikus tulajdonságát, amely nem csak neurális, hanem egyéb sejteken is megfigyelhető volt, így T-limfocitákon, preovulációs tüszőn, a tüdő alveoláris sejtjein, kardiomiocitákon, hemangioendotelióma és retinális pigmentsejteken. Hatását az antiapoptotikus fehérjék (Bcl-2, ERK1/2, Akt) expressziójának növelésén, illetve a proapoptotikus faktorok (kaspáz-3, p38 MAPK, JNK, Bad, Bax, HIF-1 α) és számos hősokk fehérje aktivitásának csökkentésén keresztül fejti ki.

Mindezek arra utalnak, hogy a PACAP általában citoprotektív, de tumorsejteken ezzel ellentétes irányú hatásokat is kifejthet, így mielóma és mieloid leukémia sejteken proapoptotikus, inzulinóma, prosztatata- és kólonkarcinoma sejtjein pedig antiapoptotikus.

A PACAP *in vitro* kísérletekben az alkalmazott koncentrációtól függően differenciációt indukálhat. Alacsony, subnanomoláris dózisban sejtproliferációt, magasabb dózisban pedig differenciációt idéz elő. Mindössze néhány példát kiragadva megemlítendő, hogy PACAP adásával asztrocita irányú differenciáció váltható ki kortikális prekursor és neurális őssejteken, illetve neurális differenciáció kisagyi szemcsesejteken, kortikális prekursorokon, csirkék hátsó gyöki idegdúcaiban, humán neuroblasztóma sejteken, egér embrionális őssejteken és PC12 feokromocitóma sejteken.

Nem neurális sejtvonalak esetében gátolja az oszteoblasztok differenciálódását, blokkolja az egyrétegű lapos granulosa sejtekből álló premordiális tüsző elsődleges, kuboid sejttes tüszővé alakulását, ezzel szemben serkentőleg hat a T-sejtekérésére.

Oszteoblasztsejteken a PACAP a cAMP szint emelésén keresztül gátolja a sejtek differenciálódását. A receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) és ligandja (RANKL) fontos szerepet tölt be a csontmetabolizmus és az emlőmirigy fejlődésében egyaránt. RANK és RANKL KO egerek emlő epitéliuma nem képes lobulo-alveoláris struktúrát kialakítani, és az ilyen egerek képtelenek a szoptatásra. A felsorolt adatok a két szerv evolúciós hasonlóságára utalnak.

PACAP a testnedvekben

Munkacsoportunk tömegspektrometriával igazolta a PACAP38 jelenlétét a petefészek tüsző folyadékában. Megkíséreltük a PACAP38 detektálását emberi csarnok- és magzatvíz, valamint hüvely-, nyál-, orr- és ondóváladékban is, de a PACAP38-ra jellemző csúcs nem volt kimutatható ezekben a mintákban.

A szövetekre kidolgozott specifikus és érzékeny PACAP-RIA módszert adaptáltuk a vérplazma és a testnedvek vizsgálatára, és ezzel meghatároztuk az egészséges női és férfi önkéntesek átlagos plazma PACAP38-IR-jét és annak különböző élettani paraméterekkel összefüggő változásait.

Újszülöttek perifériás véréét vizsgálva azonos PACAP38-IR-t detektáltunk, mint a fiatal felnőtt populációban. A köldökzsínór erek PACAP38-IR szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a perifériás vére. Alacsonyabb PACAP38-IR volt mérhető a köldökvénában, mint az artériában. Ezen adatok alapján a PACAP főtális szintézisét tételeztük fel.

Vizsgáltuk a PACAP38-IR plazma szintjének változását a hypothalamus-hypophysis tengely túlstimulációjával járó állapotokban is, így a terhesség, a szülés és a szoptatás során. A második és harmadik trimeszterben lévő anyák plazmamintáiban szignifikánsan magasabb PACAP38-IR volt mérhető, mint az első trimeszteres anyák és az egészséges, nem terhes nők esetében. A placentában és egyéb anyai szervekben a terhesség során az átlagnál nagyobb mértékű peptidszintézis folyik, és ezzel összhangban növekszik a placenta PACAP tartalma a terhesség előrehaladtával. Vizsgálataink során azt észleltük, hogy szüléskor a PACAP38-IR 70 %-os csökkenést mutat és 1-3 nap múlva tér vissza az átlag populációval megegyező értékre. A fiatal egészséges női populációhoz viszonyítva mérsékelt, de szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető 1-6 hónapja szült szoptató anyák plazma PACAP38-IR

szintjében. Ezekből az adatokból ugyan nem vonható le messzemenő következtetés a PACAP fiziológiai folyamatokban betöltött szerepére vonatkozóan, azonban méréseink bizonyítják, hogy az endogén PACAP38 szintek a hormonális változásokra érzékenyen reagálnak.

Vizsgálataink szerint az anyatejben 5-20-szor magasabb PACAP38-IR mérhető, mint a hozzá tartozó plazmamintákban. Humán eredményeinket alátámasztják munkacsoportunk háziállatokon végzett kísérletei is, melyek szerint a legmagasabb PACAP38-IR értékek a juh- és a kecsketej mintákban voltak detektálhatók.

A tejben kimutatott PACAP és a tejben jelen lévő egyéb bioaktív anyagokkal kapcsolatos irodalmi adatok figyelmünket a tejek és tejalapú készítmények további vizsgálata felé irányította és felvetette azt a kérdést, hogy lehet-e a PACAP-nak szerepe az emlőszövetben zajló proliferációval és differenciálódással összefüggő változásokban.

Bioaktív anyagok a tejben és tejalapú készítményekben

Az anyatejben előforduló legfontosabb peptidek

Az anyatejben megtalálható peptidek: oxitocin, relaxin, galanin, neurotenzin, VIP, szomatosztatin (SOM), GHRH, kolekisztokinin (CCK), melatonin, substance P, thyrotropin releasing hormone (TRH). Ezek közül a galanin, SOM, VIP, TRH, GHRH, CCK, neurotenzin, oxytocin és relaxin expresszióját vizsgálták normál, vemhes, laktáló és posztlaktáló patkány emlőben RT-PCR-ral. A SOM kivételével azonban egyik peptid RNS-e sem volt kimutatható az emlőben, és ebből arra lehet következtetni, hogy a neuropeptidek többsége a keringésből aktívan koncentráldik a tejbe.

A PACAP-hoz szerkezetileg legjobban hasonlító VIP-et 1970-ben fedezték fel, de csak másfél évtizeddel később derült ki, hogy jelen van az anyatejben is. A vérplazmában értéke alacsonyabb, mint a tejben. Koncentrációja a szoptatás során változik, szignifikánsan magasabb értéket mértek a főcstejben, mint a normál tehéntejben. Vagus ingerlés hatására a szoptatás alatt plazmában mért koncentrációja növekszik, míg vagotomia esetén ez az emelkedés elmarad. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a peptid szerepet játszik a tejkilövellésben. A lokálisan felszabaduló neurogén faktorok szerepére hívhatja fel a figyelmet az a tény is, hogy egyes fajokban a tej ejekciója független az oxitocintól.

Az anyatej összetételének változásai

Az anyatej összetétele dinamikusan változik a szoptatási periódus alatt és egy szoptatás alkalmával is. A szoptatási periódus 1-3 napjában termelődő kolosztrum szignifikánsan magasabb koncentrációban tartalmaz motilint, gasztrint, leptint és β -kazomorfin-5-t és 7-et. A szoptatás elején termelődő előtej magasabb koncentrációban tartalmazza az endothelin-1-t, a ghrelin-t és a koleszterolt, ezzel szemben alacsonyabb triglicerid, leptin és retinol szint mérhető a szoptatás végén termelődő utótejben. A nátriuretikus peptid és granulocita-kolónia stimuláló faktor (G-CSF) koncentrációja azonos az elő- és utótejben.

