

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

**PACAP (HIPOFÍZIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ
POLIPEPTID) FOGFEJLŐDÉSRE GYAKOROLT
HATÁSAINAK VIZSGÁLATA ÁLLATMODELLEN**



Dr. Sándor Balázs

Témavezetők:

Dr. Tamás Andrea, egyetemi docens (PTE ÁOK Anatómiai Intézet)

**Dr. Nagy Ákos, egyetemi docens (PTE KK Fogászati- és Szájsebészeti
Klinika)**

Programvezető: Dr. Csernus Valér, egyetemi tanár

Doktori iskola vezetője: Dr. Lénárd László, egyetemi tanár

Pécs, 2017.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	7
1.1. PACAP (hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid) és receptorai	7
1.2. A PACAP élettani szerepe	8
1.3. PACAP-génhiányos egerek	9
1.4. Fogak fejlődésének alapjai	11
1.5. A fogak keményszöveteinek összetétele	14
1.6. A fogfejlődés molekuláris szabályozása	17
1.7. PACAP-pal kapcsolatos kutatások a fogakkal összefüggésben	20
2. Célkitűzések	22
3. Anyagok és módszerek	23
3.1. Hét napos vad-típusú és PACAP-génhiányos egerek fejlődő moláris fogainak összehasonlítása	23
3.1.1. Metszetkészítés morfometriai analízishez és Raman mikroszkópiához	23
3.1.2. Morfometriai analízis	24
3.1.3. Strukturális analízis Raman mikroszkópiával	25
3.1.3.1. Raman spektroszkópia alapjai, mint a fogak szerkezeti összetételének vizsgálati lehetősége	25
3.1.3.2. Strukturális analízis Raman mikroszkópiával 7 napos egerek molárisaiban	26
3.1.4. Immunhisztokémiai vizsgálat	28
3.2. Felnőtt (1 éves) PACAP-génhiányos és vad-típusú egerek alsó metszőfogainak strukturális és morfometriai összehasonlítása	30
3.2.1. Mikro-CT-vel végzett morfometriai és denzitometriai vizsgálat	30
3.2.2. Strukturális analízis Raman mikroszkópiával 1 éves egerek alsó metszőfogaiból	32
4. Eredmények	35
4.1. Hét napos egerek fejlődő moláris fogainak vizsgálata	35
4.1.1. Morfometriai analízis	35

4.1.2. Strukturális analízis Raman mikroszkópiával 7 napos egerek molárisaiból	37
4.1.3. Immunhisztokémiai vizsgálat	39
4.2. Felnőtt (1 éves) PACAP-génhiányos és vad-típusú egerek alsó metszőfogainak strukturális és morfológiai összehasonlítása	41
4.2.1. Mikro-CT-vel végzett morfológiai és denzitometriai vizsgálat	41
4.2.2. Strukturális analízis Raman mikroszkópiával 1 éves egerek alsó metszőfogaiból	43
5. Megbeszélés	45
6. Összefoglalás	55
7. Irodalomjegyzék	56
8. Ph.D. értekezés alapjául szolgáló saját közlemények, egyéb közlemények	74
8.1. Ph.D. értekezés alapjául szolgáló saját és egyéb közlemények	74
8.2. Egyéb közlemények	74
9. Köszönetnyilvánítás	75

Rövidítések jegyzéke

AC: adenilát-cikláz

Barx: barH-like homeobox gén

BMP: csont morfogenteikus fehérje (bone morphogenetic protein)

BMPR: BMP receptor

BDNF: agyi neurotrofikus faktor (brain-derived neurotrophic factor)

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

CREB: cAMP-reszponzív elem kötő fehérje (cAMP response element-binding protein)

DEJ: dentin-zománc junkció (dentin-enamel junction)

DGP: dentin glikoprotein (dentin glycoprotein)

DMP1: dentin mátrix protein-1 (dentin matrix protein-1)

DPP: dentin foszfoprotein (phosphoprotein)

DSP: dentin szialoprotein (dentin sialoprotein)

DSPP: dentin szialofoszfoprotein (dentin sialophosphoprotein)

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

FGF: fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor)

FSH: follikulusztimuláló hormon (follicle stimulating hormone)

FWHM: félértékszélesség (full width at half maximum)

GHRH: növekedési hormont felszabadító hormon (growth hormone-releasing hormone)

Gli: glioma asszociált onkogén (glioma-associated oncogene)

GPCR: G-proteinhez kapcsolt receptor (G-protein-coupled receptor)

HAP: hidroxipatit

HERS: Hertwig-féle hámhüvely (Hertwig's epithelial root sheath)

IP3: inozitol-trifoszfát (inositol trisphosphate)

LEF1: limphoid-enhancer-kötő faktor 1 (lymphoid enhancer-binding factor 1)

Lhx: lim homeobox gén

Msx: muscle segment box gén

NCP: nem-kollagén fehérjék (non-collagenous protein)

NGF: idegnövekedési faktor (nerve growth factor)

NT: neurotrofin

PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide)

PACAP KO: PACAP-génhiányos (PACAP knockout)

PAC1R: PACAP specifikus transzmembrán G-protein receptor

Pax: paired box gén

PBS: foszfát-pufferelt sóoldat (phosphate-buffered saline)

PCR: polimeráz-lánreakció (polymerase chain reaction)

PKA: protein kináz A (protein kinase A)

PLC: foszfolipáz C (phospholipase C)

PTCH1: protein patched homológ 1 (SHH receptor)

SHH: sonic-hedgehog fehérje (shh: sonic-hedgehog gén)

SIBLING: kis integrin kötő N-glikolizált protein

TMD: ásványi anyag sűrűség (tissue mineral density)

TNF: tumor nekrosis faktor

VIP: vazosaktiv intesztinalis peptid (vasoactive intestinal peptide)

VPAC: PACAP-ot és VIP-t azonos affinitással kötő G-protein receptor

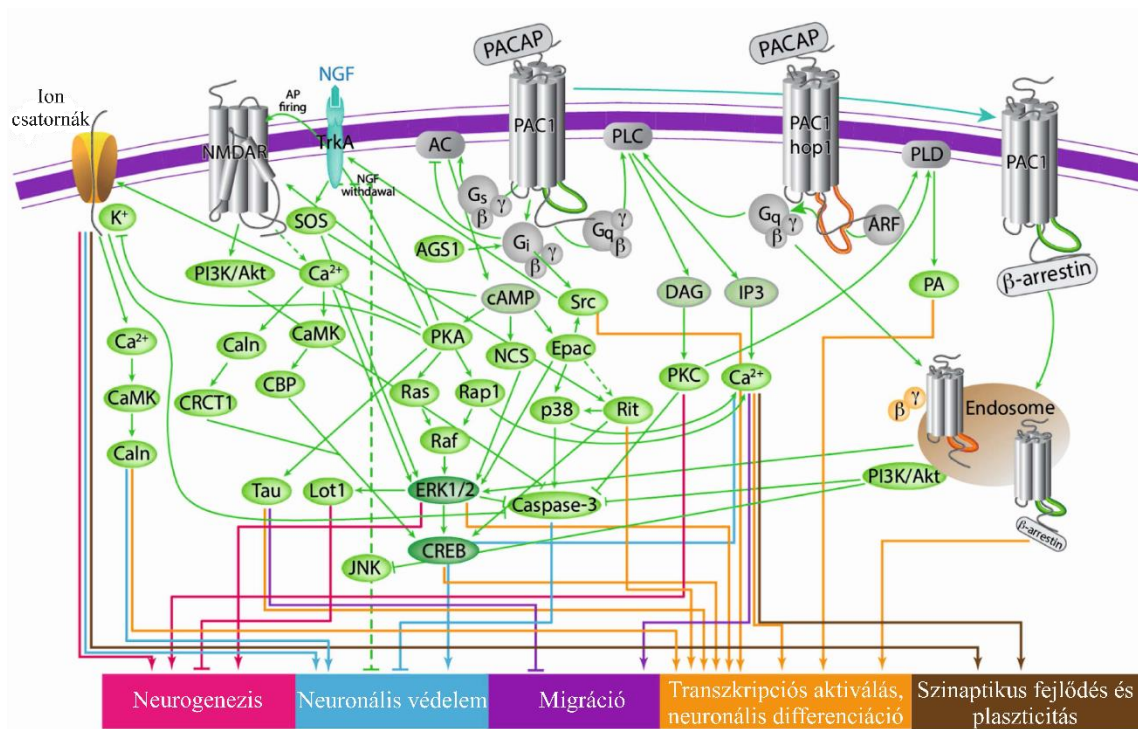
WNT: Wnt/Wingless notch fehérjecsald

1. Bevezetés

1.1. PACAP (hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid) és receptorai

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet (pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-PACAP) 1989-ben birka hypothalamusból izoláltak Miyata és munkatársai ciklikus adenozin-monofoszfát (cAMP) aktiváló hatása alapján (Miyata et al. 1989, 1990; Arimura et al. 1994; Arimura, 1998, 2007). A PACAP a vazóaktív intesztinális peptid (VIP)/szekretin/növekedési hormon felszabadító hormon (growth hormon releasing hormon-GHRH)/glükagon szuperfamilia tagja. A szuperfamilia tagjai közül a PACAP nukleotid és aminosav szekvenciája, valamint hossza a legkonzerváltabb. Két bioaktív variánsa ismert: a rövidebb láncú PACAP-27 és a hosszabb PACAP-38. A PACAP-38 a domináns forma, míg a PACAP-27 az összmennyiség kevesebb, mint 10%-át teszi ki. A PACAP-27 szekvenciája 68%-os homológiát mutat a VIP-vel (Vaudry et al. 2000, 2009; Reglodi et Tamas, 2016). A PACAP receptorai a G-proteinhez kapcsolt receptorok (G-protein coupled receptor-GPCR) családjába tartoznak (Stoffel et al. 1994; Laburthe et Couvineau, 2002). Három, eddig ismert receptora közül a PAC1 receptor (PACAP receptor 1-es típus, PAC1R) a PACAP-ra nézve nagy affinitással és VIP tekintetében alacsony affinitással rendelkezik. A VPAC1 (VIP/PACAP receptor 1-es típus) és a VPAC2 (VIP/PACAP receptor 2-es típus) receptorok egyforma affinitással kötik a PACAP-ot és a VIP-t (Vaudry et al. 2000, 2009). Alapfelépítését tekintve a GPCR-ok 7 transzmembrán doménből, három extracelluláris és három intracelluláris hurokból állnak. A harmadik intracelluláris hurok, valamint az extracelluláris domén alternatív splicing-ja következtében a PAC1R-nak számos variánsa ismert, mely hozzájárul a PACAP pleiotrop hatásához. Számos intracelluláris szignáltranszdukciós kaszkád szabályozásában szerepet játszik. A legjobban tanulmányozott útvonalai az adenilát-cikláz (AC) és a foszfolipáz C (PLC) inozitol trifoszfát (IP3) útvonalak. Szeretágazó hatása e két fő jelátviteli kaszkádon keresztül zajlik, mely neuronális sejtekben hatással van többek között a neurogenesisre, neuronális védelemre, migrációra, differenciációra és a szinaptikus kapcsolatok kialakulására (1. ábra) (Journot et al. 1994; Arimura 1998; Vaudry, 2000; Blechman et Levkowitz, 2013). A PACAP-ot kezdetben az idegrendszerben, a gasztrointesztinális traktus teljes hosszában és az endokrin mirigyekben vizsgálták („brain-gut peptide”). Legnagyobb mennyiségben a központi és perifériás idegrendszerben található, de a PACAP és receptorai jelenlétét többek közt a légző, urogenitális, kardiovaszkuláris szervrendszerben, fülben valamint a fogak pulpájában

és a parodonciumban is (Vaudry et al. 2000, 2009; Ichikawa et Sugimoto, 2003; Nonaka et al. 2013; Reglodi et Tamas, 2016).



1. ábra: PAC1 receptor mediálta jelátviteli kaszkádok és azok különböző neuronális hatásai (Blechman et Levkowitz, 2013)

1.2. A PACAP élettani szerepe

A PACAP egy pleiotrop, multifunkcionális neuropeptid. Szerepet játszik élettani folyamatok szabályozásában, mint például a termoreguláció, motoros aktivitás, táplálkozás és a cirkadián ritmus (Mounien et al. 2009; Vaudry et al. 2009; Diane et al. 2014). Neurotrófikus, neuroprotektív és általános citoprotektív hatásai mellett antiinflammatorikus és antiapoptotikus hatásai ismertek. A PACAP a G-proteinhez kapcsolt receptor mediált neurotrofinok prototípusának tekinthető (Ravni et al. 2006). A PACAP trofikus hatását kimutatták neuronokon és gliasejteken a perifériás és központi idegrendszerben. A PACAP az asztrociták, neuroblasztok és őssejtek proliferációját stimulálja, míg az agykéreg prekursor sejtjeinek és a velősejtek proliferációját gátolja. In vitro a PACAP neurogén differenciációt indukál

különböző típusú őssejtekben (Lindholm et al. 2016). A PACAP neurotrófikus hatásait elsőként PC12 (patkány mellékvesévelő phaeochromocytoma) sejtvonalon figyelték meg. Azóta ezt a sejtvonalat széles körben alkalmazzák a PACAP indukált sejt differenciáció és a sejt túlélésben résztvevő jelátviteli utak karakterizálásához. A fejlődő agy germinatív területein található nagy mennyiségű PACAP és PACAP receptor a központi idegrendszer fejlődésében betöltött fontos szerepére utal. Az idegrendszer fejlődése során a PACAP neuroblaszt differenciációt indukál. Patkány kisagyban megfigyelt PACAP expresszió a Purkinje sejtekben, PAC1, VPAC1 receptor expresszió a szemcsejtekben, valamint a PACAP hatása a szemcsejtek túlélésére, migrációjára és differenciációjára a PACAP jelentős szabályozó szerepére utal a kisagykéreg hisztogenezisében (Vaudry et al 2009; Ravni et al. 2006; Botia et al. 2007). A PACAP védő hatást fejt ki a neuronokat érő káros behatásokkal szemben is, mint oxidatív stressz, neurodegeneratív betegségek vagy traumás agysérülés esetén (Somogyvari-Vigh et Reglodi, 2004; Tamas et al. 2012a; Lee et Seo, 2014; Shioda et Nakamachi, 2015; Reglodi et al. 2015; Reglodi et Tamas, 2016). Számos vizsgálat igazolta védő hatását retinakárosodás esetén (Atlasz et al. 2016; Kvarik et al. 2016; Shioda et al. 2016; Werling et al. 2016). Általános citoprotektív hatását igazolták az idegrendszeren kívül is, mely feltételezhetően antiinflammatorikus és antiapoptotikus hatásának köszönhető. Védő hatásait kimutatták például a szív-ér rendszerben, a gasztrointesztinális rendszerben és a vesében is (Gasz et al. 2006; Ferencz et al. 2010; Mori et al. 2010; Racz et al. 2010; Nedvig et al. 2013; Heimesaat et al. 2014; Sakamoto et al. 2015).

1.3. PACAP-génhiányos egerek

A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Anatómiai Intézetében több éve zajlanak kísérletek homo- és heterozigóta PACAP KO egerekkel. A PACAP-génhiányos (PACAP KO) egerekkel lehetőségünk van az endogén PACAP szerepének vizsgálatára fiziológiás és patológias körülmények között (Hashimoto et al. 2001).

A vad-típusú, heterozigóta és homozigóta PACAP-génhiányos egerek között makroszkópos morfológiai különbség nem mutatkozik, azonban finomabb módszerekkel (immunhisztokémia, elektronmikroszkópia) és funkcionális vizsgálatokkal jelentős eltérések igazolhatók. Az endogén PACAP hiánya biokémiai, magatartásbeli és funkcionális elváltozásokhoz vezet. A hetero- és homozigóta PACAP KO egereket magatartás- és memóriazavar, fertilitási zavar, metabolikus elváltozások, fokozott inzulin érzékenység,

termoregulációs és légzési zavarok jellemzik, melyek részben a magasabb mortalitásért is felelősek (Gray et al. 2002; Cummings et al. 2004; Vaudry et al. 2005; Adams et al. 2008; Reglodi et al. 2012, Reglodi et Tamas, 2016).

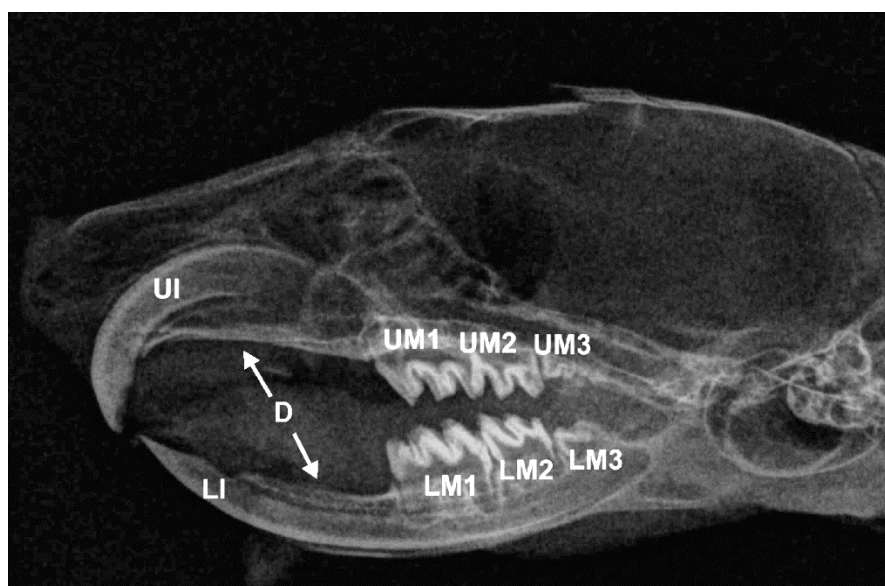
A homozigóta PACAP-génhiányos egereket érő káros hatások esetén nagyobb mértékű elváltozást írtak le az idegrendszerben, gasztrointesztinális rendszerben és a vesében vad-típusú társaikhoz képest (Ferencz et al. 2010; Laszlo et al. 2014; Reglodi et Tamas, 2016). Bilaterális carotis communis lekötetést követően iszkémiás retina degeneráció nagyobb mértékű a PACAP KO egerekben a vad-típusú egerekhez képest (Szabadfi et al. 2012). Stroke-t modellező állatkísérletekben a vad-típusú és heterozigóta PACAP-génhiányos egerekkel összehasonlítva, a PACAP KO egerekben nagyobb mértékű károsodás figyelhető meg, és az ennek következményeként kialakuló neurológiai tünetek is súlyosabbnak bizonyultak (Chen et al. 2006; Ohtaki et al. 2006).

A PACAP-génhiányos egerekben neuronális fejlődési zavar és myelinizációs eltérések figyelhetők meg a vad-típusú egerekhez képest (Vincze et al. 2011; Reglodi et al. 2012; Tajiri et al. 2012). PACAP-génhiányos egerekben, a kisagyban a szemcsesejtek differenciációja késik és az apoptózis fokozott az ontogenezis során (Allais et al. 2007). A vad-típusú és PACAP-génhiányos egerek agyának proteomikai összehasonlítása is számos eltérést igazolt (Maasz et al. 2014). Az endogén PACAP hatásait a belső fülben vizsgálva kutatócsoportunk a szőrsejtekben emelkedett Ca^{2+} -kötő fehérje expressziót mutatott ki PACAP KO egerekben, mely a szőrsejtek károsodására utalhat (Tamas et al. 2012b; Nemeth et al. 2014).

A fogak az első garatív ectodermájából és dúcléc eredetű ectomesenchymális sejtekből fejlődnek (Nanci, 2013a, 2013b). Az ektodermális eredet alapján feltételeztük, hogy a PACAP-génhiányos egerekben a PACAP hiánya a neuronális fejlődés mellett hatással lehet a fogak fejlődésére is.

1.4. Fogak fejlődésének alapjai

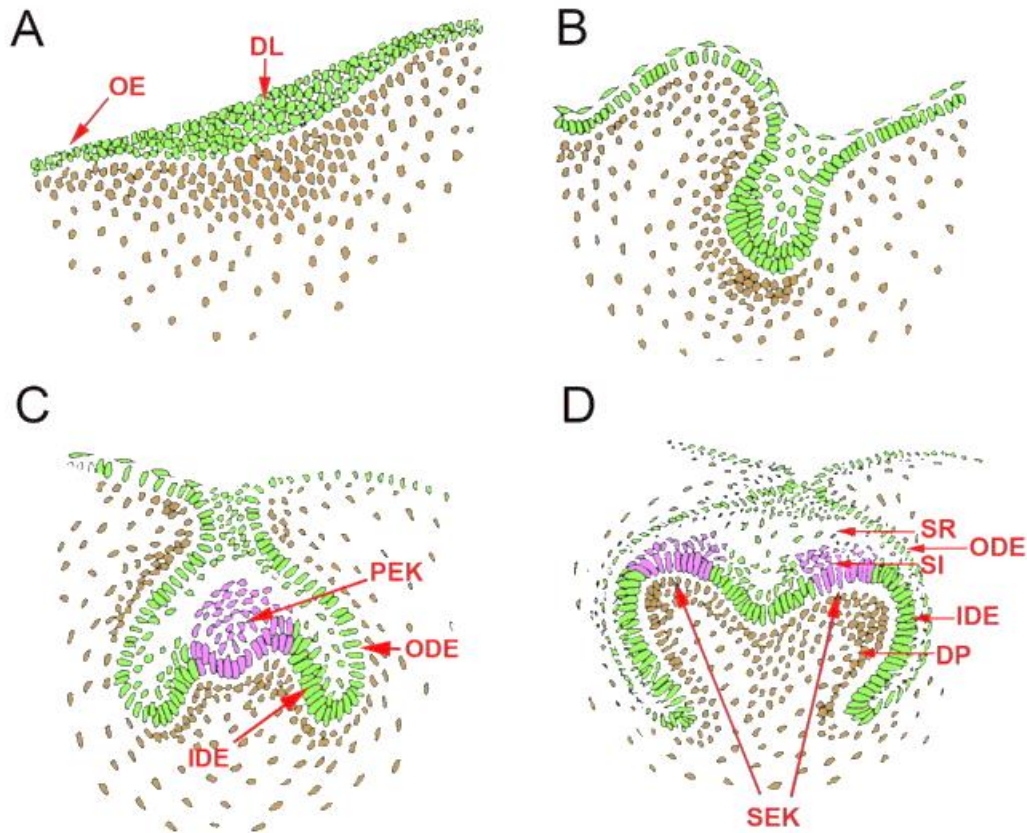
Az emberi és rágcsáló fogazat, bár több szempontból különbözik egymástól, fejlődésük hasonló. Mivel fogfejlődés stádiumai konzerváltak a fogazattal rendelkező gerincesekben, az egereken végzett vizsgálatok eredményei más gerinces állatok fogfejlődéséről is információt nyújt. A rágcsálók fogazata nagymértékben redukált. Minden kvadránsban egy folyamatosan növekvő metsző található, melyet diasztéma (fogak közötti rés) választ el három moláris fogtól (2. ábra) (Tucker et Sharpe, 2004; Caton et Tucker, 2009).



2. ábra: Három hetes felezett egérfejről készült röntgenfelvétel. UI: felső metszőfog, LI: alsó metszőfog, UM1: felső első őrlő fog, UM2: felső második őrlő fog, UM3: felső harmadik őrlő fog, LM1: alsó első őrlő fog, LM2: alsó második őrlő fog, LM3: alsó harmadik őrlő fog, D: diasztéma.

A fogfejlődés négy fő egymást követő részre osztható: a fogléc kialakulása, a fogcsíra kialakulása, sapka stádium és a harang stádium (3. ábra). Az elemi szájöböl kettő-három sejtréteg vastagságú epitheliális borítása alatt dúcléc eredetű mesenchymális sejtek találhatók (ectomesenchyma). A fogfejlődés az epithelium és az ectomesenchyma közötti, szigorúan szabályozott egymásra hatás következménye (Tucker et Sharpe, 2004; Nanci 2013a; He et al.

2016). Az embrionális fejlődés során a hám patkó alakban megvastagszik a későbbi mandibula és maxilla területén a fogív alakjának megfelelően. A hámmegvastagodás ketté válva létrehozza az ajaklécet és a foglécet. A foglécen az ectoderma lokális megvastagodása létrehozza a dentális placodokat. A dentális placodok funkcióit részletesen eddig csak egerekben tanulmányozták, feltehetően a fogtípusok kialakításában játszanak szerepet (egerekben a metszők és az első moláris fogak területén található). Az epithelium további proliferációja valamint az ectomesenchymális sejtek akkumulációja létrehozza a fogcsírákat (3. ábra B). A fogtípusok (pl.: moláris vagy metszőfog) közötti morfológiai különbségek a csíra-sapka stádium közötti átmenet során jelennek meg. Az epithelium további proliferációja az ectomesenchyma kondenzációjához vezet, létrehozva a sapka stádiumot. A fogcsíra a növekedése során lefűződik a foglécről. Ebben a korai stádiumában már azonosíthatóak a fogat és tartószerkezetét létrehozó elemek (szöveti differenciáció). Az „epitheliális kinövést” zománcszervnek nevezzük, mely a zománc képzéséért felelős. A kondenzálódott ectomesenchymát a zománcszerv alatt dentális papillának nevezzük, melyből dentin és a pulpa fejlődik. Az ectomesenchymát, mely körülveszi a csírákat, folliculusnak nevezzük, és a fogak tartószerkezetének kialakulásáért felelős (3. ábra C). A sapka stádiumban megjelenő zománccsomók a zománcszerven belül található, nem osztódó sejtek tömörülése. Szerepe nem teljesen tisztázott, kezdetben minden csírában megtalálható a sapka stádiumban (primer zománccsomó), majd eltűnésüket követően a fejlődő moláris fogak csücskeinek területén megjelenik a másodlagos zománccsomó. Feltételezhetően a moláris fogak csücsökfejlődésének irányításában játszik szerepet (Nanci, 2013b). A fejlődő fog koronája, további növekedés során, a harang stádiumban éri el végleges formáját (morfodifferenciáció), valamint további szöveti differenciáció révén megjelennek az ameloblasztok és az odontoblasztok. A dentális lamina és a csíra közötti kapcsolat megszűnik, így a fogcsíra az orális epitheliumtól külön válik. Következő lépésként megkezdődik a fogak keményszöveteinek kialakulása.



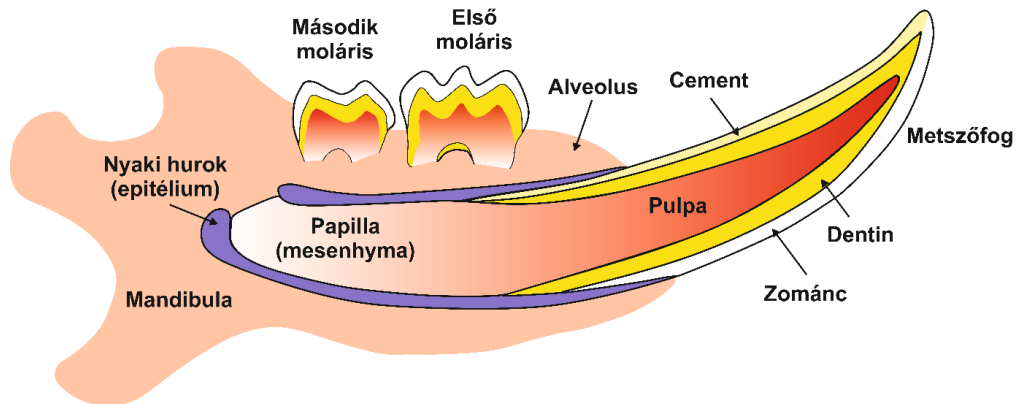
3. ábra: Moláris fog fejlődésének négy fő stádiuma egérben. A: fogléc a 12. napon; B: csíra stádium a 13-14. napon; C: sapka stádium a 15-16. napon; D: harang stádium a 17. napon; DL: dentális lamina, OE: orális epithelium, PEK: elsődleges zománc csomó, ODE: külső zománchám, IDE: belső zománchám, SR: zománcpulpa (reticulum stellatum), SI: stratum intermedium, DP: dentális papilla, SEK: másodlagos zománc csomó (Lesot et Book, 2009).

Harang stádiumban a kalcifikáció megindulását követően a dentális papillát már dentális pulpának nevezzük. A külső és belső zománchám a „nyaki hurokban” (cervical loop) található. Proliferációjuk során a két sejtréteg létrehozza a Hertwig-féle hámhüvelyt (HERS). A HERS körülvevő a pulpát, odontoblaszt differenciációt indukál, így a gyökérfejlődés is kezdetét veszi (Lesot et Brook, 2009; Nanci, 2013b). A gyökér a fognak a cementtel fedett része. A gyökérfejlődés során az odontoblasztok által termelt nem mineralizált dentin mátrix (predentin)

felületén cementoblaszt differenciáció figyelhető meg a HERS dezintegrálódását követően (Nanci, 2013b).

1.5. A fogak keményszöveteinek összetétele

Az érett fogban megkülönböztetünk anatómiai koronát és anatómiai gyökeret. Az anatómiai korona a fog azon része, ahol dentint normálisan zománc borítja, az anatómiai gyökeret cement veszi körül (Scheid, 2007). A rágcsálók metszőfoga azonban ettől eltér. A metszők labiális felszínét zománc borítja, míg orálisan cement borítás található (4. ábra).

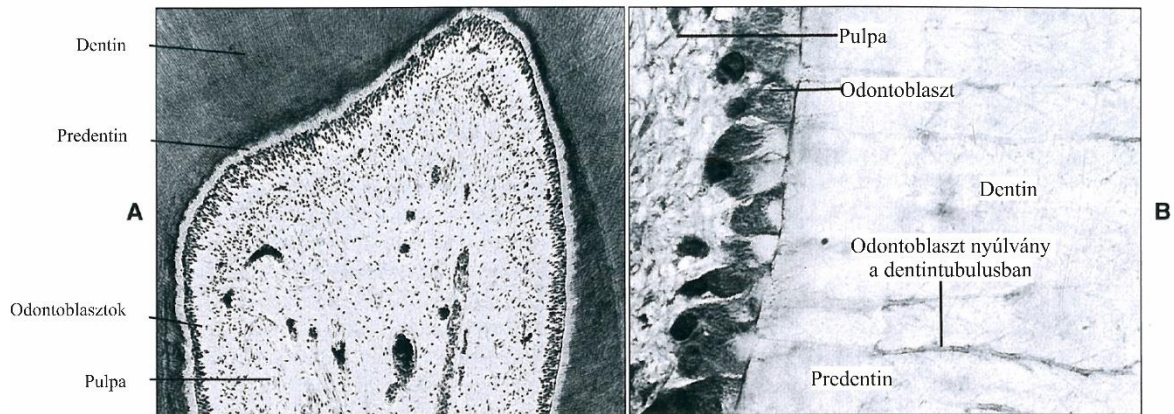


4. ábra: Egy rágcsáló metszőfogának vázlatos szerkezete Sun et al. (2012) ábrája alapján módosítva. Az ábrán a fejlődésben lévő első és második moláris fogak láthatók, a csontban fejlődő harmadik moláris nincs feltüntetve.