Az anya- és tehéntej, valamint a tehéntej alapú készítmények eltérő összetétele

A tehéntej alacsonyabb koncentrációban tartalmaz parathyroid hormone-like protein-t (PLP), azonban epidermal growth faktor (EGF) tartalma egyező a humán tejjel. A pasztörizált, kereskedelmi forgalomban kapható tejek transforming growth factor (TGF)- β 1 tartalma alacsonyabb, mint a friss tehéntejé. Az anyatej összetétele különbözik a tehéntej alapú tápszerekétől is, amennyiben a tápszerekben nem detektálható gonadotropin releasing hormone (GnRH), insulin-like growth factor (IGF)-1, substance P és calcitonin gene-related peptide (CGRP). Ellentétben ezekkel, a tápszerekben mérhető koncentrációban van jelen PLP, parathyroid hormone-related protein (PTHrP), EGF, inzulin és ghrelin. Érdeemes megemlíteni, hogy a tápszerek szignifikánsan magasabb koncentrációban tartalmazznak ghrelint és leptint, mint az anyatej.

PACAP és receptorai, valamint egyéb neuropeptidek az emlő szövetében

Az emlőben fellelhető subepidermális idegvégződésekben, a mellbimbó simaizom sejtjei körül, a ductus lactiferus és az ahhoz tartozó alveolusokat körülvevő kötőszövetben neuropeptidek azonosíthatók, így calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P, VIP, peptide histidine isoleucine (PHI), neuropeptid Y (NPY), galanin és tyrosine hydroxylase (TH) pozitív rostok figyelhetők meg.

Az emlő idegrostjai nem csak a felsorolt neuropeptideket tartalmazzák, hanem bennük PACAP-szerű immunreaktivitás is kimutatható. A PACAP jelenléte szöveti RIA méréssel is bizonyítható és értéke szignifikánsan magasabb a laktáló, mint a nem laktáló emlőben. Ez a RIA méréssel észlelt különbség egyszerű immunhisztokémiai eljárással azonban nem detektálható.

A PACAP receptor expresszióját korábban kimutatták normál és tumoros emlőből származó epitélsejteken, valamint laktáló emlőben is.

Az emlőhámsejtek laktogén differenciálódásának szabályozása

Terhesség során ösztrogén, progeszteron és prolaktin (PRL) hatására a mirigysejtek differenciációt és proliferációt mutatnak és megkezdődik a szekréta termelése. Az emlő laktogén differenciálódásnak alapvető, hormonálisan szabályozott folyamata során a PRL saját receptorához való kötődése a receptor homodimerizációját okozza, amely magának a receptornak és a Janus kináznak (JAK) keresztfoszforilációját eredményezi. Ezt követően a citoszólban monomer formában jelen lévő signal transducer and activator of transcription (STAT)-5 dimerizálódik és szintén foszforilálódik, majd a dimer transzlokálódik a nukleuszba, kötődik a GAS régióhoz (TTCCNGGAA) és megindítja a tejfehérjék (β -kazein, whey acidic protein/WAP, β -laktoglobulin) és STAT5 átíródását. A PRL receptorához való kötődése egyéb fontos kinázokat is aktivál, ilyenek a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) és a foszfinozitol-3 kináz (PI3K). A STAT5-től független jelátvitel fontosságára hívja fel a figyelmet az a tény, mely szerint IL-2 indukált suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 foszforiláció szelektív STAT5 gátlást eredményez a MAPK gátlása nélkül.

Neuropeptidok is képesek lehetnek a laktogenezist közvetlenül befolyásolni. A galanin nevű neuropeptid, amely a hypophysis laktotróp sejtjeiben szintetizálódik, tárolódik és szekretálódik, nem csak befolyásolja a PRL szekrécióját, hanem közvetlen hatást gyakorol az emlőhámsejtekre előmozdítva az alveoláris morfogenezist.

Az emlőhámsejtek differenciálódási folyamatának szabályozásában az említetteken kívül még növekedési- és transzkripciós faktorok, citokinek és angiogénikus faktorok is részt vehetnek. A differenciáció során az emlősejtek által termelt citokinek a T-helper (Th) sejtek differenciálódásához hasonló Th1/Th2 citokin váltást mutatnak, amely az IL-12, interferon (INF)- γ és tumor necrosis factor (TNF)- α expressziójának csökkenésében, illetve az IL-4, IL-13 és az IL-5 emelkedésében nyilvánul meg. Ismeretes, hogy az emlő differenciációjában a STAT5 fehérjén kívül a STAT6, amíg az involúció során bekövetkező változások szabályozásában a STAT3 is szerepet játszik. Az IL-4 és az IL-13 a STAT6 fehérjén keresztül fejti ki hatását. A citokinek szerepét a differenciálódásban alátámasztja az a megfigyelés is, hogy STAT6 és IL-4/IL-13 kettős KO egerekben a vemhesség alatt a differenciáció és az alveoláris morfogenezis egyaránt csökkent.

Célkitűzéseink és vizsgálataink

A fentiekből kiindulva kíváncsiak voltunk arra, hogy mutat-e a PACAP, más korábban felsorolt bioaktív anyagokhoz hasonlóan, koncentráció-változásokat a szoptatás során; detektálható-e PACAP38-IR a kereskedelmi forgalomban lévő tejekben, tejporokban és tápszerekben; eltér-e a PAC1 receptor expressziója különböző fajokból származó és eltérő hormonális hatások alatt álló szöveti- és sejtmintákban és van-e hatása az emlőszövetben és tejben egyaránt jelenlévő PACAP-nak az emlőszövetet érintő fiziológiás változásokra, így az emlőhámsejtek differenciálódására.

- PACAP-RIA-val mértük a kolosztrum, az átmeneti és az érett anyatej PACAP38-IR-szintjét és vizsgáltuk annak változását hosszú távú követés során, valamint az elő- és az utótejben.
- Vizsgáltuk a PACAP-IR-t friss és pasztörizált tehéntejekben, tápszerekben és tejporokban. Kvalitatív tömegspektrometriás mérést alkalmaztunk annak igazolására, hogy a tápszermintákban a RIA-val mért immunreaktivitás valóban a PACAP38-nak felel meg és nem az antitest más, hasonló molekulával létrejött keresztreakciójának eredménye.
- Vizsgálataink során összehasonlítottuk a birkából származó laktáló és nem laktáló emlőszövetek PAC1 expresszióját és megfigyeléseinket összevetettük nem laktáló humán emlő mintákkal. Kíváncsiak voltuk arra, hogy a PAC1 receptor expressziója az emlőhámsejtek konstitucionális sajátossága-e, ezért a tanulmányban szereplő egér emlőhámsejtek mellett sort kerítettünk egyéb vizsgálatainkban felhasznált humán daganatos és nem daganatos emlősejtek PAC1 receptorainak konfokális mikroszkópos elemzésére is.
- Vizsgáltuk, hogy a PACAP kezelés befolyással van-e a β -kazein termelésére, valamint a STAT5 függő és független differenciálódási útvonalakra. Kísérleteink során egér emlősejtek PRL indukálta differenciálódását a β -kazein tejfehérje kimutatásával igazoltuk és a differenciálódási útvonalak (STAT5, p38 MAPK és Akt) aktiválódását Western blot-tal detektáltuk.
- Citokin és angiogenezis array kit-ek segítségével követtük nyomon, hogy milyen hatással bír a PACAP differenciálatlan és differenciált egér emlőhámsejtek cito- és kemokin, valamint növekedési és angiogenezis faktor szekréciójára.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Minták gyűjtése

Anyatejminták

Vizsgálataink céljára egészséges, érett csecsemőt világra hozó, nem dohányzó szoptató anyáktól származó 5 ml érett anyatejet (a szoptatás 14. napjától annak befejezéséig termelődő tej; n = 167) gyűjtöttünk. Az 1 ml-nyi kolosztrum (az első három napban termelődő tej; n = 11) és az átmeneti anyatejminták (a szoptatás 4. napjától annak 14. napjáig termelődő tej; n = 8) gyermekágyas anyáktól származtak. Ezenfelül 5 ml érett elő- (közvetlenül a szoptatást megelőzően lefejt tejminta; n = 4) és utótejet (a szoptatás befejezését követően adott tejminta; n = 4) is gyűjtöttünk. A mintákat adó anyák tejhozamát megbecsültük. Az anyák beleegyező nyilatkozatot és kérdőívet töltöttek ki, melyben szoptatási és hozzátáplálási szokásaikra, valamint életvitelükre kérdeztünk rá. Kísérletünkhöz rendelkezünk a szükséges etikai engedéllyel (PTE KK3117).

A mintákat polipropilén csövekbe gyűjtöttük és peptidáz inhibitor nélkül -20 °C-on tároltuk.