A fogzománc az emlősök legmagasabb ásványi anyag tartalmú szövete. Az érett zománc szerves anyag tartalma kevesebb, mint 1%, 96%-a szervetlen anyag és 3%-a víz. Az anorganikus fázist főleg hidroxipatit (HAP-kalcium-foszfát kristály) alkotja. A kristályok elrendeződését a fejlődés során az ameloblasztok határozzák meg. Ennek megfelelően megkülönböztetjük a zománcprizmát, mely az ameloblasztok Tomes nyúlványainak disztális végén termelődik, illetve interprizmatikus zománcot, mely a nyúlványok laterális felszínén képződik. Összetétel tekintetében nincs különbség, csak a kristályok orientációjában. A kristályrácsba főleg HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , Na^+ , F^- ionok inkorporálódnak (Simmer et Fincham, 1995; Nanci, 2013c; Dessombz et al. 2016). A zománc fejlődésétől a maturációig a karbonát tartalom folyamatosan csökken. A karbonát tartalom befolyásolja a zománc fizikai és kémiai tulajdonságait (Sydney-Zax et al. 1991). A zománc szerves anyag mátrixát nem-kollagén fehérjék alkotják, melynek 90%

amelogenin, 10%-a nem-amelogenin fehérjék, mint az enamelin vagy az ameloblastin (Nanci, 2013c). Ezen fehérjéknek fontos szerepe van a zománc fejlődésében, felelősek a kristályok hossz- és vastagságbeli növekedéséért (Margolis et al. 2006; Mihiu et al. 2008). Az amelogenin két jól elkülönülő „önszerveződő” részt tartalmaz. Az N-terminális oldali domén-A hidrofób és a C-terminális oldali domén-B hidrófil, mely a hidroxipapatit kristályhoz kapcsolódni képes. A domén-B szerepe feltételezhetően a zománcfejlődés korai stádiumában jelentős (Bansal et al 2012). Több hierarchikus lépésen keresztül az amelogenin önszerveződése (self-assembly) révén 15-20 nm méretű nanogömbökké (nanosphere) rendeződik, mely létfontosságú a zománc kristályszerkezetének kialakulás során (Beniash et al. 2012). Az amelogenin gének az X és Y kromoszómákon helyezkednek el. Emberben az Y kromoszómán található „*AMELY*” gén 10%-ban expresszálódik, míg egérben tisztán az X kromoszómán található „*AMELX*” expresszálódik. A zománc mátrixban az amelogenin számos izoformája ismert. Az izoformák kialakulásának 3 módját feltételezik: 1. a szex kromoszómákon található két különböző génkészlet; 2. az „alternatív splicing” következtében alakulnak ki; 3. szekréción követő proteolitikus folyamatok következtében alakulnak ki. Ezen izoformák funkciója még nem tisztázott, a zománc mátrix kialakításán kívül feltételezhetően jelátviteli szerepük is van a fogak morfogenezise során az odontoblaszt differenciációban, az amelogenin szekréción szabályozásában és a paradontális hámtapadás kialakítása során (Veis, 2003; Gibson, 2011; Bansal et al. 2012; Nanci, 2013c)

A dentin része az úgynevezett „pulpa-dentin komplexnek”. Csont jellegű szövet, melyet a teljes vastagságában áthaladó szorosan elhelyezkedő dentin tubulusok jellemeznek. A dentin tubulusokban az odontoblasztok nyúlványai (Tomes-féle rostok) találhatóak. Az odontoblasztok sejttestei a dentin belső falán helyezkednek el, a pulpa legkülső rétegét alkotva. Az odontoblasztok felelősek a dentin folyamatos képzéséért. A zománccal ellentétben, ahol a fejlődés során a kristálynövekedés az ameloblasztok szekréción felszínén történik, a dentin esetén elkülönül egy nem kristályosodott mátrix a dentin és odontoblaszt réteg között, melyet predentinnek nevezünk (5. ábra) (Nanci, 2013d).

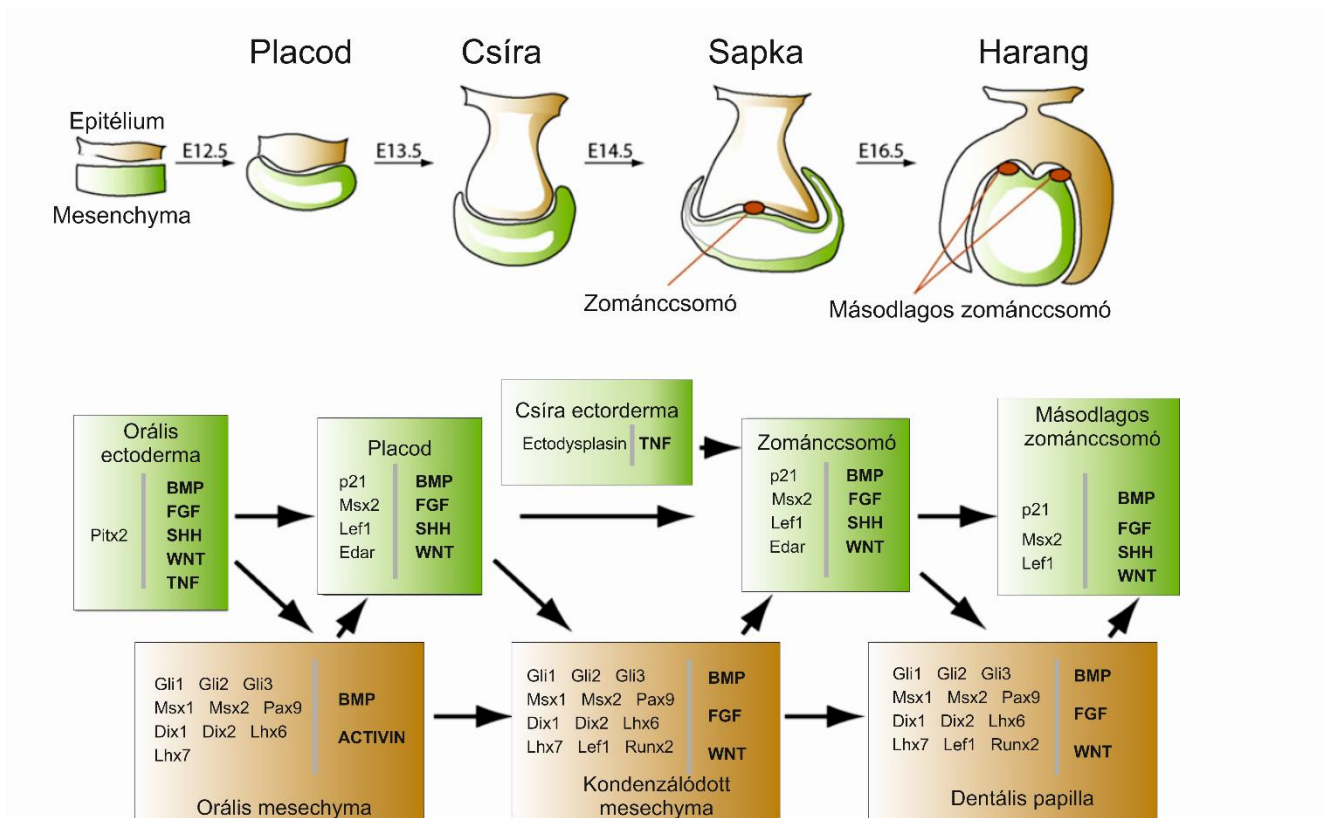


5. ábra. A dentin-pulpa komplex mikroszkópos képe. A pulpa külső falán elhelyezkedő odontoblasztok felelősek a dentin képzéséért (Nanci, 2013d).

A dentin alkotja a fog mineralizált szöveteinek fő tömegét. A zománcnál kevésbé, a csontszövetnél jobban mineralizált. Az érett dentinben, tömegszázalék tekintetében körülbelül 65-70%-ban anorganikus anyagok, 20%-ban organikus összetevők és 10%-ban víz található. A szeretlen állományt a zománchoz hasonlóan főként kalcium-hidroxiapatit és kalcium-karbonát alkotja. Szerves állományának nagy részét I-es típusú kollagén teszi ki (90%), emellett számos nem-kollagén, csont és dentin specifikus fehérjék találhatóak, melyek főként a dentin szialofoszfoprotein (DSPP) származékai. A DSPP származékai proteolízis révén a dentin szialoprotein (DSP), dentin foszfoprotein (DPP) és a dentin glikoprotein (DGP) (Yamakoshi, 2009). A kollagén a dentin szerkezeti vázát adja, míg a nem-kollagén fehérjék a kristályosodás szabályozásában játszanak szerepet (Goldberg et al. 2011; Nanci, 2013d). A DPP a magas aszparaginsav és foszfoszerin tartalma miatt a legsavasabb, polianionos fehérje, amit valaha azonosítottak. A DPP sok negatív töltésű régiója nagy mennyiségű kalcium megkötésére képes. A nagyfokú kalcium affinitás alapján a dentin mineralizáció egyik legfontosabb eleme, mely szerepet játszik a hidroxiapatit kristályok nukleációjában és növekedésében (Yamakoshi, 2009; Prasad et al. 2010).

1.6. A fogfejlődés molekuláris szabályozása

Azon konzervált jelátviteli utak, melyek az embrionális fejlődés szabályozásáért felelősek, szükségesek a fogak fejlődéséhez is (Tummers et Thesleff, 2009). A fogfejlődés kezdeti iniciációját és morfogenezisét ugyanazon molekulák szabályozzák, mint egyéb ektodermális szervek fejlődését, azonban sok más epitheliális függeléssel szemben, a fogak regenerációra nem képesek (Jussila et Thesleff, 2012). Az orális epithelium és a mesenchyma közötti folyamatos és kölcsönös interakció döntő jelentőségű a fogfejlődés beindításában (Thesleff, 2014). Ezidáig több mint 300 gént azonosítottak fogfejlődésben (Thesleff, 2006). Jelentős előrelépésnek tekinthető az epitheliális-mesenchymális kommunikációban kulcsfontosságú transzkripciós faktorok és jelátviteli molekulák azonosítása, mint a csont morfogenetikus fehérjék (bone morphogenetic protein-BMP), fibroblaszt növekedési faktorok (fibroblast growth factor-FGF), sonic-hedgehog (SHH) és a Notch és Wingless fehérjecsaldok (WNT) (6. ábra). Ezen jelátviteli utak gátlásával a fogfejlődés késleltethető, vagy teljesen megállítható (Jernvall et Thesleff, 2012). További jelentős szerepet tulajdonítanak a TNF (tumor nekrosis faktor) fehérjecsaldnak és az Ectodysplasin-nak (TNF fehérjecsald) a fogfejlődés szabályozásában. Az Ectodysplasin jelátviteli útvonal mutációja a fog csírájának hiányához, kisebb fogak és redukált csücskök fejlődéséhez vezet. Túlzott expressziója esetén számfeletti csücsköket és esetenként számfeletti fogakat figyeltek meg (Tucker et al. 2004).



6. ábra: Fogak fejlődésének molekuláris szabályozása a fogfejlődés különböző stádiumaiban. Szekvenciális és reciprok jelátviteli útvonalak (BMP, FGF, SHH, WNT, ACTIVIN, TNF) a mesenchyma és az epithelium között, melyek specifikus transzkripciós faktorok expresszióját szabályozzák. Módosított ábra Rufini et al (2011) alapján.

Az SHH egy széles körben tanulmányozott ágens, melynek jelentős szerepe van a fogfejlődés iniciációjában, növekedési faktorként a fog méretét, mintázatát és morfogenezisét is befolyásolja (Fisher et Howie, 2006). Egérben az SHH receptorán keresztül (PTCH1-Protein patched homolog 1) a Gli transzkripciós faktorok (Gli1, Gli2, Gli3) aktivációjához vezet. Az SHH jelátviteli út génjeinek expressziója a fejlődő fogcsíra területén az útvonal korai fogfejlődésben betöltött szerepére utal (Hardcastle et al. 1998). Ezen útvonal szabályozza többek közt az ameloblasztok differenciációját, proliferációját, növekedését és polaritását (Gritli-Linde et al. 2002). Számos BMP faktor, mint a BMP2, BMP3, BMP4 vagy a BMP7, expresszálódik fogfejlődés során a mesenchymában és az epitheliumban. Meghatározó szerepük van fogcsírák helyének és fajtájának kialakulásában, a fejlődés progressziójában egészen a

fogak előtöréséig. Korai fejlődési iniciációs stádiumban BMP4, BMP2 és BMP7 expresszálódik az epitheliumban. Későbbiekben BMP4 expresszió figyelhető meg a mesenchymában, majd a preodontoblasztokban. Az odontoblasztok terminális differenciációja során fokozott BMP2 aktivitás figyelhető meg (Nie et al. 2006, Wang et al. 2012).

A WNT jelátviteli útvonalban megkülönböztetjük a β -catenin függő kanonikus útvonalat, illetve a nem-kanonikus β -catenin független, vagy a kanonikus útvonalat gátló jelátvitelt. Ezek alapján két csoportba sorolhatjuk a fehérjéket. A kanonikus β -catenin függők, mint a WNT1, WNT2, WNT3, WNT3a és a WNT7a. A nem kanonikus WNT-k, mint a WNT4, WNT5a, WNT5b, WNT6 és WNT11 (Veeman et al. 2003; Tamura et Nemoto, 2016). A kanonikus útvonalban a β -catenin transzlokálódik a sejtmagba, ahol LEF1 (Lymphoid enhancer factor 1) transzkripció faktorhoz kapcsolódva szabályozza a WNT célgének expresszióját (Komiyama et Habas, 2008; Grumolato et al. 2013). LEF1 jelentőségét a fogfejlődésben igazolja, hogy hiányában nem alakul ki fogcsíra, megáll a fogfejlődés. LEF1 hiányos szövettenyészetben, exogén rekombináns FGF4 alkalmazása esetén a fogcsíra fejlődik. Ezek alapján feltételezhető, hogy fogfejlődés során az FGF4 cél faktora a LEF1 fehérjének (van Genderen et al. 1994; Kratochwil et al. 2002; Boras-Granic et al. 2006). A nem-kanonikus útvonalból a WNT5a erősen expresszálódik a dentális papillában és feltehetően a differenciáció szabályozásában játszik szerepet, hiányában abnormális csücskök fejlődnek. WNT6 feltehetően odontogén differenciációt indukál a dentális papillában (Wang et al. 2010).

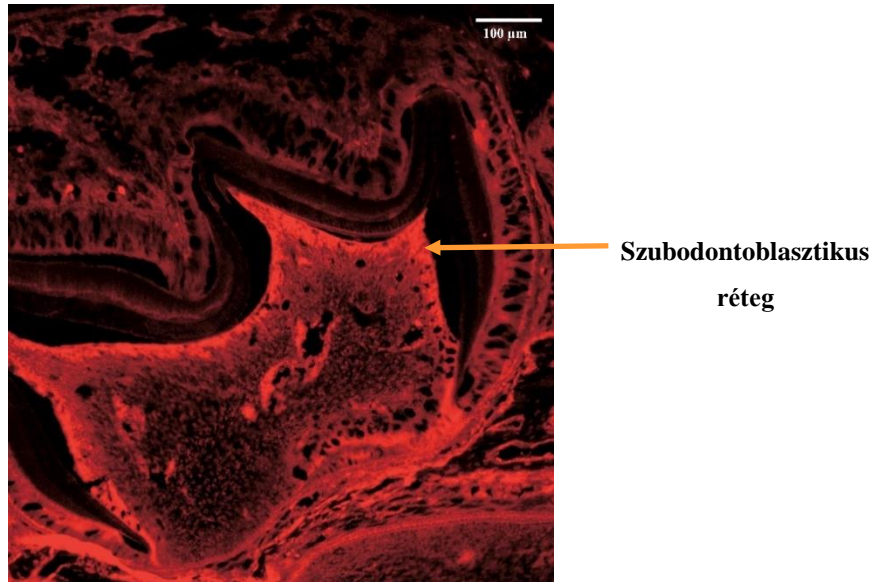
Eddigi ismereteink szerint az FGF családból 12 faktornak van fontos szerepe a fogfejlődésben. Szabályozzák a fogcsírák iniciációját, az epithelium invaginációját, mely során a csíra kialakul, a fogak alaki fejlődését, a csücskök kialakulását és az odontoblasztok, valamint az ameloblasztok differenciációját. Rágcsálókban jelentős szerepe van az FGF3 és FGF10 faktoroknak a mesenchymális sejt pool fenntartásában (proliferációt és túlélést stimulál) a folyamatosan növvő metszőfogak apikális területén (4. ábra, papilla) (Li et al. 2014). A mesenchymában expresszálódó BMP4 és Activin az FGF3 és FGF10 ezen hatását modulálja (Thesleff et Tummers, 2008).

Neurotrofinok, mint az NGF (nerve growth factor), BDNF (brain derived neurotrophic factor), NT3 (neurotrophin 3) és NT4 (neurotrophin 4) szintén jelen vannak a fogfejlődés során, és feltételezhetően nem csak a fogak beidegzésének fejlődéséért felelősek, hanem részt vesznek

az epheliális-mesenchymális interakcióban (Nosrat et al. 1998). Eddigi vizsgálatok alapján arra lehet következtetni, hogy az NGF szerepet játszik az ameloblasztok és odontoblasztok differenciációjának szabályozásában (Mitsiadis et Pagella, 2016).

1.7. PACAP-pal kapcsolatos kutatások a fogakkal összefüggésben

Korábban PACAP immunoreaktív rostokat mutattak ki patkány és emberi fog pulpában az erek mentén, az odontoblaszt és subodontoblaszt rétegben (Ickikawa et Sugimoto, 2003). Egy másik korábbi vizsgálat szerint feltételezhető, hogy a PACAP szerepet játszik a parodontium regenerációjában luxációs sérülést követően. Intakt patkány moláris fogak parodontiumában csak elvétve detektálható PACAP-pozitív idegrost, míg számuk jelentősen megnő a sérülést követően 5-7 nappal. Kettős immunfluoreszcenciával kapcsolat mutatható ki a PACAP pozitív idegrostok és PAC1 pozitív oszteoblasztok/klasztok között (Nonaka et al. 2013). Kutatócsoportunk a homo- és heterozigóta PACAP-génhiányos és vad-típusú egerek posztnatális fejlődését megfigyelve tapasztalta, hogy hím állatok esetében a metszőfogak szignifikánsan korábban törnek elő a génhiányos egerek esetén összehasonlítva a vad-típusúakkal. A nőstény állatokban szintén megfigyelhető ez a tendencia, a különbség azonban nem szignifikáns (Farkas et al. 2017). Kutatócsoportunk 5 napos egerekből készült metszeteken végzett immunhisztokémiai vizsgálata során a moláris fogak subodontoblasztikus rétegében PAC1 receptor expresszót mutatott ki (7. ábra) (Tamas et al. 2012b). A PACAP fogfejlődésre gyakorolt hatását korábban nem vizsgálták, ezért kutatásaink során célul tűztük ki ezen folyamatok feltérképezését is.



7. ábra: Immunhisztokémiával készült reprezentatív kép a PAC1 recetor expressziójáról hét napos egér alsó fejlődő moláris fogának szubodontoblasztikus rétegében (Dr. Szabadfi Krisztina képanyagából).

2. Célkitűzések

Kutatócsoportunk, az MTA-PTE PACAP Kutatócsoport, a PACAP neuroprotektív hatásainak vizsgálata mellett, a Pécsi Tudományegyetem klinikáival együttműködésben számtalan egyéb nem neuronális szervben is vizsgálta a PACAP előfordulását és hatásait.

Ismerve a PACAP neurotrofikus hatását, valamint a fogak részben ectomesenchymális eredetét, célul tűztük ki az endogén PACAP hiányának fogfejlődésre gyakorolt hatásának megismerését.

Kutatásaink első szakaszában hét napos vad-típusú és homozigóta PACAP-génhiányos egerek fejlődő moláris fogait hasonlítottuk össze. Vizsgálataink során morfometriai és szerkezeti vizsgálatokat végeztünk szövettani és Raman mikroszkópia segítségével, melyet a fogfejlődés szabályozásának háttérében álló molekuláris biológiai útvonalak feltérképezése céljából immunhisztokémiával is kiegészítettünk.

A munkánk második szakaszban 1 éves vad-típusú és homozigóta PACAP-génhiányos egerek folyamatosan fejlődő alsó metszőfogait vizsgáltuk. Micro-CT segítségével morfológiai és denzitometriás méréseket végeztünk, majd a metszőfogakból készült csiszolatokat Raman mikroszkópia segítségével elemeztük.

3. Anyagok és módszerek

Vizsgálatainkat homozigóta PACAP-génhiányos és vad-típusú CD1 egereken végeztük. A PACAP-génhiányos egerek japán kollaborációnak köszönhetően, Hitoshi Hashimoto kutatócsoportjától származnak. Szaporításuk a kutatócsoport leírásának megfelelően történt (Hashimoto et al. 2001; 2009). Vizsgálataink során az állattartás és a kísérletek kivitelezése a Pécsi Tudományegyetem BA02/2000-15024/2011 számú ellenőrzött protokolljának megfelelően történt.

3.1. Hét napos vad-típusú és PACAP-génhiányos egerek fejlődő moláris fogainak összehasonlítása

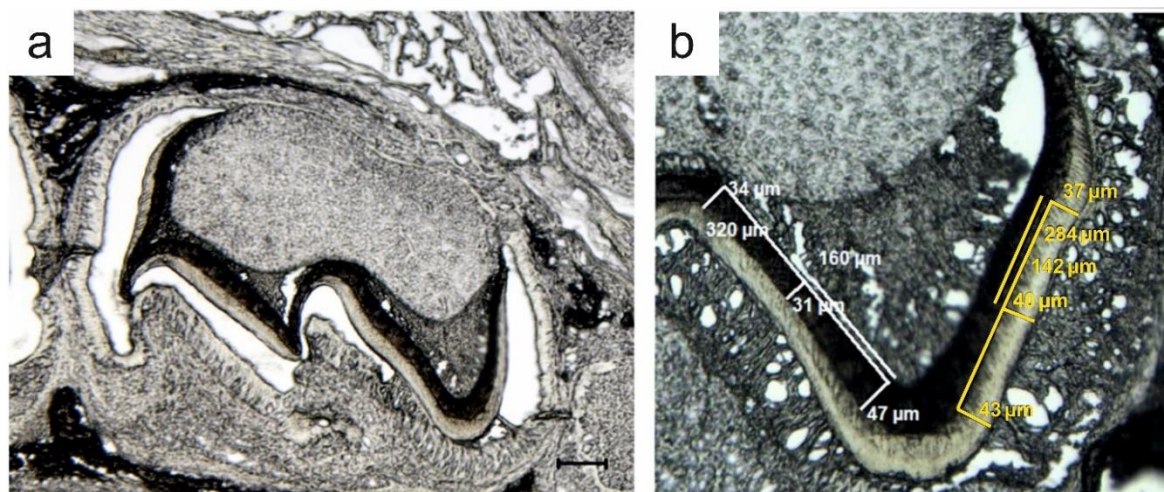
3.1.1. Metszetkészítés morfometriai analízishez és Raman mikroszkópiához

Heterozigóta egerek pároztatását követően, a fejlődés standard körülményeinek biztosítása érdekében a különböző vizsgálati metódusokban alomtestvéreket használtunk. A genotípus meghatározása PCR (polymerase chain reaction) segítségével történt.

A fogak keményszöveteinek morfológiai és strukturális vizsgálatai során vad-típusú (PACAP^{+/+}, n=6 morfológiai analízis, n=4 strukturális analízis) és homozigóta PACAP-génhiányos ((PACAP^{-/-}, n=6 morfológiai analízis, n=4 strukturális analízis) egerek fejlődő moláris fogait hasonlítottuk össze. A posztnatális hetedik napon az egereket túlaltattuk (pentobarbital 50 mg/ml, Nembutal, Sanofi-Phylaxia, Magyarország). Az egerek fejét 4%-os paraformaldehidben (0,1M foszfát pufferben oldva) tároltuk további feldolgozásig. Következő lépésként a fejet 0,1M-os foszfát-pufferben (PB; Sigma) mostuk 24 órán át szobahőmérsékleten. A készítményt ezt követően emelkedő koncentrációjú szacharóz-PBS-oldatokba (foszfát-pufferelt sóoldat) helyeztük. Egy órán át 10%-os oldatban inkubáltuk, a metszésig 20%-os szacharóz-oldatba tettük. A metszetkészítés fagyasztásos technikával készült. A szövetet szövetfagyasztó médiumba (Tissue-Tek, OCT Compound, Sakura Finetech, NL) helyeztük, majd szagittális irányban 10 µm vastag metszeteket készítettünk (Leica Cryostat, Németország). A lemetszett szövetet zselatinozott tárgylemezre vittük fel, és a vizsgálatok (morfometria, strukturális vizsgálatok Raman mikroszkópiával) elvégzéséig -20 °C-on tároltuk (Tamas et al. 2012b). Minden moláris fogról 15-20 metszetet készítettünk (felső első moláris, felső második moláris, alsó első moláris, alsó második moláris).

3.1.2. Morfometriai analízis

Az egereknek 3 moláris foga van kvadránsenként, melyet egy diasztéma választ el a két folyamatosan fejlődő metszőfogtól (2. ábra). A posztnatális hetedik napon az első és második őrlő fogak a késői harang stádiumban vannak. A fejlődő zománc és dentin vastagságát mértük a moláris fogak csücsökcúcsain a natív metszeteken. A méréshez a metszetekről digitális felvételeket készítettünk (Nikon Eclipse 80i, Plan Apo 4X objektív; Nikon Instruments Inc.). A felvételeken a felső első moláris, a felső második moláris, alsó első moláris és az alsó második moláris, zománc és dentin vastagságát mértük Spot Basic szoftver segítségével. A harmadik molárisokon nem végeztünk méréseket, mivel azok a fejlődés egy sokkal korábbi stádiumában voltak. A metszeteken az első őrlőknek három, a második őrlőknek két csücske van. Mérésre csak azon metszeteket használtuk fel, melyeken az összes csücsök látható volt az adott fogból (8.a ábra).



8. ábra: a; Fejlődő felső második moláris reprezentatív képe 7 napos egérben. b; Zománc és dentin vastagságának mérése a moláris fogak csücskein. Fehér vonalak a dentin mérését jelölik, sárga vonalak a zománcot jelölik.

Minden csücskön 3 mérést végeztünk a meziális és disztális csücsöklejtőkön (csücs alatt, az alapon és közepén) mind a zománcban, mind a dentinben. A mérővonal iránya a zománc esetén a zománc dentin határra (dentin-zománc junkció-DEJ), dentin esetében a dentin pulpális falára merőleges (8.b ábra). A csücsökön mért értékek átlagát hasonlítottuk össze. Statisztikai analízisként kétmintás t-próbát alkalmaztunk (Microsoft Excel szoftver - Microsoft, USA).

3.1.3. Strukturális analízis Raman mikroszkópiával

3.1.3.1. Raman spektroszkópia alapjai, mint a fogak szerkezeti összetételének vizsgálati lehetősége

Kutatásunk mindkét szakaszában (7 napos egerek fejlődő moláris fogainak vizsgálata és 1 éves egerek folyamatosan növekvő metszőfogainak vizsgálata) a szerkezeti összehasonlítást Raman mikroszkópiával végeztük.

A Raman spektroszkópia az infravörös spektroszkópiával együtt a vibrációs spektroszkópiai módszerekhez tartozik. Ha a fény interakcióba kerül valamilyen anyaggal a beeső elektromágneses hullám elnyelődhet (ultraibolya-látható spektroszkópia, infravörös spektroszkópia, attól függően, hogy milyen fényt nyel el az anyag), szóródhat (rugalmas vagy rugalmatlan), vagy interakció nélkül áthaladhat. Egy anyagi rendszer molekuláin a fény rugalmasan és rugalmatlan módon szóródhat. A Raman spektroszkópia a fénynek a molekulákon történő rugalmatlan szóródásán alapul, és a Raman effektus bekövetkezésének feltétele, hogy a besugárzott molekulák vibrációja a molekula polarizálhatóságának megváltozásával járjon. A Raman spektroszkópia során monokromatikus (lézer) fény hatására a molekulák polarizálhatóságát meghatározó vibrációs módtól, és a molekula energia állapotától függően, alacsonyabb energiájú (Stokes), vagy magasabb energiájú (anti-Stokes) szórt fényt detektálunk. Ezt nevezzük Raman szórásnak. Mivel a Stokes szóródás intenzitása nagyobb az anti-Stokes szóródásénál a Raman spektrumokon a Stokes típusú szóródást ábrázolják. A jobban polarizálható molekulákat (szimmetrikus rezgések) nagyobb Raman szórás jellemzi. Spektroszkópiában az "x" tengelyen a hullámszámot jelölik, amely hullámhossz reciprokának felel meg, mértékegysége cm^{-1} . Raman spektrumokon, mivel a hullámszám a gerjesztő fény hullámhosszának függvénye, a felhasznált lézer frekvenciájától mért különbséget alkalmazzuk, melyet Raman eltolódásnak nevezünk (Raman shift). Az "y" tengelyen az intenzitást ábrázoljuk. Az intenzitás a fényforrás frekvenciájának negyedik hatványával és a molekulák koncentrációjával arányos (Smith et Dent, 2005). A Raman spektrométer a fókuszált lézerfénynek köszönhetően kapcsolható mikroszkóphoz, mely lehetővé teszi a vizsgálandó terület pontos kiválasztását (9. ábra). Az adott hullámszámnál jelentkező sávok adatbázisból azonosíthatóak. A Raman spektrumokon a sávok hullámszám pozíciója, relatív intenzitása,

valamint az intenzitások felénél vett csúcsmélység érték az ún. félértékszélesség (full width a half maximum-FWHM) alapján kvalitatív és kvantitatív következtetések vonhatóak le a vizsgált anyagról (10.b ábra). Vizsgálataink során a fogak zománcában és dentinjében hidroxipatitához és fehérjékhez köthető Raman sávokat azonosítottunk, melyeket felhasználtunk a spektrális analízis során (Smith et Dent, 2005).

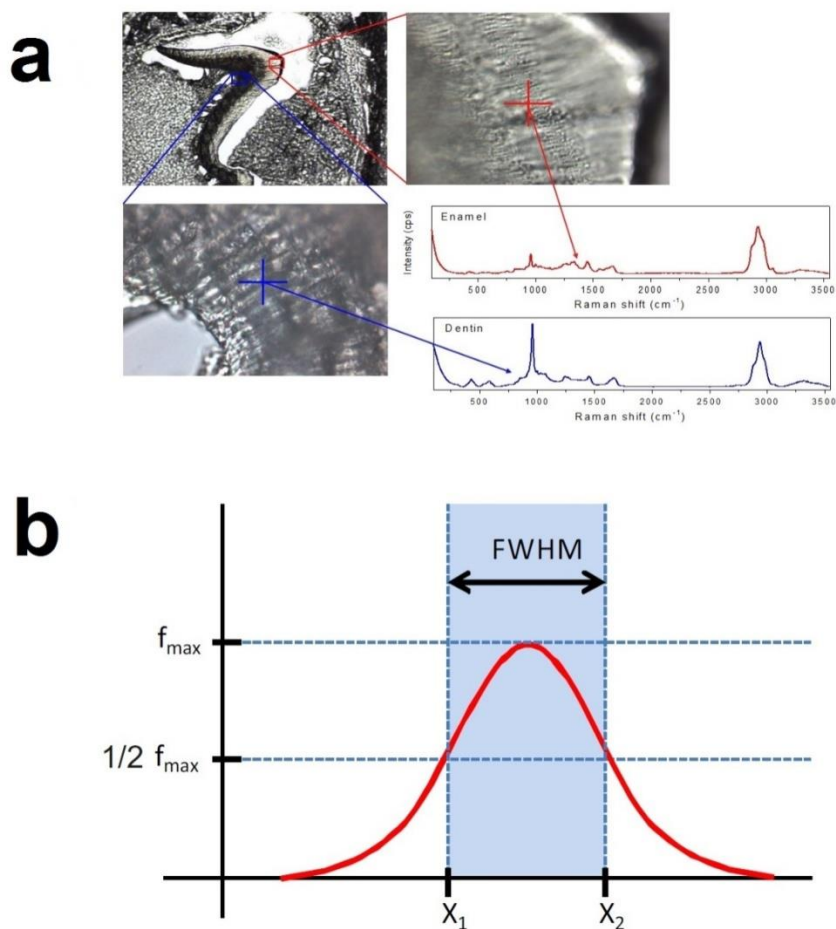


9. ábra: Thermo Scientific DXR Raman mikroszkóp (Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Ásványtani, Geokémiai és Kőzettani Tanszék).