Tehéntejek, tejporok és tápszerek

A RIA mérésekhez 5 ml nem pasztörizált, 1-8 hónapja ellő Holstein-fríz/magyar tarka szarvasmarha keverékének friss tejét (Nagybudmér, Baranya; n = 4) gyűjtöttük. Kereskedelmi forgalomban kapható pasztörizált bolti tejet, tejporokat és különböző márkájú hipoallergén (HA) és nem hipoallergén (non HA) tápszereket vásároltunk. Pasztörizált bolti tejek: Tolle 2,8 %; Milli UHT 3,5 %; Pilos 2,8 %; Mizo UHT 1,5 %. Tejporok: Marvel sovány tejpor; NATURBIT sovány tejpor 1,5 %; Bedeco instant sovány tejpor; MIZO zsíros tejpor. Tápszerek: Beba Pro 1; Beba Pro HA; Nestlé Alprem; Milupa; Hipp Plus; Hipp Follow; Milumil 2 6 hó; Aptamil HA; Milumil HA Start Optima.

Szövet- és sejtminták

A laktáló és nem laktáló (n = 4) tőgybiopsziákat magyar merinó juhokból vették, minimálisan invazív biopsziás tűkkel, ellést követő 7-30. napon. A humán emlőmintákat daganatos elváltozások miatt végzett sebészeti excíziók tumormentes részeiből nyertük (n = 5; átlag életkor: 36,3 év). Etikai engedély: PTE KK 4304.

A citológiai vizsgálatok során egérből származó HC11 emlőhámsejteket, valamint humán daganatos (MCF-7 és MDA-MB-468) és nem daganatos (HMEC) sejtvonalakat használtunk. Az MCF-7, az MDA-MB-468 és a HMEC sejtvonalak egyéb, az értekezésben nem tárgyalt kísérleteinkben szerepeltek, ezért pontos tenyésztési körülményeik ismertetésétől eltekintünk, az ATCC és a Lonza előírásait követtük.

Radioimmunoassay

A PACAP38 antiszérumot (88111-3) Arimura és munkatársai (Tulane University, New Orleans) nyulak immunizálásával állította elő. Karbodiimiddel marha tireoglobulinhoz kötött szintetikus peptid segítségével nagy specificitású, a PACAP38 C-terminálisára szenzitív antitestet nyertek. A mérésekhez használt PACAP38 antigén ¹²⁵I-tel történő jelölését a PTE Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében végezték.

Az anyatej mintából a fehérjéket ecetsavval csaptuk ki és ismételt centrifugálásokkal távolítottuk el. A polipropilén RIA csövekbe duplikációban mértünk standardot (100 µl), vagy a mérni kívánt/ismeretlen mintát (200 µl), 100 µl antiszérumot, 100 µl (5000 cpm/cső) ¹²⁵I izotóppal jelölt antigént, majd az inkubációs elegyet a megfelelő assay pufferrel [0,05 mol/l (pH 7,4) foszfát puffer, mely tartalmaz 0,1 mol/l NaCl-ot, 0,25 % (w/v) BSA-t és 0,05 % (w/v) NaN₃-t] 1 ml térfogatra egészítettük ki. A mintákat az összekeverést követően 4 °C-on, 48-72 órán át inkubáltuk. Ezután az antitesthez kötött jelölt antigén frakciót elválasztottuk a szabad jelölt peptidektől oly módon, hogy csövenként 100 µl szeparáló oldatot (10 g mosott szén), 1g dextránt, 0,5 g zsírmentes tejport, 100 ml desztillált vizet mértünk az elegyhez. A mintákat 4 °C-on, 20 percen át, 3000 fordulat/perc-en centrifugáltuk, majd a felülúszót leöntöttük.

A szénhez kötött szabad peptidfrakció radioaktivitását gamma számlálóval mértük NZ310 típusú spektrométeren, majd kalibrációs görbéről olvastuk le az ismeretlen minta PACAP38-IR értékét

Tömegspektrometria

A tömegspektrometriás mérésekhez a RIA során alkalmazott minta előkészítési lépéseket alkalmaztuk. A kinyert savót ezután 10-szeresére hígítottuk 0,1 %-os TFA-val. A sótalanításhoz és a zsírtalanításhoz ¹⁸C-as bevonatú ZIP-TIP pipettahegyet használtunk. A

PACAP38 a ZIP-TIP felszínén kötődött meg, ahonnan azt a mátrix hidroxifahéjsav 50 %-os acetonitril és 0,1 %-os TFA (1/2 v/v) telített oldatával történő leoldás után közvetlenül detektálhattuk. Mérésünkhöz etanolban oldott hidroxifahéjsav mátrixból vékony réteget csepegtettünk a lemezre, majd arra 1-1 µl mintát rétegeztünk. Kalibráló oldatként minden esetben a „Bruker Peptide” kalibráló standardot alkalmaztuk.

Bruker Autoflex II. típusú matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI TOF/TOF) tömegspektrométer segítségével végeztük méréseinket. Az ionizáláshoz 337 nm-es nitrogén lézert használtunk, amelynek a frekvenciája 50 Hz, a gyorsító feszültség 20 kV, a késleltetési idő pedig 200 ns volt. A tömegspektrumokat pozitív ionizációs módban, 1000 és 10000 m/z tartomány között regisztráltuk. Minden minta esetében a peptidkeverékre jellemző tömegspektrumokat (400 lövés/minta) összesítettük. A műszer ellenőrzését Bruker FlexContol 2.4 szoftverrel, az értékelést pedig Bruker FlexAnalysis 2.4 szoftverrel végeztük.

Szöveti és citológiai vizsgálatok

Az exciziós emlőmintákat 4 %-os paraformaldehidben fixáltuk. Kriosztáttal történő metszés után a metszeteket nyúlban termelt anti-PAC1-R antitesttel (Seiji Shioda, Showa University, Tokyo szívességéből) inkubáltuk (1:100), majd Alexa Fluor „568” jelölt anti-nyúl szekunder antitestet (1:1000) alkalmaztunk. Valamennyi antitest alkalmazásakor készítettünk negatív kontrollokat is. A metszetek specifikus jeleit 568 nm hullámhosszon, Nikon Eclipse 80i mikroszkóppal detektáltuk, SPOT Basic 4.04 program segítségével.

A fluoreszcens immuncitológiai vizsgálatokhoz a „Thermanox” fedőlemezeket méretre vágunk és 96 lyukú plate aljára helyeztük, majd azokat etanollal, poli-lizinnel és UV fényel előkezeltük. A sejteket 24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk az így előkészített lemezekre, majd 4 %-os PFA-ban fixáltuk először 30 percen át szobahőn, ezután pedig 4 °C-on hűtőben. A PFA eltávolítása és PBS-sel történő mosás után BSA-val blokkoltuk az aspecifikus kötődési helyeket. Primér antitestként a szövettani vizsgálatokban is alkalmazott anti-PAC1-R antitestet (1:100) használtuk. Az egy éjszakán át 4 °C-on történő inkubációt mosás és Cy3-konjugált szekunder anti-nyúl IgG antitesttel (1:200) történő kezelés követte. Újabb mosás után a fedőlemezeket tárgylemezre helyeztük és Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a PAC1 receptor expresszióját.

HC11 sejtek tenyésztése

Kísérleteinkben a HC11 sejteket RPMI-1640 médiumban, 37 °C-on, 5 % CO₂ mellett tenyésztettük, 10 %-os FBS, 5 µg/ml inzulin, 10 ng/ml EGF, 50 µg/ml gentamicin és glutamin jelenlétében (GM = growth medium) és 3-4 naponta passzáltuk.

A differenciációs kísérletekhez a sejteket 6 lyukú lemezre tettük, melyek GM-ban 2-3 nap alatt konfluensé nőttek. Ezután a sejteket 2-szer PBS-sel mostuk, majd újabb 2 napos inkubáció következett a pre-hormon médiumban (PHM), amely tartalmazott RPMI-1640-t, 2 % FCS-t, 5 µg/ml inzulint, 50 µg/ml gentamicint és glutamint. Ezt követően a PHM-ot DIP médiumra cseréltük, amely 1 µM dexametazon (D) és 5 µg/ml prolaktin (P) hozzáadását jelentette a PHM-hoz.

Az ezt követő négy napban a DIP médiumot az egyes kísérleteknek megfelelően naponta cseréltük. A sejteket DIP-pel, DIP + PACAP38-cal és DI + PACAP38-cal inkubáltuk. A PACAP38 100 nM mennyiségben került a médiumokba. A β-kazein expresszió Western blot vizsgálatához a sejtizátumokat az 5. napon készítettük. A kiértékelés során a DIP + PACAP38 és DI + PACAP38 kezelt sejtek β-kazein expresszióját a csak DIP kezelt csoporthoz viszonyítottuk.

A differenciációs útvonalak Western blot vizsgálatához a sejtizátumokat 20 perccel a különböző hormon kombinációs és PACAP38 kezelések után nyertük (DIP, DIP + PACAP38, DI + PACAP38, I és I + PACAP38). A PACAP kezelések eredményeit a kezeletlen sejtekével hasonlítottuk össze.

Az array vizsgálatokhoz a sejteket a β-kazein mérésekhez hasonló körülmények között tenyésztettük. A differenciálatlan, kezeletlen sejtek (csak GM) által szekretált faktorok expresszióját a PACAP38 kezelt differenciálatlan és a kezeletlen differenciált sejtekhez viszonyítottuk (GM + PACAP38, illetve DIP). A kezeletlen differenciált sejtek szekrécióját a PACAP kezelt differenciált sejtekével (DIP + PACAP38) is összevetettük.

Western blot

Western blot vizsgálatainkhoz sejtizátumokat készítettünk. A sejteket háromszor PBS-ben mostuk, majd 30 percen át 4 °C-on lízispufferben [50 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 25 mM β-glicerofoszfát, 1,5 mM MgCl₂, 10 % glicerol, 1 % Triton X-100, 5 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml leupeptin, 1mM fenilmetilszulfonil fluorid, 1mM

ditiotreitolt, 1,19 mM Na₃VO₄, 2,5 mM NaF] rázattuk. Ezután a lizátumokat centrifugáltuk (15300 fordulat/perc, 4 °C, 10 perc), hogy a feloldatlan részeket eltávolítsuk. A protein koncentrációt Bradford reagenssel határoztuk meg.

A fehérjéket SDS-PAGE gélelektroforézissel szeparáltuk és Odyssey membránra blottoltuk. A membránokat 5 %-os tejjel blokkoltuk 1 órán át szobahőn, majd éjszakán át inkubáltuk a primér antitestekkel, melyek a következők voltak: antifoszfo-Akt (1:500), anti Akt-1 (1:500), antifoszfo -p38 MAP Kináz (1:1000), anti-p38 MAP Kináz (1:1000), antifoszfo-STAT5 (1:900), anti-STAT5 (1:900), anti- α -tubulin (1:1000) és anti- β -kazein (1000). Másnap 3 x 10 perces TBS-T mosás után a megfelelő szekunder antitesttel inkubáltuk 30 percen át szobahőn.

A reakciókat ECL Plus Western blotting detektáló rendszerrel vizsgáltuk. A röntgenfilmeket transzmissziós módban szkenneltük, és a pixel denzitásokat ImageJ szoftverrel analizáltuk. A vizsgálatokat azonos feltételek mellett három alkalommal végeztük el.

Egér citokin és angiogenesis array

A szemikvantitatív módszer a nitrocellulóz membránokra előre duplikátumban kikötött antitestek és a mintában lévő proteinek kötődésén alapszik. A kit tartalmazza a kísérlethez szükséges puffert, mosóoldatokat, detektáló antitest koktélt és a négy membránt.

Az array-eket a gyártó cég előírása szerint alkalmaztuk. Röviden, 1 órás membránblokkolást követően 500 μ l médiumot adtunk a membránokhoz és azokat detektáló koktél jelenlétében rázólemezen inkubáltuk 4 °C-on, egy éjszakán át. Másnap háromszori mosás után adtuk a rendszerhez a tormaperoxidázzal konjugált streptavidint, melyet kemilumineszcens előhívás követett.

A denzitometriás kiértékelés a korábbiaknak megfelelően történt, a statisztikai analízis során három független mérés eredményét vettük figyelembe.

Statisztikai analízis

A humán anyatejminták statisztikai analíziséhez Friedman, a friss és pasztörizált tehéntej, tejpor, valamint tápszer esetében páratlan Student-t, a kitnél 1- illetve 2 utas ANOVA tesztet és Bonferroni post-hoc analízist használtunk.

Az átlagtól való eltéréseket az átlag standard hibájaként (standard error of mean = SEM) adtuk meg.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

A PACAP38-IR változása a szoptatás 1-17. hónapjában

A kizárólagos anyatejes táplálás szakaszában (1-6. hónap) a PACAP38-IR értéke állandónak mutatkozott (112 ± 13 fmol/ml). Az 1-6. hónapok között gyűjtött mintáinkat havi bontásban is elemeztük, a legalacsonyabb érték a 6. hónapból származó mintákban ($100 \pm 8,8$ fmol/ml), a legmagasabb pedig a 2. hónapban gyűjtött mintákban volt ($119 \pm 14,2$ fmol/ml).

A 10. hónapot követően azonban szignifikáns emelkedés volt észlelhető. Így az 1-6. hónapban mért átlagértékhez képest a PACAP38-IR a 11-13. hónapok között 2,3-szeresére ($\Delta\% = +128$; $p < 0,001$), a 14-17. hónapok között pedig csaknem 3-szorosára ($\Delta\% = +177$; $p < 0,001$) növekedett ($\Delta\% = \frac{(X - X_{ref})}{X_{ref}} \times 100$; X = a vizsgált mintában mért PACAP38-IR átlagértéke, X_{ref} = a referenciaként szolgáló érett anyatej PACAP38-IR átlagértéke).

Az általunk észleltekhöz hasonló koncentrációemelkedést figyeltek meg a PTHrP vonatkozásában patkány és tehéntejben, mely csak az ivadékok elválasztásakor csökkent le. Ezzel ellentétben más hormonok és növekedési faktorok, így például a PRL és az EGF, koncentrációja csökken a szoptatás előrehaladtával, a CGRP szintje azonban változatlan.

A szoptatás előrehaladtával a tejhozam egyre csökken, az összfehérje azonban viszonylagosan állandó. A 10. hónapot követő PACAP38-IR emelkedés így akkumulációra utal, amely fokozott PACAP termelésre enged következtetni és összefüggésben lehet az anya PRL szintjének csökkenésével és a tejtermelés terminációjával.

PACAP38-IR a kolosztrumban

Vizsgálatainkban az 1-6. hónap között gyűjtött tejmintákhoz viszonyítva a kolosztrum PACAP38-IR-je 1,5-szeres emelkedést ($\Delta\% = +56$) mutatott, amely a statisztikai analízis szerint szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget takart.

A kolosztrum magasabb koncentrációban tartalmaz immunglobulinokat, növekedési faktorokat, citokineket, oligoszaharidokat, antimikrobiális és immunszabályozó faktorokat, mint az átmeneti és az érett tej. A kolosztrumra vonatkozó mérési eredmények alapján arra lehet gondolni, hogy egyes fehérjék nem csak közvetlenül az újszülött bélrendszerének, de felszívódva és a keringésbe jutva, egyéb szerveinek megfelelő fejlődéséhez is elengedhetetlenek.

PACAP38-IR az elő-és utótejben

Vizsgálatainkban kontrollként hat érett tejmintát választottunk, amelyekhez viszonyítva a PACAP38-IR nem mutatott szignifikáns különbséget sem az elő- ($\Delta\% = -2,5$), sem az utótejben ($\Delta\% = +5,1$), sem pedig az elő- és utótej viszonylatában.

Az elő- és utótej összetételének megváltozása az újszülöttek számára szignált jelent a szopás befejezésére. Az táplálékfelvételt szabályozó két legfontosabb peptid közül az egyik a ghrelin, amely fokozza, a másik a leptin, amely csökkenti az étvágyat. Az étvágyat gerjesztő hatású, orexigén ghrelin szintje szignifikánsan alacsonyabb az utótejben, mint az anorexigén leptiné, és ez a szopás befejezését idézheti elő.