3.1.3.2. Strukturális analízis Raman mikroszkópiával 7 napos egerek molárisaiban

Raman mikroszkópia korábbi kutatásokban jól alkalmazható módszernek bizonyult a fogak strukturális vizsgálatára (Wang et al. 2007b; Matthaus et al. 2008; Xu et al. 2009). A módszer további előnye, hogy méréseinket az előző vizsgálatban használt, natív fagyasztásos technikával készült metszeteken végezhetjük. Méréseinket Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Ásványtani, Geokémiai és Kőzettani Tanszéken végeztük. Vad-típusú és homozigóta PACAP-génhiányos egerek moláris fogaiban hasonlítottuk össze a dentin és zománc összetételét. Vizsgálatunkhoz Thermo Scientific DXR Raman mikroszkópot (Olympus BX41 konfokális mikroszkóp, Peltier elemmel hűtött CCD detektor,

Nd-Yag lézerforrás-532 nm) alkalmaztunk (9. ábra). Az alkalmazott mikroszkóp depolarizált lézer nyalábot kibocsátó lézer forrással rendelkezik. A lézer depolarizált tulajdonsága miatt, a Raman szóródás kristálytani irány függésének nem volt hatása a felvett spektrumok minőségére. A spektrumokat a zománc és a dentin réteg diszkrét pontjaiból vettük fel az alábbi beállításokkal: 900 vonal/mm optikai rács, 50 μm -es „pinhole” típusú konfokális apertúra, 50-3546 cm^{-1} spektrális tartomány, 10mW lézerteljesítmény (10.a ábra). A vizsgált pontok a rétegek közepén helyezkedtek el, hogy elkerüljük a DEJ területét. A DEJ egy vékony határfelület a zománc és dentin között, mely összetételében és biomechanikai tulajdonságaiban eltér a rétegek egyéb területeitől (Walker et Fricke, 2006; Xu et al. 2009). A spektrumok értékelésére OMNIC Peak Resolve v8 (Thermo Fisher Scientific Inc.) szoftvert használtunk. A zománc és a dentin területéről gyűjtött spektrumokat külön-külön értékeltük.



10. ábra: Raman spektrum a zománc és a dentin meghatározott pontjaiból (a); félértékszélesség (full width at half maximum-FWHM) (b).

Alapvonal korrekciót követően az alábbi spektrális paramétereket regisztráltuk: a sávok pozíciója, amplitúdója, a sávok területe és az FWHM értéket. A dentinből és zománcból felvett spektrumokon hidroxipatit és fehérje csúcsokat tudtunk azonosítani. A vad-típusú és PACAP-génhiányos egerek dentin és zománcában talált különbségek statisztikai kiértékelése kétmintás t-próbával történt (IBM SPSS Statistics 17.0.). Az anorganikus komponensek spektrumának kiértékelését a kristályossági index meghatározásával végeztük, a PO_4^{3-} csúcsok FWHM értékének felhasználásával. A kristályossági indexet (CI_{Raman}) egy referencia (magmatikus apatitban mért) PO_4^{3-} FWHM érték (Γ_{ma}) és a mintában mért PO_4^{3-} FWHM érték (Γ_{s}) hányadosaként adhatjuk meg ($\text{CI}_{\text{Raman}} = \Gamma_{\text{ma}} / \Gamma_{\text{s}}$) (Puceat et al. 2004). A referencia érték (Γ_{ma}) átlagosan 4.9 cm^{-1} . A magasabb FWHM (alacsonyabb CI_{Raman}) a hidroxipatit kristályok nagyobb rendezetlenségére utal. A kristályok rendezettségét a relatív karbonát tartalom befolyásolja, melyet a karbonát csúcsok ($\nu_1 \text{CO}_3^{2-}$ $1072 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$) és a foszfát csúcsok ($\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ $960 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$) hányadosaként határoztunk meg. Ez a módszer széles körben alkalmazott bioapatit kristályok jellemzésére. A rétegek fehérje spektrumának értékelésére során az alábbi sávokat vizsgáltuk: amid I (νCO , $1665 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$), amid III ($\delta \text{C-N}$, $1240 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$; $\delta \text{N-H}$ $1272 \pm 6 \text{ cm}^{-1}$ és az δCH_2 , $1346 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$) metil (δCH_3) és metilén (δCH_2). Az amid I és amid III sávok a fehérjék másodlagos konformációjáról adnak információt (Dollish et al. 1974; Penel et al. 1997) (10. ábra).

3.1.4. Immunhisztokémiai vizsgálat

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat kollaborációban végeztük a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetével. Hét napos állatok (vad-típusú $n=3$, homozigóta PACAP-génhiányos $n=3$) túlaltatását követően (pentobarbital, Nembutal; Sanofi-Phylaxia, Magyarország) az egerek fejét azonnal $0,1\text{M}$ foszfát pufferben oldott 4% -os paraformaldehidbe helyeztük, majd szobahőmérsékleten tároltuk 24 órán át. Fixációt követően a mintákat 3 hétre 10% ($v\%$) neutrális etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA; Sigma, St. Louis, Missouri, USA) oldatba helyeztük és szobahőmérsékleten tároltuk dekalcifikálás céljából. Dehidrált követően a mintákat paraffinba ágyasztuk. A mintákból szagittális irányban sorozatmetszés készült, $5 \mu\text{m}$ -es vastagságban. Az SHH, PTCH1, Gli1 expressziójának vizsgálatához a metszetekre antigén feltáró oldatot (antigen-retrieval solution) helyztünk a gyártó előírásainak megfelelően (Vector Laboratories Ltd., Peterborough, Egyesült

Királyság). Az antitestek nem-specifikus kötődésének elkerülése érdekében a mintákat 2%-os szarvasmarha szérum albuminnal, PBS-ben tároltuk, szobahőmérsékleten, harminc percig. Ezt követően a mintákat poliklonális SHH (1/100; Cell Signaling, Danvers, MA, USA), PTCH1 (1/100; Cell Signaling) és Gli1 (1/50; Cell Signaling) antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át, nedves kamrában, 4°C-on. A kimutatáshoz biotinnel konjugált, második, anti-nyúl antitestet (Vector Laboratories Ltd.) alkalmaztunk 1:100 hígításban. A metszeteket PBS-sel mostuk, majd immunfestés történt Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories Ltd.) kit felhasználásával (Felszeghy et al. 2004). Készültek kontroll metszetek hasonló módon, az elsődleges antitest kihagyásával, PBS-sel helyettesítve. A kontroll metszeteken jelet nem detektáltunk. A metszeteken a vad-típusú és PACAP-génhiányos egerek moláris fogcsíráit vizsgáltuk. Digitális felvételeket készítettünk Nikon Eclipse E800 (Nikon Corporation, Tokió, Japán) mikroszkópra szerelt Olympus DP72 kamerával, cellSense Entry 1.5 szoftver (Olympus, Shinjuku, Tokió, Japán) segítségével. Három kutató egymástól függetlenül meghatározta a sejtek és az antitestek lokalizációját a fogcsírákban a metszetekről készült digitális felvételeken. A fotók feldolgozása és dokumentálása Adobe Photoshop szoftverrel történt (Adobe Systems Inc; San Jose, Kalifornia).

3.2. Felnőtt (1 éves) PACAP-génhiányos és vad-típusú egerek alsó metszőfogainak strukturális és morfometriai összehasonlítása

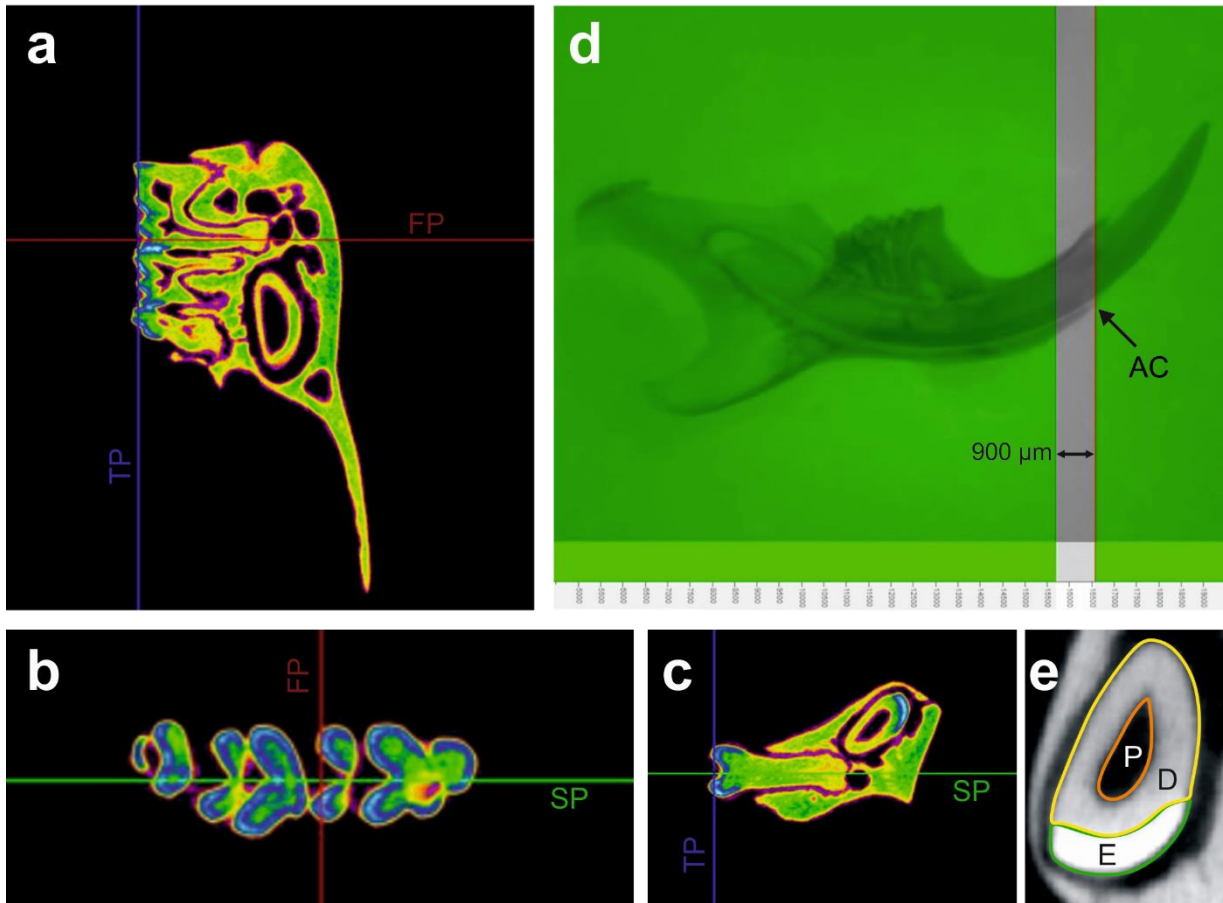
A munkánk első felében a fejlődő molárisok eltéréseit vizsgáltuk a PACAP-génhiányos és vad-típusú egerek között. Azonban a PACAP hiánya más hatással van a folyamatosan fejlődő metszőfogakra, ugyanis a fogfejlődésben érintett faktorok hiánya a moláris fogak és a metszőfogak fejlődését és mineralizációját eltérő módon befolyásolja (Goldberg et al. 2014). Ebben a vizsgálatunkban 1 éves PACAP-génhiányos és vad-típusú egerek alsó metszőfogainak összehasonlítása történt morfometriai analízissel, melyet mikro-CT segítségével végeztünk. A metszőfogak strukturális összehasonlítására mikro-CT denzitometriát és Raman mikroszkópot alkalmaztunk. Vizsgálatainkhoz 1 éves homozigóta PACAP-génhiányos (PACAP -/-; n=6) és vad-típusú (PACAP +/+; n=5) egereket használtunk. Az egerek szaporítása és tartása a korábban leírtaknak megfelelően történt összhangban az egyetem előírásaival (BA02/2000–15,024/2011).

3.2.1. Mikro-CT-vel végzett morfometriai és denzitometriai vizsgálat

Az egy éves PACAP-génhiányos és vad-típusú egereket túllaltattuk (pentobarbital 50mg/ml, Nembutal, Sanofi-Phylaxia, Magyarország). Az egerek bal illetve jobb oldali mandibuláit disszekáltuk, a lágyszövetektől megtisztítottuk, majd a mikro-CT gyártójának előírásainak megfelelően a kiszáradás elkerülése végett azonnal fiziológiás sóoldatba helyeztük. A mikro-CT vizsgálatokhoz az alsó állcsontokat fogászati viaszba ágyasztuk. A minták szkennelése nagy felbontású in vivo mikro-CT rendszerrel készült (Skyscan 1176, BrukerMicroCT, Kontich, Belgium) 9 µm-es voxel mérettel. Szöveti ásványi anyag sűrűség (TMD-tissue mineral density) méréséhez fantom rudat alkalmaztunk kalibráció céljából (Small BMD phantom set, Skyscan1176, Bruker MicroCT, Kontich, Belgium). Az ásványi anyag sűrűség meghatározása a kalcium-hidroxiapatit térfogati sűrűségeket használtuk gramm per köbcentiméterben (g/cm³).

A röntgensugárcsövet 50kV feszültséggel, 500 mA áramerősséggel (0.5 mm alumínium filter, 1000 ms expozíciós idő) működtettük. A szkennelés 180°-ban történt a vertikális tengely körül 0.55°-os lépésenként. A 3D rekonstrukciót NRecon 1.6.6.0 szoftver (Bruker MicroCT, Kontich, Belgium) segítségével végeztük, szoftveres, 25%-os sugárkeményedés korrekciót alkalmazva. A 3D adatok standardizálása Dataviewer 1.4.4 (Bruker MicroCT, Kontich, Belgium) szoftverrel történt. Analizálásra a CT Analyzer 1.13.2.1 (Bruker MicroCT, Kontich, Belgium) szoftvert használtuk. A mandibulák pozíciójának standardizálását követően (11.a-c

ábra) kiválasztottunk egy térfogatot a metszőfogakon 900 μm -re (100 szelet) disztális irányban a fog alveolusának szélétől, amely területből készült felvételeken végeztük méréseinket (11.d ábra). Összehasonlítottuk a dentin, a zománc és a pulpa térfogatát a homozigóta PACAP-génhiányos és a vad-típusú egerek között. A fog teljes méretét ebben a 900 μm -es régióban a három térfogat összegeként adtuk meg (zománc térfogat+pulpa térfogat+dentin térfogat). A pulpa méretének meghatározására a relatív értéket használtunk (pulpa volumen/dentin volumen) a fog méretbeli különbségeinek kizárása érdekében (11.e ábra). Az analizáló szoftverben a mandibula csont, a zománc és a dentin területét megjelöltük a denzitometriai mérések elvégzéséhez. A minták előkészítése a denzitometriai mérésekhez a gyártó előírásainak megfelelően történt (Bruker: bone mineral density (BMD) and tissue mineral trabecular density (TMD) calibration and measurement by micro-CT using Bruker-MicroCT CT-analyzer). A statisztikai analízist kétmintás t-próbával végeztük Microsoft Excel Szoftver (Microsoft, USA) segítségével.



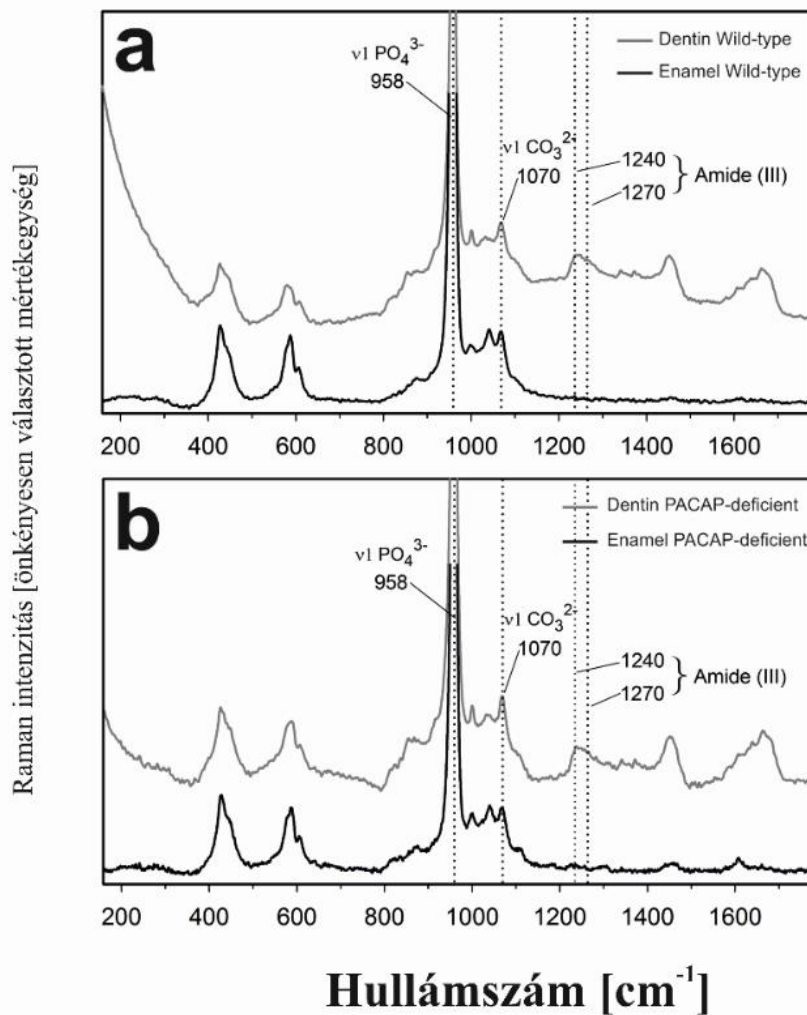
10. ábra: Mandibulák pozíciójának standardizálása (SP- szagittális sík, TP- transzverzális sík, FP- frontális sík). Szagittális irányban a molárisok centrális barázdák határozták meg a mandibulák pozícióját (b), horizontális irányban a rágósík határozta meg az orientációt (a, c). Az alveoláris csontszéltől (AC) disztális irányba 900 µm-t jelöltünk ki a vizsgálatra (d). Volumen mérésre kijelölt: zománc (zöld vonal, E), dentin (sárga vonal, D) és pulpa (narancssárga vonal, P) területek (e).

3.2.2. Strukturális analízis Raman mikroszkópiával 1 éves egerek alsó metszőfogaiból

A mikro-CT-vel történő vizsgálatokat követően a kipreparált mandibulákon végeztünk Raman mikroszkópos vizsgálatokat. A mandibulákat epoxi gyantába ágyaztuk standardizált pozícióban. A beágyazott mintákból frontális síkban csiszolatokat készítettünk. A vizsgált terület standardizálása érdekében egy metszési pontként az alsó első molárisok meziális

felszínét alkalmaztuk. Az így készült metszeteken végeztünk strukturális analízist Thermo Scientific DXR Raman mikroszkóppal (Olympus BX41 konfokális mikroszkóp, Peltier elemmel hűtött CCD detektor, Nd-Yag lézerforrás-532 nm). A mikroszkóp beállításai a korábbi vizsgálatban használtakkal megegyeztek. A spektrumokat a zománcból és a dentinből tíz-tíz diszkrét pontban vettük fel (12. ábra). A spektrumok értékelésére OMNIC Peak Resolve v8 (Thermo Fisher Scientific Inc.) szoftvert használtunk. A zománc és a dentin területéről gyűjtött spektrumokat itt is külön-külön értékeltük. A zománcban hidroxapatit sávot, a dentinben hidroxapatit és fehérje sávot (amid III sáv) azonosítottunk (12.a, b ábra). Fehérje sávot az adott területen, a zománcban nem detektáltunk, mivel a zománcban ezen a területen a fehérjetartalom 2%-ra esik a maturáció következtében (Fukae és Shimizu, 1974; Smith és Nanci, 1989; Bartlett, 2013). Alapvonal korrekciót követően vizsgáltuk a foszfát csúcsok, a karbonát csúcsok és az amid III csúcsok ($1240/1270\text{ cm}^{-1}$) alatti területet. A zománcban azonosított hidroxapatit sávokat figyelmen kívül hagytuk a vizsgálat során a változatos strukturális összetétel miatt, amely a folyamatosan fejlődő metszőfogakat jellemzi, mind apico-incisális irányban, mind a zománc vastagságában (Smith and Nanci 1989; Xu et al. 2009; Xu és Wang, 2012).

A mérési pontok meghatározása során a DEJ területét elkerültük a korábban említett okból kifolyólag, mely szerint az összetétel ezen a területen eltér a dentin többi részétől (Walker és Fricke 2006; Xu et al. 2009). Ennek megfelelően a dentinben a mérési pontok a dentin réteg közepére estek. A dentin hidroxapatit sávjának spektrális analízise során a karbonát és foszfátcsúcsok alatti területek arányát vizsgáltuk ($v_1\text{ CO}_3^{2-}/v_1\text{ PO}_4^{3-}$). Ez az arány a hidroxapatit struktúra karbonát tartalmára utal (Santos and Clayton, 1995). A dentin protein spektrumának vizsgálata során az amid III sávokat ($\delta\text{ C-N}$ at $1240 \pm 2\text{ cm}^{-1}$ és $\delta\text{ N-H}$ at $1270 \pm 6\text{ cm}^{-1}$) analizáltuk, mely széles körben alkalmazott módszer a fehérjék másodlagos konformációjának jellemzésére (Dollish et al. 1974; Penel et al. 1997). Értékeléshez az amid III 1240/1270 csúcsok alatti területek arányát hasonlítottuk össze PACAP-génhiányos és vad-típusú egerekben. A statisztikai kiértékeléshez kétmintás t-próbát alkalmaztunk, IBM SPSS Statistics 17.0 szoftver segítségével.



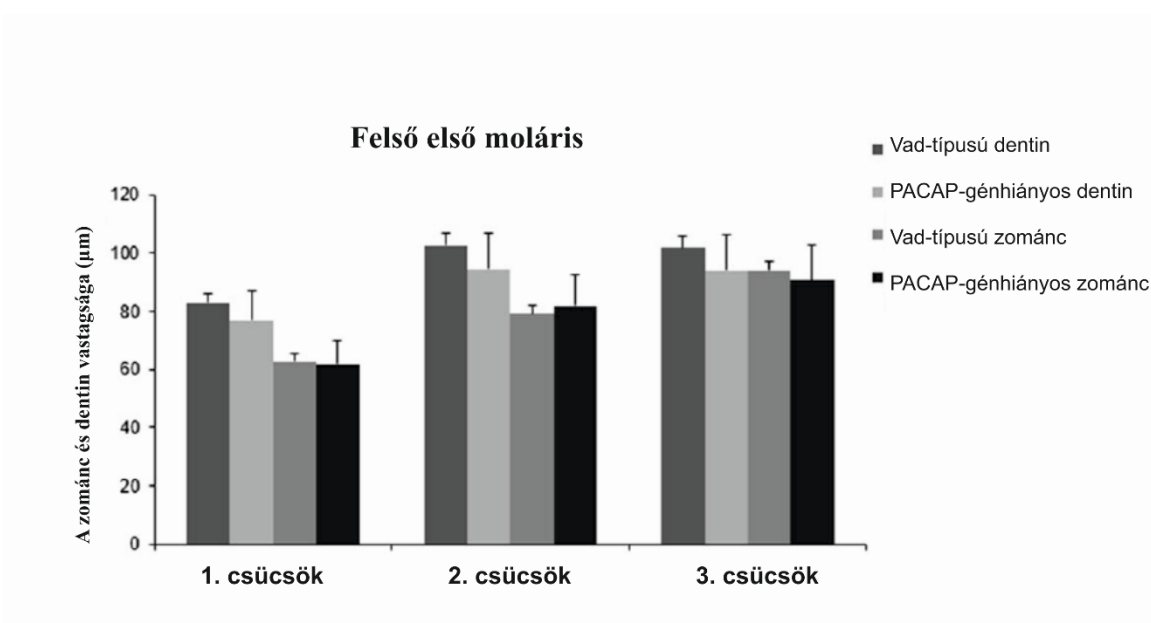
12. ábra: Dentin és zománc karakterisztikus Raman spektruma vad-típusú (a) és homozigóta PACAP-génhiányos (b) egerekben. A foszfát ($\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$; 958 cm^{-1}) és karbonát ($\nu_1 \text{CO}_3^{2-}$; B-típusú, 1070 cm^{-1}) csúcsok láthatóak mind a zománc (enamel), mind a dentin spektrumán. Amid III ($\delta\text{C-N}$ at $1240 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$, $\delta\text{N-H}$ és $1270 \pm 6 \text{ cm}^{-1}$) deformációs csúcsok láthatóak a dentinben (amid csúcsok a zománcban az alacsony fehérje tartalom miatt nem detektálhatók).

4. Eredmények

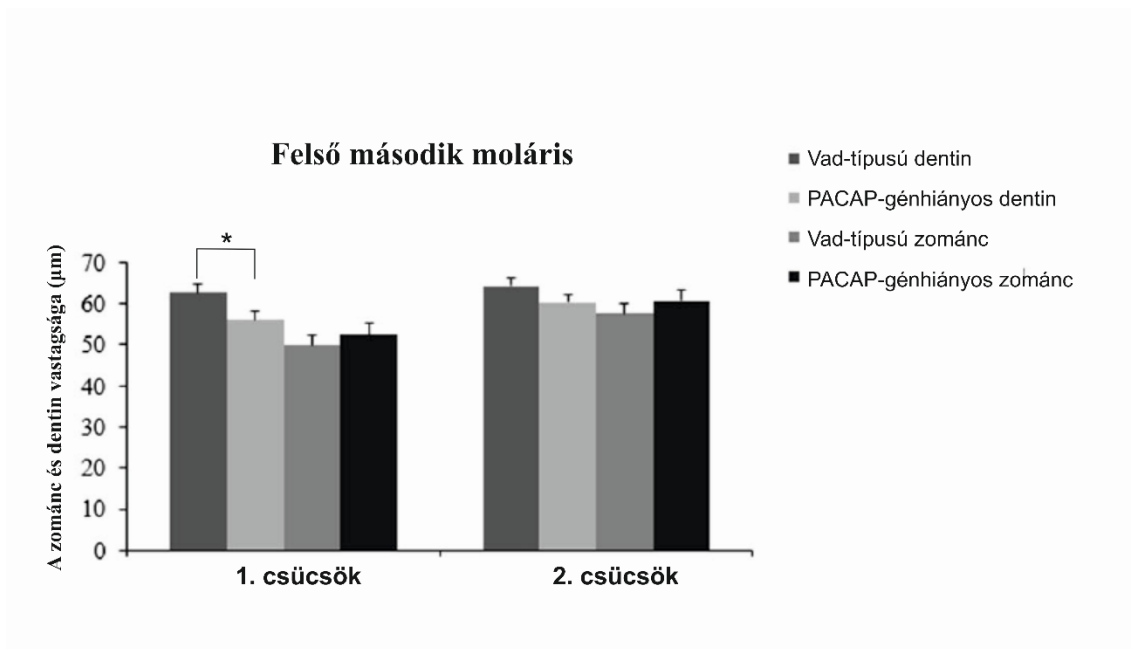
4.1. Hét napos egerek fejlődő moláris fogainak vizsgálata

4.1.1. Morfometriai analízis

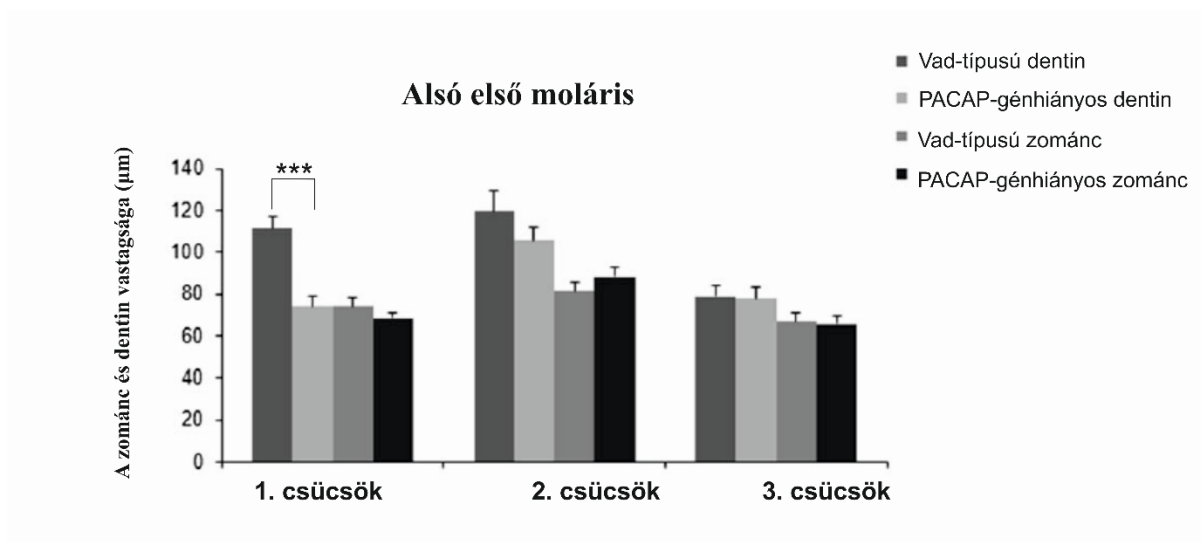
A vad-típusú és homozigóta PACAP-génhiányos egerek zománc és dentin rétegvastagságának összehasonlítása során nem találtunk szignifikáns különbséget a felső első moláris fogakban. Szignifikánsan vékonyabb dentint találtunk a PACAP-génhiányos egerekben a felső második moláris fogak első ($p < 0,05$), az alsó első molárisok első ($p < 0,001$) és az alsó második moláris fogak első és második ($p < 0,01$) csücskei esetében (13-16. ábra). A zománc vastagságában nem találtunk szignifikáns különbséget.