Korábban említésre került, hogy a PACAP is befolyással bír a táplálékfelvétel szabályozására. Anorexigén hatását az α -melanocyte-stimulating hormone (MSH) és corticotropin-releasing hormone (CRH) idegi útvonalak gátlásán keresztül fejt ki. A PACAP KO egerek szénhidrát felvétele is csökkent, és korai posztnatális halálozásukat károsodott szénhidrát anyagcseréjükkel hozzák összefüggésbe. Kísérleteink során nem észleltünk különbséget az elő- és utótej mintáink PACAP38-IR-szintjei között, így az anyatejben lévő PACAP feltehetően nem játszik szerepet az újszülöttek és csecsemők táplálékfelvételének szabályozásában.

PACAP38-IR a tehéntejben

Az érett anyatejhez viszonyítottuk a friss, kezeletlen és a pasztörizált tehéntej PACAP38-IR-jét is, és nem észleltünk szignifikáns eltérést ($\Delta\% = +11,8$, illetve $\Delta\% = -9,9$).

Az emberi és a tehéntej közötti alapvető különbség az, hogy a tehéntej több proteint tartalmaz, valamint a kazeinek és az egyéb tejsavó fehérjék aránya eltérő (82:18, ill. 40:60). Ez az újszülött veséje számára fokozott fehérjeterhelést és magasabb, rosszul emésztett proteinfelvételt jelent. Az esszenciális zsírsavak koncentrációja ugyanakkor a tehéntejben alacsonyabb, mint a humán tejben. Számos ipari eljárást dolgoztak ki azért, hogy a tehéntej összetételét az anyatejéhez hasonlóvá tegyék és a csecsemők számára a lehetőségek szerinti legjobb minőségű tápszereket biztosítsák. Még ilyen körülmények között is jóval kevesebb, a csecsemők fejlődése szempontjából fontos faktor található a tápszerekben, mint az anyatejben.

Érdekes megfigyelés, hogy pasztörizált tehéntej fogyasztás mellett az atópiás alkatú gyermekek előfordulási gyakorisága csökkent. Egyéb neuropeptidok (CGRP, neuropeptide Y/NPY, VIP) mellett a PACAP is képes csökkenteni az atópiás dermatitiszes betegek tüneteit. Így nem csak a pasztörizált tehéntej mikrobiális összetételének változása, illetve a zsírsavak és citokinek mennyiségének és minőségének különbsége, hanem a pasztörizált tejben megőrzött PACAP is segítheti esetleg az atópiás alkat kialakulása elleni védelmet.

PACAP38-IR tejporokban és tápszerekben

Tömegspektrometriával bizonyítottuk a PACAP jelenlétét a tápszermintákban. A tejporok és tápszerek PACAP38-IR-át a kezeletlen tehéntej mérési eredményeivel vetettük össze. A tejporokban és a HA tápszerekben a PACAP38-IR lényegében változatlan aktivitással volt detektálható ($\Delta\% = +6$, illetve $+8$), ezzel szemben a non HA típusú tápszerek PACAP38-IR-a közel felére csökkent ($\Delta\% = -42$; $p < 0,05$).

A tejpor- és tápszergyártás során az előkészített tehéntejből a víztartalom teljes, vagy részleges elvonásával és hőkezeléssel porszemű tejterméket kapnak. A porlasztás és hőkezelés alatt a tehéntej tápanyag és vitamin tartalma csak részben őrződik meg. Az elvesztett ásványi anyagok, vitaminok és rostok nagy részét pótolják. A HA tápszerek mentesek a nagy tejfehérjétől, ugyanis azokat extenzív hidrolízissel lebontják, így az allergiás reakciók száma minimalizálódik. Mivel a tápszergyártási folyamatok során csak a 6000 Da feletti proteinek

hasítódnak, ezért a PACAP a maga 4535 Da-os molekulatömegével képes lehet ellenállni ezeknek a folyamatoknak, így azonosítható marad a tápszermintákban.

A HA és nem HA tápszerek közötti eltérő PACAP38-IR esetleg annak tulajdonítható, hogy a nem HA tápszerek esetében a szállítófehérjéhez kötött PACAP-hoz az antitest a RIA mérésben nem megfelelően fér hozzá, azaz a méréssel a fehérjéhez kötött PACAP nem, vagy csak kisebb mértékben detektálható. Ezzel szemben extenzív hidrolízist követően a HA típusú tápszerek viszonylag magas koncentrációban tartalmazhatnak RIA-val kimutatható PACAP-ot.

A plazmában meglehetősen gyorsan lebomló PACAP érdekes módon a tejben és tej alapú készítményekben viszonylag stabil. Az anyatej szerinproteázokban (α 1-antitripszin és antikimotripszin) gazdag. Az inhibitorok koncentrációja a laktáció kezdetekor a legmagasabb és az idő előrehaladtával csökken. Következésképpen számos élettanilag fontos, szekretált peptid koncentrációja magas marad az anyatejben a szoptatás első hónapjaiban. A proteáz inhibitorok protektív hatása magyarázhatja az egyébként rövid életű PACAP detektálhatóságát a tejben és a tejtartalmú készítményekben.

A plazmában a PACAP38 szelektíven kötődik a cöruoplazminhoz, de a szállító fehérjéje az anyatejben nem ismert. A cöruoplazmin és a laktoferrin az anyatejben komplexet képez. A PACAP képes a laktoferrint leszorítani a cöruoplazminról, alapot adva arra a feltételezésre, hogy a PACAP szállító fehérjéje az anyatejben is a cöruoplazmin.

Az anyatejben jelen levő PACAP eredete és feltételezett élettani hatásai

Munkacsoportunk nem közölt vizsgálatai szerint 3 napos laktációs periódusban lévő többcsöcsű egerek („natal multimammate mouse”) emlőjének PCR vizsgálata azt mutatja, hogy sem a 288bp sem pedig a 247bp PACAP mRNS nem található meg a mintákban. Eszerint a PACAP, hasonlóan a VIP-hez, nem az emlőben szintetizálódik, hanem a plazmából származhat.

Konkrét kísérleti adatokkal ugyan nem rendelkezünk, mégis feltételezhető, hogy az anyatejben jelenlévő PACAP szerepet játszhat (1) az újszülöttek idegrendszerének fejlődésében, (2) fontos immunmoduláló funkciója lehet a korai posztnatális fejlődés során, valamint (3) befolyásolhatja újszülött PRL termelését.

A PAC1 receptor jelenléte az emlő hámsejteken

Mikroszkópos citológiai vizsgálatainkkal egér és humán sejtvonalakon közvetlenül demonstráltuk a PAC1 jelenlétét. Az egyes sejtvonalak eltérő intenzitással jelölődtek. Nem mutatkozott azonban különbség a differenciált és differenciálatlan HC11 sejtek PAC1 receptor expressziója között. A szövettani vizsgálatok során a nem laktáló emlőkben a terminális lobuláris egységek gyenge PAC1-jelölődése látszott a kötőszövet negatívítása mellett. A laktáló emlőkben a nem laktálókhöz viszonyítva a PAC1 expresszió emelkedését észleltük.

Már a VPAC1-2 és PAC1 receptorok izolálását megelőzően vizsgálták különböző VIP-szerű peptidek hatását a HMEC és a HC11 sejtekre. Később, a PACAP receptorok felfedezését követően, PCR technikával VPAC1 és PAC1 receptor mRNS-t azonosítottak az MCF-7 sejteken. Az eredményeket Western blot módszerrel is alátámasztották, amely szerint a PAC1 receptor fehérjeje 60 kDa-nál volt kimutatható.

Humán biopsziás anyagokon korábban PCR, Western blot és immunhisztokémiával is kimutatták a PACAP receptorok expresszióját. A normál emlőben a VPAC1 és a VPAC2 főként a dukális és glanduláris epitél sejteken expresszálódik. Hasonló eloszlás, de gyengébb intenzitás figyelhető meg a PAC1 receptor esetében.