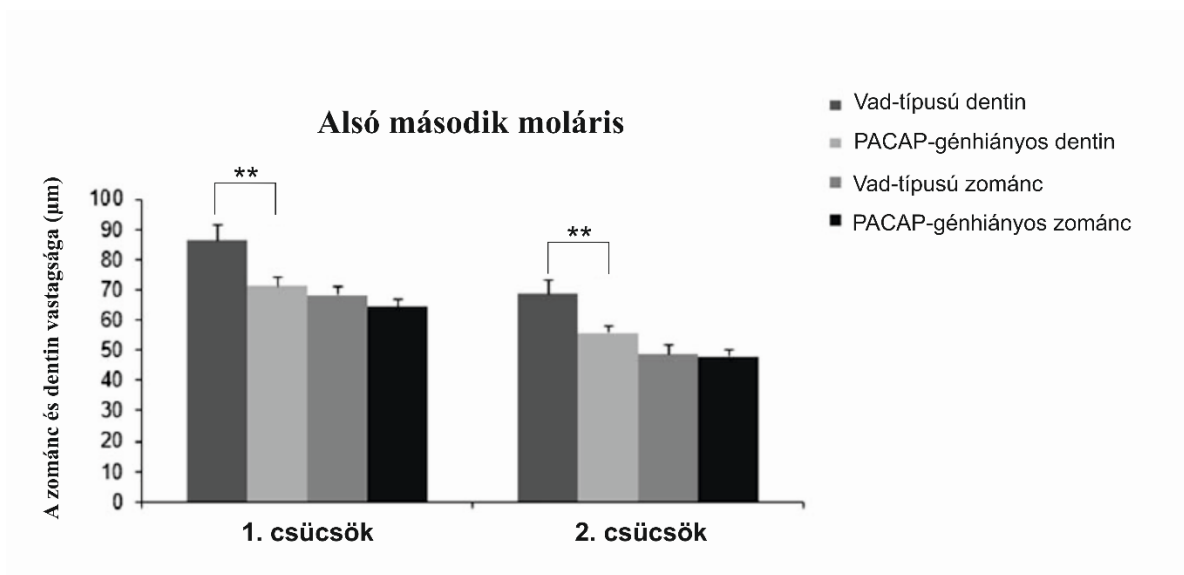
13. ábra: Felső első moláris fog három csücskén mért zománc és dentin vastagság átlag értékei (átlag \pm SEM) vad-típusú és PACAP-génhiányos egerekben.



14. ábra: Felső második moláris fog két csücskén mért zománc és dentin vastagság átlag értékei (átlag±SEM) vad-típusú és PACAP-génhiányos egerekben. (* $p < 0,05$)



15. ábra: Alsó első moláris fog három csücskén mért zománc és dentin vastagság átlag értékei (átlag±SEM) vad-típusú és PACAP-génhiányos egerekben. (***) $p < 0,001$)



16. ábra: Alsó második moláris fog két csücskén mért zománc és dentin vastagság átlag értékei (átlag±SEM) vad-típusú és PACAP-génhiányos egerekben. (** $p < 0,01$)

4.1.2. Strukturális analízis Raman mikroszkópiával 7 napos egerek molárisaiból

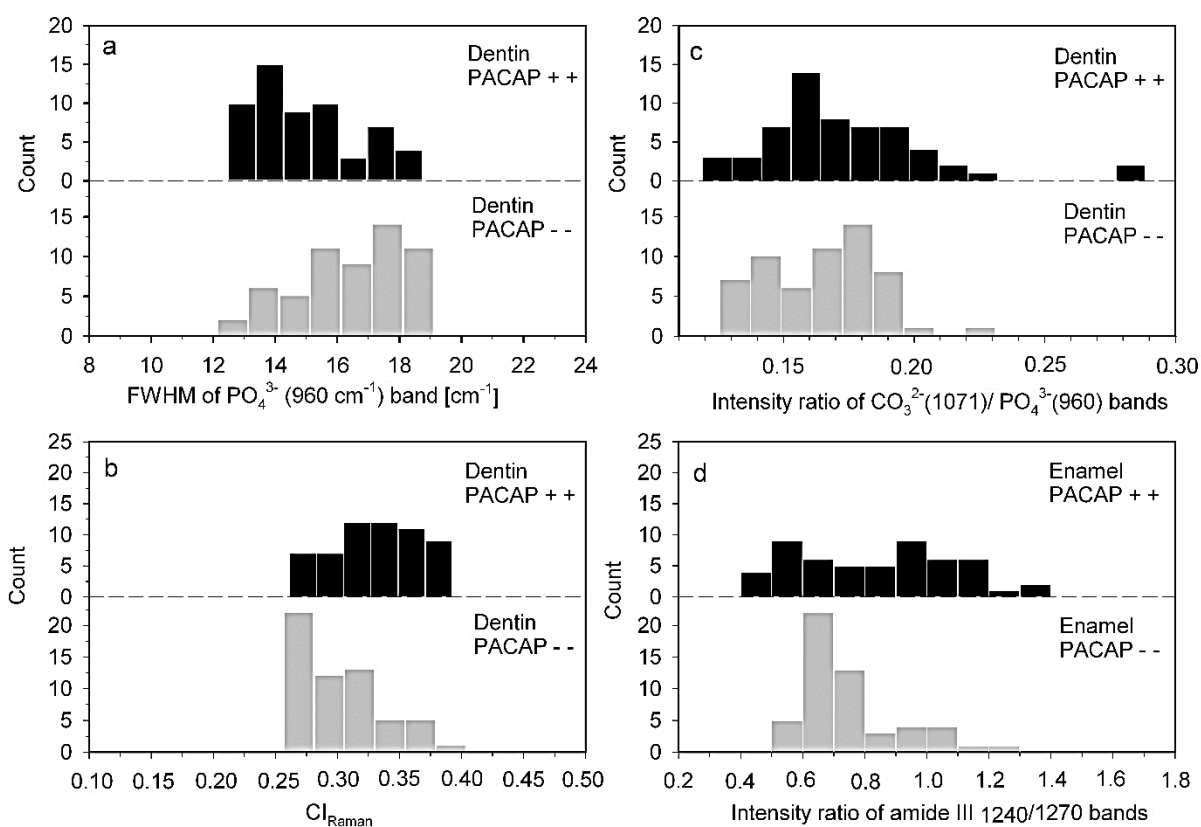
A dentin szeretlen (hidroxiapatit) fázisának vizsgálata során szignifikáns különbséget találtunk a foszfát ($\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ $960 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$) csücsök FWHM értékében (Γ_s) a vad-típusú és a PACAP-génhiányos egerek között ($p < 0,01$). Az értékek nagy része $12-16 \text{ cm}^{-1}$ közé esett a vad-típusú egerek esetén, míg a PACAP-génhiányos egerekben az értékek szélesebb skálán helyezkedtek el ($14-19 \text{ cm}^{-1}$), a kapott értékek főleg a $17-19 \text{ cm}^{-1}$ tartományban csoportosultak (17.a ábra).

A kristályossági indexek ($\text{CI}_{\text{Raman}} = 4.9/\Gamma_s$) összehasonlítása során a vad-típusú egerekben az értékek 0,33 és 0,4 között csoportosultak nagyobb mértékben, a génhiányos csoportban alacsonyabb értékek körül (0,25 és 0,3) rendeződtek, mely különbség itt is szignifikánsnak bizonyult ($p < 0,05$) (17.b ábra).

A dentin relatív karbonát tartalmának ($\nu_1 \text{CO}_3^{2-}/\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$) meghatározása során szintén különbségeket találtunk. Bár a vad-típusú egér fogaiban az értékek 0,12 és 0,29 között, míg a PACAP-génhiányos egerek esetében pedig egy szűkebb skálán (0,13 és 0,23 között) helyezkednek el, a PACAP-génhiányos egerekben az intenzitás hányadosok magasabb értékeknél csoportosulnak (17.c ábra).

A dentin organikus (fehérje) fázisában nem találtunk szignifikáns különbséget.

A zománc vizsgálata során a fehérje spektrumok összehasonlítása során találtunk szignifikáns különbséget ($p < 0,05$). Az $1240 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ és $1272 \pm 6 \text{ cm}^{-1}$ amid III csúcsok hányadosában találtunk különbséget. A kapott értékek a vad-típusú egerek esetében széles skálán helyezkednek el (0,47-1,3), ezzel szemben a PACAP-génhiányos egerekből kapott értékek sokkal szűkebb skálán (0,6-0,8) találhatóak (17.d ábra). Egyéb fehérje sávokban, mint az amid III (δCH_2 , $1346 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$), metil (δCH_3), metilén (δCH_2) és amid I (νCO , $1665 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$) esetén, valamint az anorganikus fázisban szignifikáns különbséget nem találtunk.

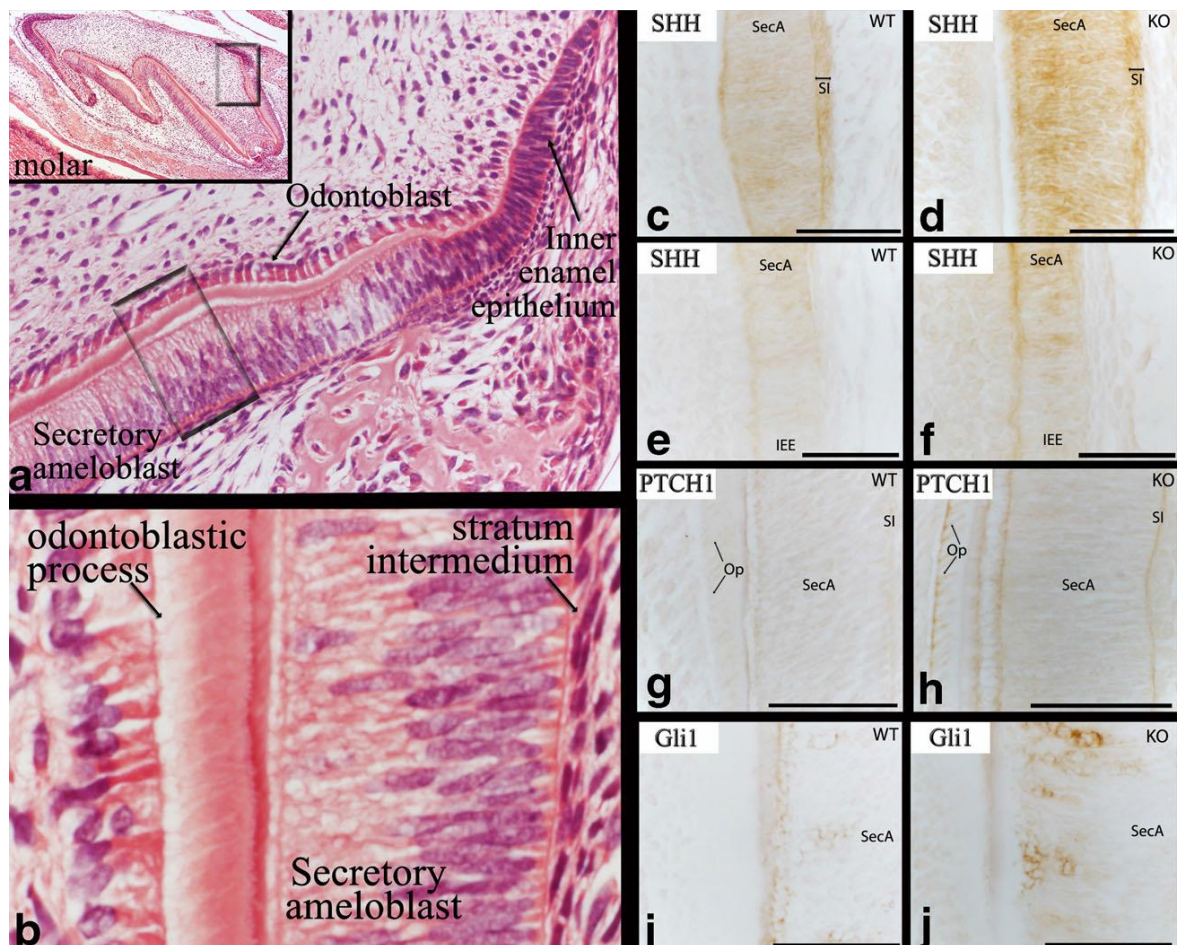


17. ábra: A zománc és dentinből felvett karakterisztikus Raman spektrális paraméterek 7 napos vad-típusú és PACAP-génhiányos egerekből. A dentin foszfátcúcsainak FWHM értékei (a); Raman kristályossági index (CI_{Raman}) dentinben (b); relatív karbonát tartalom a dentinben (c); amid III 1240/1270 sávok relatív intenzitása (d).

4.1.3. Immunhisztokémiai vizsgálat

Hét napos vad-típusú és homozigóta PACAP-génhiányos egerek moláris fogcsíráiban vizsgáltuk a PACAP szerepét a fogfejlődésben résztvevő jelátviteli útvonalak, az SHH, PTCH1, Gli1 expressziójának tanulmányozásával. Immunhisztokémiai módszerekkel különbség mutatható ki az SHH, PTCH1 és Gli1 expressziójában a vad-típusú és PACAP-génhiányos egerek között (18. ábra). A fogstruktúrákban és azok körül intenzívebb jel látható mind az SHH, a PTCH1 és Gli1 esetében a PACAP-génhiányos egerekből készült metszeteken. Az SHH expresszió esetén a legkifejezettebb ez a különbség, mely az érő dentális epithelium molekuláris markereként is szolgál. Nevezetesen fokozott SHH immunpozitivitás mutatható ki a szekréciónameloblasztok és a stratum intermedium területén a génhiányos egerekben a vad-típusú egerekkel összehasonlítva (18.c-f ábra). Fokozott PTCH1 expresszió detektálható az odontoblaszt nyúlványok területén (nem csak az ameloblasztok területén) a PACAP-génhiányos egerekben (18.g, h ábra).

A PACAP-génhiányos csoportban összehasonlítva a vad-típusú egerekkel, intenzívebb intracelluláris Gli1 expresszió figyelhető meg, mely a szekréciónameloblasztok apikális területére korlátozódik (18.i, j ábra).



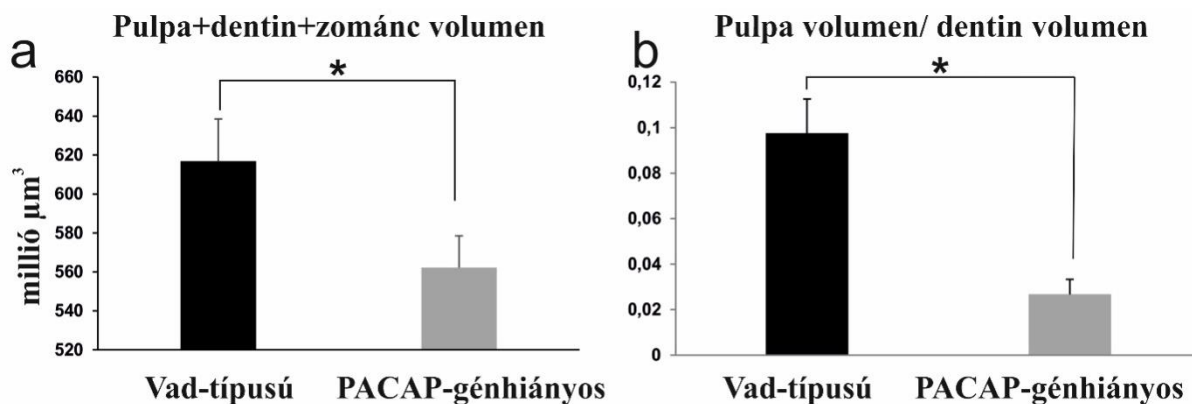
18. ábra: Moláris fogcsíra hét napos egérben, hematoxin-eozin festés moláris fogon (a,b); SHH (c-f), PTCH1 (g, h) és Gli1 (i, j) immunohisztokémiával festett metszetek. Az „a” és „b” képeken a négyzetek a nagyobb nagyítás területét jelölik. A fejlődő fogcsírák sejtjeit a következőképpen jelöltük: odontoblaszt-odontoblast, belső zománchám-inner enamel epithelium, szekretoros ameloblaszt-secretory ameloblast, odontoblaszt nyúlvány-odontoblastic process (Tomes féle rost), stratum intermedium. Az immunhisztokémiai felvételek a vad-típusú (c,e,g,i) és a PACAP-génhiányos (d,f,h,j) egerek moláris fogait mutatják. Méretarány: 20 μ m. SHH pozitivitás látható a szekretoros ameloblasztban (SecA) és a stratum intermedium (SI) epitheliális sejtjeiben (c-f). A PACAP-génhiányos egerek moláris fogaiban fokozott SHH expressziót detektáltunk. Hasonló eredményt kaptunk a PTCH1 és Gli1 esetében is a vad és PACAP-génhiányos egerek összehasonlítása során, melynek hátterében a fokozott SHH expresszió feltételezhető.