A normál és a tumoros emlősejtek PACAP receptorai funkcionálisan aktív állapotban vannak és ezért szerepük lehet az emlő élettani és patológias folyamatainak szabályozásában. A PACAP receptoraival való kapcsolódás révén serkentheti egyes emlőtumorok proliferációját. A PAC1 receptor antagonistá, PACAP6-38 proliferációt gátló hatása bizonyított. A VIP hibridek, mint VPAC antagonisták, képesek potenciózni a kemoterápiás szerek hatását. Autoradiográfiás vizsgálatok szerint a metasztatikus axilláris nyirokcsomók kétszer akkora denzitásban mutatják a VPAC1 receptort, mint a primér emlőtumorok. Ezek a megfigyelések lehetőséget nyújthatnak PACAP/VIP radioligandok kifejlesztésére. A felsoroltak arra utalnak, hogy a PACAP receptoraira vonatkozó ismeretek az emlődaganatok diagnosztikájában és terápiájában egyaránt hasznosíthatók lehetnek.

DIP indukálta differenciálódás vizsgálata HC11 sejtenyészeten

Kísérleteinkben a PACAP kezelés önmagában, PRL nélkül nem indukált β -kazein expressziót és nem befolyásolta a DIP kezelés által kiváltott β -kazein expresszió mértékét. A PACAP38-

kezelés esetleges hatását nem tudtuk kimutatni sem a STAT5, sem az Akt/p38 MAPK jelátviteli útvonalakon.

HC11 sejtek cito- és kemokin, valamint növekedési faktor szekréciója

Inzulinszerű növekedési faktorok és hordozó fehérjéik

Angiogenezis array-vel egyebek mellett vizsgáltuk az IGF-ek hordozó fehérjéinek, az insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-ek szekrécióját differenciált és differenciálatlan HC11 sejteken. Figyelemre méltó, hogy az IGFBP3 expressziója DIP kezelés hatására saját vizsgálatainkban szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkent, ez jól összevethető az IGFBP-ek laktáció alatt észlelhető fiziológiás változásával. A szállítófehérje funkciót betöltő IGFBP-ek csökkenése növelheti ugyanis a szabad IGF szintet, amely potenciózhatja az inzulin hatását és ezáltal előmozdíthatja a PRL által indukált alveoláris differenciációt.

A differenciálatlan sejtek IGFBP3 szekréciója ellentmondó. Egyes szerzők nem észleltek IGFBP3 szekréciót a differenciálatlan HC11 sejtek tenyészeiben. Méréseink szerint azonban, hasonlóan a Comma-1D (HC11 progenitor) sejteken végzett korábbi vizsgálatokhoz, a differenciálatlan sejtek médiumaiban az IGFBP3 jól detektálható.

Interleukinok

Az általunk használt citokin array-en az IL-ok gyenge, analízisre alkalmatlan jelet adtak.

Az IL-ok differenciációban betöltött szerepére az utal, hogy a HC11 sejtekhez hasonló, KIM2 sejteken végzett vizsgálatok szerint az IL-13R α és az IL-4R α expressziója a differenciáció során emelkedik, és IL-4 és IL-13 adását követően a STAT6 foszforilálódik. Ehhez hasonló IL-4 mediált STAT6 aktiváció és β -kazein promóter indukció figyelhető meg a HC11 sejtek esetében is. Differenciált KIM2 sejteken korábban végzett citokin array vizsgálatok során magasabb IL-4, illetve csökkent G-CSF és IL-6 szekréciót észleltek, de az egyéb Th2 citokinek (IL-2, IL-3, IL-5, IL-9, IL-10 és IL-13) nem mutattak különbséget. A differenciáció indukciójával egyidejűleg Th1/Th2 citokin váltást figyeltek meg: az IL-12 és TNF α downregulálódott, az IL-4, IL-5 és IL-13 pedig upregulálódott.

Saját kísérleteinkkel nem tudunk alátámasztani hasonló változásokat az IL-4, IL-6 és G-CSF expresszióban a differenciált HC11 sejteken, amely feltehetően sejtvonal specifikus hatásnak és az eltérő indukciós módszereknek tulajdonítható.

Kemokinek

Eredményeink szerint a laktogén differenciáció során szignifikánsan csökkent a HC11 sejtek interferon gamma-induced protein (IP)-10 és regulated upon activation normal T cell expressed and presumably secreted (RANTES) kemokin szekréciója ($p < 0,05$, illetve $p < 0,005$).

Az IP-10 és a RANTES kemokinek felelősek a T-limfociták és egyéb leukociták „recruitment”-jéért. Az anyatejben és az emlőben megtalálható IP-10 és a RANTES szerepet játszik a limfocita „homing” egyensúlyának fenntartásában az emlő különböző fejlődési stádiumaiban. A terhesség során T-sejtek, a laktáció során pedig IgA-t tartalmazó B-sejtek kolonizációja dominál az emlőben, így a HC11 sejtek csökkent T-sejt kemoattraktáns IP-10 és RANTES szekréciója a T- és a B-sejtek laktációval összefüggő váltását tükrözheti.

Növekedési faktorok

A differenciált HC11 sejtek médiumaiban egyes EGFR ligandok, így az amphiregulin (AREG) és az EGF, szignifikáns csökkenését észleltük ($p < 0,001$).

Az EGF receptor (EGFR) ligandok strukturálisan és funkcionálisan hasonló fehérjék, melyek sejtproliferációt és differenciációt okoznak.

Az AREG egy heparin kötő, glikozilált protein, C-terminálisának 38 % megegyezik az EGF C-terminálisának aminosav összetételével. A fehérjét az MCF-7-es sejtek EGFR ligandjaként azonosították. Az AREG a duktális morfogenezishez nélkülözhetetlen, ezzel szemben az EGF és a transforming growth factor (TGF)- α elhanyagolható ebben a folyamatban. Az AREG membrán asszociált prekuzorként expresszálódik, majd szekretálódva kötődik a strómában lévő EGFR-okhoz, és fontos szerepet játszik a strómasejtek fibroblast growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (HGF) és IGF1 termelésében, melyek stimulálják a környező emlőhámsejtek proliferációját.

Ismert, hogy az EGF blokkolja a differenciációt és akár dedifferenciációt is okozhat. Az emlő differenciációja a stimuláló (PRL, inzulin, dexametazon) és a gátló (TGF β , progeszteron) hatások egyensúlyának függvénye. Az EGF szerepére hívja fel a figyelmet, hogy plazma szintje és receptorának expressziója terhesség során növekszik, a laktáció előtt pedig csökken. EGF hatására a differenciált sejtek ellapulnak, az intracelluláris zsírcseppek száma csökken, a WAP drámai, a β -kazein expresszió enyhe csökkenést mutat, és hasonlóképpen csökken az mammary-derived growth inhibitor (MDGI) szintje is. Ezzel

ellentétben az EGF stimulálja a TGF α -t, ezért feltételezik, hogy a TGF α mediálja az EGF hatását.

A differenciált HC11 sejtek vizsgálatainkban észlelt csökkent AREG és EGF szekréciója tükrözheti a proliferációs szakaszból a laktogén differenciálódásra történő átváltást és összhangban van a felsorolt kísérleti adatokkal. Az AREG átíródását a PRL szabályozza, azonban PRL által regulált AREG és EGF szekrécióról nem áll rendelkezésre adat. Kísérleteinkben a PRL az alkalmazott hormonkeverék állandó összetevője volt, így nem kizárt, hogy akár közvetlen hatása lehet az AREG szekréciójára.

A PACAP hatása a differenciálatlan emlősejtek AREG és EGF szekréciójára

Az EGF, az AREG és a TGF α szekréció szabályozása

PACAP által indukált szignifikáns AREG ($p < 0,001$) és EGF ($p < 0,05$) szekréció csökkenést észleltünk a differenciálatlan HC11 sejteken, amely csökkent ligand „shedding” és/vagy csökkent EGFR ligand expresszió következménye lehet.

Az AREG, az EGF és a TGF α „shedding”-jéért és a következményes EGFR aktivációért az ADAM-17 metalloproteináz („a disintegrin and metallopeptidase domain”) felelős, melyet a TGF β gátolni képes. A TGF β hatását az ADAM17-en a tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-3 upregulálásán keresztül fejt ki. A TGF β PACAP KO egerekben downregulált, és kísérletes adatok utalnak arra, hogy a PACAP közvetlenül képes stimulálni a TGF β -t. A felsoroltak alapján feltételezhető esetleg, hogy a PACAP hatására upregulálódik a TGF β és ennek következményeként a TIMP3, mely gátolja az ADAM17-et és ezen keresztül az AREG és az EGF „shedding”-jét. Az általunk megfigyelt PACAP indukálta EGFR ligand szekréció csökkenés hátterében álló mechanizmus pontos feltérképezése újabb kísérletek kiindulópontja lehet.

Az EGF és az AREG, valamint a neuropeptidek és az EGFR aktivációja

A PACAP által kiváltott EGFR ligand szekréció csökkenés ráirányítja figyelmünket az EGFR transzaktivációjának kérdéskörére. Az EGFR aktivációjának kitüntetett szerepe van a sejtproliferáció megindításában és fenntartásában. A receptor transzaktivációját elsősorban az EGF, az AREG és a TGF α szekréciója szabályozza, melynek mechanizmusát HC11 sejteken is vizsgálták. A HC11 sejtek egyaránt expresszálják az EGFR-t és a HGF receptorát a MET-t.

Azonban sem rövid, sem hosszú idejű inkubáció után nem tapasztalható EGF indukálta MET, illetve HGF mediált EGFR aktiváció. A transzaktiváció ezen formája tehát ebben a modellben kizárhatónak látszik.

A folyamatot egyéb mellett különböző neuropeptidek is elindíthatják. VIP kezelést követően human epidermal growth factor receptor (HER)-2, illetve EGFR transzaktiváció figyelhető meg prosztatából és vastagbélből származó tumorsejteken. A VIP által kiváltott transzaktiváció hatását vizsgálták ösztrogén-dependens és ösztrogén-independens emlőkarcinómás sejteken is. A VIP egyaránt stimulálta a HER2 és az EGFR foszforilációját, amely VIP receptor antagonistá adásával gátolható volt. Kissejtes tüdőkarcinómán végzett kísérletek szerint a G protein-coupled receptor (GPCR) agonista bombesin és neuromedin B a TGF α szekréción keresztül képes EGFR-t transzaktiválni.

Ugyancsak kissejtes tüdőkarcinómás sejtvonalon végzett vizsgálatokban PACAP-kezelés után is EGFR transzaktiváció volt mérhető, azonban ez elmaradt VIP, PACAP6-38 és anti-TGF α adását követően. Ez a PAC1 és TGF α mediált folyamat ezek alapján a következőképpen írható le: a PAC1/PACAP interakció a cAMP/PKA jelátviteli útvonalon keresztül stimulálja Src/ADAM17-et, megnövelve a TGF α szekréción, amely végül EGFR transzaktivációt eredményez. Anti-AREG adása nem befolyásolta a transzaktivációt, így arra lehetett következtetni, hogy a vizsgálatokban nem az AREG „shedding”-je emelkedett.

Az AREG szerepe az emlőtumorok növekedésében

Az AREG kiemelkedően fontos növekedési faktorként ismert az emlőtumorok proliferációjának és a tumorsejtek EGFR transzaktivációjának szabályozásában. Az EGFR dependens emlőtumorok ugyanis ADAM közvetített EGFR ligand „shedding”-et használnak, így az AREG ígéretes támadáspontja lehet az emlőtumorok kezelésének. Az AREG szerepét az emlőtumor kialakulásában és progressziójában az is bizonyítani látszik, hogy szintje magasabb az invazív, mint az *in situ* duktális karcinómákban, vagy a normál emlőben. *In vivo* kísérletek szerint szuppressziója csökkent tumorformációt eredményez. Érdekes, hogy az AREG a csontmetasztázis kialakulásában is szerepet játszik, mivel az EGFR-on keresztül stimulálja a parathyroid hormone-like hormone (PTHrP) termelést, és ezen keresztül előmozdítja a csontreszorpciót. Eredményeink arra utalhatnak, hogy a PACAP az emlőhámsejteken a VIP-pel ellentétes hatást fejthet ki az EGFR aktivációja tekintetében. A HC11 sejteken általunk észlelt, PACAP mediált AREG és EGF szekrécióncsökkenés ezért a kísérletes daganatkutatás számára is értékes adatként szolgálhat.

ÖSSZEFOGLALÁS

Eredményeink összefoglalása

- Szignifikánsan magasabb PACAP38-IR mértünk a humán kolosztrumban az érett anyatejhez viszonyítva. Kimutattuk a PACAP38 felhalmozódását az anyatejben a szoptatás 10. hónapját követően. Nem találtunk különbséget a mért PACAP38-IR tekintetében az átmeneti tejben, valamint az elő- és az utótejben.
- Pasztörizált és friss tehéntej, valamint tejporok esetében hasonló PACAP38-IR mértünk. A tömegspektrometriás analízis szerint a PACAP38 jelen volt a kereskedelmi forgalomban kapható tehéntej alapú tápszerekben. A hipoallergén, extenzíven hidrolizált tápszerek esetében szignifikánsan magasabb volt a PACAP38-IR, mint a nem hipoallergén tápszermintákban.
- A PAC1 kimutatható volt az összes vizsgált hisztológiai és citológiai mintánkban. A laktáló emlőben fokozott PAC1 receptor expressziót észleltünk a nem laktáló mintákhoz képest.
- Vizsgálatainkban a PACAP nem befolyásolta az emlősejtek differenciációját, sem a differenciációra specifikus β -kazein expresszió, sem pedig a differenciációban szerepet játszó jelátviteli útvonalak (STAT5, p38 MAPK, Akt) szintjén.
- Egyes kemokinek és növekedési faktorok, így a RANTES, IP-10, AREG, EGF és IGFBP3 szekréciója szignifikánsan alacsonyabb volt a differenciált HC11 sejtek médiumában, mint a differenciálatlanokéban.
- A PACAP-kezelt differenciálatlan HC11 sejtek szignifikánsan alacsonyabb szinten szekretálták az AREG-t és az EGF-t.

Az eredmények értékelése

Vizsgálataink bizonyítják, hogy a PACAP biológiailag effektív koncentrációban mérhető az anyatejben és különböző tejalapú készítményekben, ebből következően feltételezhető, hogy hatást gyakorolhat nem csak az újszülött fejlődésére, hanem magára az anyai emlőszövetre is.

Jellegzetes a PACAP koncentrációjának változása az anyatejben a szoptatás során. Az egészen korai (kolosztrum) és késői fázisban (szoptatás terminációs szakasza) magas, a köztes időszakban (érett tej) pedig alacsonyabb, de stabil értékeket mutat. Ezek a változások

bizonyos párhuzamosságot sejtetnek az emlőszövetben lezajló, jól ismert proliferációs és differenciációs folyamatokkal.

A PAC1 receptorok mikroszkópos vizsgálata arra utal, hogy a PAC1 receptor expresszió az emlősejtek konstitucionális sajátossága, az expresszió mértéke azonban függ a sejt származásától (faj, normál, illetve tumoros sejt) és annak differenciáltsági állapotától.

A PACAP-nak az emlőhámsejtek laktogén differenciációra kifejtett hatását igazolni nem tudtunk, de az erre irányuló vizsgáltok során néhány szekretált cito- és kemokin, valamint növekedési faktorra vonatkozóan figyelemre méltó adatokat nyertünk.

Az emlősejtek differenciálódásával összefüggő, a cito- és kemokineket, valamint a növekedési faktorokat érintő szekrécióváltozások nem csak a proliferáció és a differenciáció fázisait követő és azokkal összhangban álló jelenségként érdekesek, hanem alapvető regulatórikus összefüggésekre is rámutathatnak. Ebből a szempontból külön figyelemre méltó lehet a PRL és az AREG feltételezett kapcsolata.

A PACAP által befolyásolt EGF és AREG szekrécióval kapcsolatos irodalmi hivatkozással nem találkoztunk, ezért ez a megfigyelésünk új adatnak számít. A HC11 sejtek viselkedése modellértékű a laktogén differenciálódás vonatkozásában. Arra vonatkozóan azonban nem tudunk nyilatkozni, hogy a HC11 sejteken a növekedési faktorok tekintetében észlelt változások sejtvonal specifikusak, vagy az emlősejtekre általánosan jellemzőek, esetleg alapvető sejtbiológiai jelentőséggel bírnak.

Eredményeink a PACAP regulatórikus funkcióját feltáró további érdekes vizsgálatok alapjául szolgálhatnak (szállítófehérjéjének meghatározása a tejben, befolyása az újszülött PRL szekréciójára és bélflórájára, valamint szerepének tisztázása EGFR aktivációjában).

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló eredeti közlemények

Csanaky K, Doppler W, Tamás A, Kovács K, Tóth G, Reglődi D. (2013) Influence of terminal differentiation and PACAP on the cytokine, chemokine and growth factor secretion of mammary epithelial cells. *J. Mol. Neurosci.* 52, 28-36. **IF: 2,891**

Csanaky K, Reglődi D, Bánki E, Tarcai I, Márk L, Helyes Z, Ertl T, Gyarmati J, Horváth K, Sántik L, Tamás A. (2013) Examination of PACAP38-like immunoreactivity in different milk and infant formula samples. *Acta. Physiol. Hung.* 100, 28-36. **IF: 0,882**

Csanaky K, Bánki E, Szabadfi K, Reglődi D, Tarcai I, Czeglédi L, Helyes Z, Ertl T, Gyarmati J, Szántó Z, Zapf I, Sipos E, Shioda S, Tamás A. (2012) Changes in PACAP immunoreactivity in human milk and presence of PAC1 receptor in mammary gland during lactation. *J. Mol. Neurosci.* 48, 631-637. **IF: 2,891**

Csanaky K, Bánki E, Helyes Z, Börzsei R, Bagoly T, Márk L, Bay C, Gyarmati J, Ertl T, Kiss P, Brubel R, Váczy A, Németh J, Szauer E, Tarcai I, Szalontai B, Heronyányi D, Bilonka Z, Reglődi D, Tamás A. (2012) Hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) kimutatása vér- és tejmintákból várandósság, szülés és szoptatás alatt. *Védőnő.* 22, 5-8.

Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb közlemények

Reglődi D, Gyarmati J, Ertl T, Börzsei R, Bódis J, Tamás A, Kiss P, **Csanaky K**, Bánki E, Bay C, Németh J, Helyes Z. (2010) Alterations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity in the human plasma during pregnancy and after birth. *J. Endocrinol. Invest.* 33, 443-445. **IF: 1,476**

Börzsei R, Márk L, Tamás A, Bagoly T, Bay C, **Csanaky K**, Bánki E, Kiss P, Váczy A, Horváth G, Németh J, Szauer E, Helyes Z, Reglődi D. (2009) Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *Eur. J. Endocrinol.* 160, 561-565. **IF: 3,539**

Az értekezés témájába közvetlenül nem illeszkedő egyéb közlemények

Bánki E, Kovács K, Nagy D, Juhász T, Degrell P, **Csanaky K**, Kiss P, Jancsó G, Tóth G, Tamás A, Reglődi D. (2014) Molecular mechanisms underlying the nephroprotective effects of PACAP in diabetes. *J. Mol. Neurosci.* Közlésre elfogadva **IF: 2,891**

Bánki E, Degrell P, Kiss P, Kovács K, Kemény Á, **Csanaky K**, Düh A, Nagy D, Tóth G, Tamás A, Reglődi D. (2013) Effect of PACAP treatment on kidney morphology and cytokine expression in rat diabetic nephropathy. *Peptides.* 42, 125-130. **IF: 2,522**

Szántó Z, Sárszegi Z, Reglődi D, Németh J, Szabadfi K, Kiss P, Varga A, Bánki E, **Csanaky K**, Gaszner B, Pintér O, Szalai Z, Tamás A. (2012) PACAP immunoreactivity in human malignant tumor samples and cardiac diseases. *J. Mol. Neurosci.* 48, 667-673. **IF: 2,891**

Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Reglődi D, Szabó A, Kovács K, Szalontai B, Sétáló G Jr, Bánki E, **Csanaky K**, Tamás A, Gábrriel R. (2012) Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. *Cell. Tissue. Res.* 348, 37-46. **IF: 3,677**

Idézhető absztraktok

Tamás A, Helyes Zs, Börzsei R, Márk L, Bagoly T, Bay Cs, Gyarmati J, Ertl T, Bódis J, **Csanaky K**, Bánki E, Kiss P, Váczy A, Horváth G, Németh J, Szauer E, Reglődi D. (2010) PACAP-38 in human plasma and milk under physiological and pathological conditions: introductory measurements for possible future clinical diagnostic application. *J. Mol. Neurosci.* 42, 293-294.

Szabadfi K, Atlasz T, Bánki E, **Csanaky K**, Kiss P, Reglődi D, Gonezi P, Szabó A, Mester L, Sétáló Gy, Jakab F, Gábrriel R. (2010) Effects of PACAP in streptozotocin-induced rat model of diabetic retinopathy. *J. Mol. Neurosci.* 42. 305.

Szabadfi K, Bánki E, **Csanaky K**, Kiss P, Reglődi D, Griecs M, Szabó A, Kovács K, Sétáló G, Juhász B, Varga B, Berkics B, Gabriel R, Atlasz T. (2010) Ameliorative potential of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in streptozotocin-induced type I diabetic retinopathy in rats. *Neuropeptides.* 44, 544.

Reglődi D, Kiss P, Szabadfi K, Rác B, Horváth G, Farkas J, Bánki E, **Csanaky K**, Gaal V, Lubics A, Tamás A, Gábrriel R, Atlasz T. (2010) Review of the retinoprotective effects of PACAP. *J. Mol. Neurosci.* 42, 282-283.

Kiss P, **Csanaky K**, Bánki E, Tamás A, Börzsei R, Márk L, Bagoly T, Bay C, Váczy A, Horváth G, Németh J, Czeglédi L, Szauer E, Helyes Z, Reglődi D. (2010) Presence of PACAP-38 in mammalian plasma and milk: From guinea pig to humans. *Acta. Physiol. Hung.* 97, 115.

Témához kapcsolódó publikációk impakt faktora: 11,679

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: 23,66

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom elsősorban témavezetőimnek Reglódi Dóra egyetemi tanárnak és Tamás Andrea egyetemi docensnek, akik támogatták és irányították tudományos tevékenységemet.

Hálás köszönet illeti Wolfgang Doppler egyetemi tanárt, aki lehetőséget biztosított arra, hogy a kísérletek egy jelentős részét az Innsbrucki Egyetem Biokémiai Intézetében végezhettem és munkámhoz, valamint a tézisek összeállításához hasznos tanácsokat adott.

Az értekezésben ismertetett molekulárbiológiai és tömegspektrometriás vizsgálatokban és módszertanuk elsajátításában Márk László és Kovács Krisztina egyetemi docensek, Szabó Alíz egyetemi adjunktus, Maász Gábor és Jámbor Éva PhD hallgatók, Pásztor Anna Irma szakasszisztens, az immuhisztokémiai és immuncitokémiai vizsgálatokban Szereday László egyetemi docens, Czeglédi Levente egyetemi adjunktus, Balogh András egyetemi tanársegéd, Szabadfi Krisztina tudományos munkatárs, Zapf István klinikai orvos és Koloszár Ibolya szakasszisztens, a RIA vizsgálatokban pedig Helyes Zsuzsanna egyetemi tanár és Bagoly Teréz szakasszisztens voltak segítségemre.

Köszönettel tartozom az anyatejminták gyűjtésében nyújtott fáradozásukért a PTE Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársainak, valamint a Pécsi Egyesített Egészségügyi Intézmények védőnőinek.

A vizsgálatok egy részének technikai kivitelezésére a PTE Biokémiai és Orvosi Kémiai, valamint Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében történt, ezért köszönetemet fejezem ki Sümegi Balázs és Berki Tímea egyetemi tanároknak.

TDK-s hallgatóként Bede Brigitta vett közvetlenül részt a kísérletes munkában.

A dolgozat előbírálata kapcsán nyújtott kritikai észrevételekért köszönet illeti Ábrahám István és Veres Balázs egyetemi docenseket, valamint Pétervári Erika egyetemi adjunktust.

Végezetül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani Bánki Eszter PhD-hallgatónak, akivel egyetemistaként közösen dolgoztunk, és aki az ismertetett vizsgálatok megvalósításában is segített.

Támogatók: OTKA (K72592; K73044; K104984; CNK78480), TAMOP (4.2.1.B-10/2/KONV-2010-002; 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007; 4.2.2.B-10/1-2010-0029; 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0024; Apáczai Csere János ösztöndíj: TAMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001), Arimura Foundation, PTE ÁOK Research Grant (KA-34039/10-10; KA-34039/10-26), PTE-MTA “Lendület”, Bolyai János Kutatási Ösztöndíj, Richter Foundation