4.2. Felnőtt (1 éves) PACAP-génhiányos és vad-típusú egerek alsó metszőfogainak strukturális és morfometriai összehasonlítása

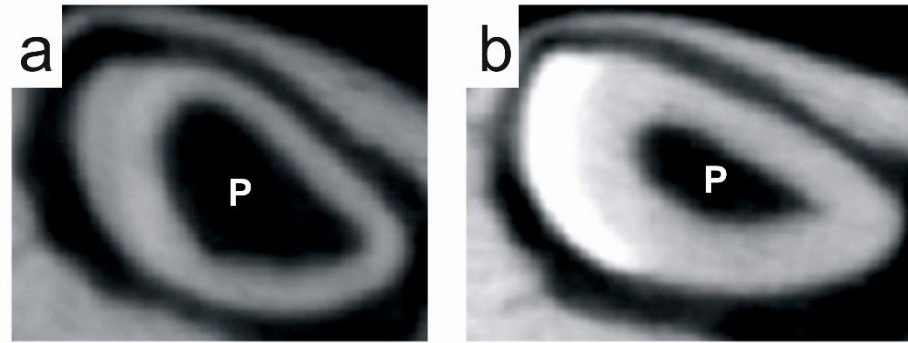
4.2.1. Mikro-CT-vel végzett morfometriai és denzitometriai vizsgálat

A fogak méretének (pulpa volumen+zománc volumen+dentin volumen; 11.e ábra) összehasonlítása során szignifikánsan kisebb fogakat találtunk a PACAP-génhiányos csoportban a vad-típusú egerekhez képest ($p < 0,05$) (19.a ábra). Külön-külön a zománc és a dentin volumenét összehasonlítva nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között. Mivel a fogak teljes méretében különbséget találtunk a pulpa méretének összehasonlítása félrevezető lenne, ezért a dentinhez való arányukat hasonlítottuk össze. A pulpa volumen/dentin volumen összehasonlítása során a PACAP-génhiányos csoportban szignifikánsan alacsonyabb értékeket kaptunk ($p < 0,05$) a vad-típusú állatokhoz viszonyítva (19.b; 20.a, b ábra).

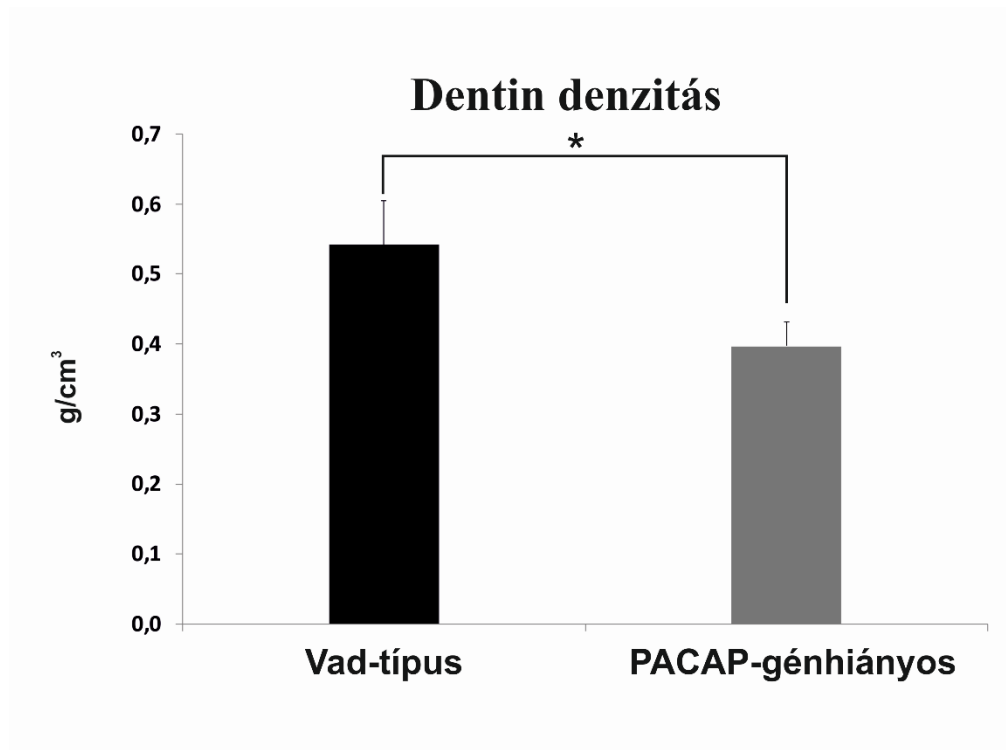
A denzitometriai méréseink során összehasonlítottuk a fog körüli csont, a zománc és a dentin denzitását. Szignifikánsan alacsonyabb denzitást mértünk a PACAP-génhiányos egerek dentinjében ($0,396 \pm 0,033 \text{ g/cm}^3$) összehasonlítva a vad-típusú egerek metszőfogainak dentinjével ($0,542 \pm 0,062 \text{ g/cm}^3$, 21. ábra) ($p < 0,05$). A zománc és a csont esetén nem találtunk szignifikáns eltérést.



19. ábra: Metszőfogak mérete a vizsgált területen a (pulpa+dentin+zománc volumen) vad-típusú és PACAP-génhiányos egerekben (a); pulpa dentinhez viszonyított relatív volumene (pulpa volumen/dentin volumen) vad-típusú és PACAP-génhiányos egerekben (b); (átlag \pm SEM; * $p < 0,05$).



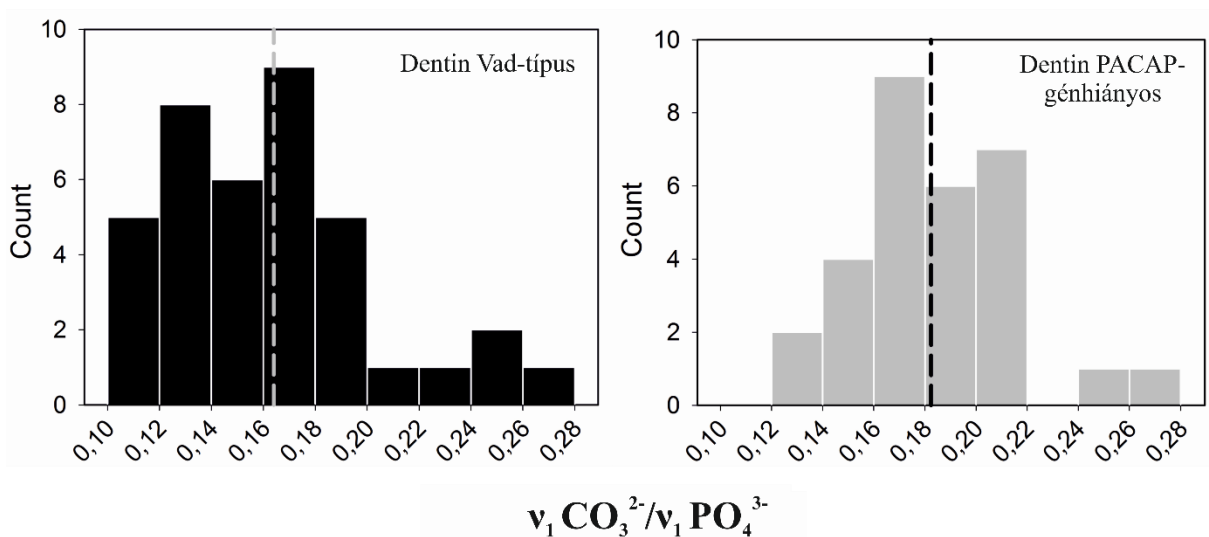
20. ábra: Vad-típusú (a) és PACAP-génhiányos (b) egerek metszőfogainak reprezentatív keresztmetszeti képe (mikro-CT felvétel). P: pulpa területe (sötét terület). A PACAP-génhiányos csoportban a pulpakamra szűkebb.



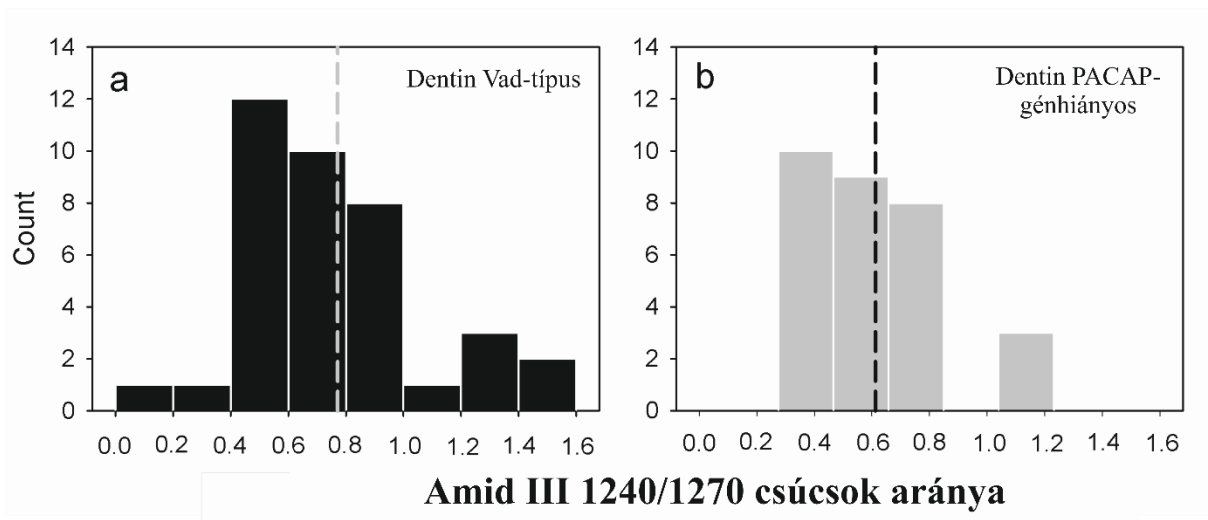
21. ábra: Kalcium-hidroxiapat denzitás (g/cm³) vad-típusú és PACAP-génhiányos egerek metszőfogaiban mikro-CT TMD méréssel. A dentin denzitása PACAP-génhiányos egerek metszőfogaiban szignifikánsan alacsonyabb összehasonlítva a vad típusú egerekkel (átlag±SEM; * $p < 0,05$).

4.2.2. Strukturális analízis Raman mikroszkópiával 1 éves egerek alsó metszőfogaiból

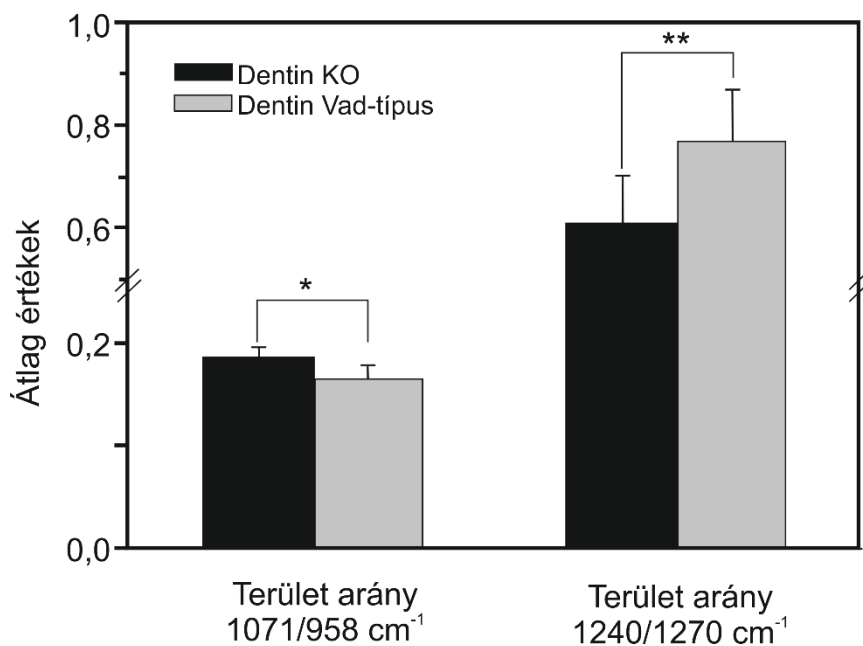
A dentin hidroxipatit sávjának vizsgálata során szignifikáns eltérést találtunk a karbonát és foszfát csúcsok arányában ($v_1 \text{CO}_3^{2-}/v_1 \text{PO}_4^{3-}$) a vad-típusú és PACAP-génhiányos egerek metszőfogai között ($p < 0.05$). A vad-típusú egerekben ez az arány 0,1-0,27 közötti értékeket mutatott, 0,16-os átlagértékkel, míg a PACAP-génhiányos csoport esetében az értékek 0,12-0,26 közé estek 0,18 átlagértékkel (22., 24. ábra). A dentin fehérje struktúráját vizsgálva az amid III deformációs rezgési sávok alatti terület arányának összehasonlítása során ($1240/1270 \text{ cm}^{-1}$) szintén szignifikáns eltérést találtunk ($p < 0.05$). Vad-típusú egerekben az arány 0,14-1,57 értékek közé esett 0,77 átlagértékkel, míg a PACAP-génhiányos csoportban az értékek egy szűkebb intervallumban 0,28-1,24 között helyezkedtek el egy alacsonyabb 0,61 átlagértékkel (23., 24. ábra). A zománc anorganikus fázisának elemzését a korábban részletezett okok miatt elvetettük.



22. ábra: Karbonát/foszfát csúcsok aránya ($v_1 \text{CO}_3^{2-}/v_1 \text{PO}_4^{3-}$; 1071/958) vad-típusú és PACAP-génhiányos egerek dentinjében. Szaggatott vonal az átlagértéket mutatja.



23. ábra: Amid III csúcsok alatti területek aránya (1240/1270) vad-típusú és PACAP-génhiányos egerek dentinjében. Szaggatott vonal az átlagértéket mutatja.



24. ábra: Karbonát/foszfát csúcsok aránya (ν_1 CO₃²⁻/ ν_1 PO₄³⁻; 1071/958); Amid III csúcsok alatti területek aránya (1240/1270) vad-típusú és PACAP-génhiányos (KO) egerek dentinjében (átlag ± SEM).

5. Megbeszélés

Vizsgálataink során szignifikáns különbségeket találtunk 7 napos vad-típusú és PACAP-génhiányos egerek fejlődő molárisainak és felnőtt (1 éves) állatok metszőfogainak vizsgálata során, mind strukturálisan, mind morfometriai analízissel. A 7 napos állatokban morfológiai összehasonlítással a homozigóta PACAP-génhiányos egerekben vékonyabb dentin réteget találtunk. A vékonyabb dentin réteg a génhiányos csoportban a fejlődés késésére utalhat, mely szembetűnőbb a második molárisok esetében, mivel azok a fejlődés korábbi stádiumában vannak. A dentin fejlődése a nem mineralizált prekürzornak tekinthető predentin kialakulásával kezdődik, mely a későbbiekben apatit kristályok lerakódásával mineralizálódik. A mineralizáció és predentin képződésének egyensúlyában keletkező zavar patológiás elváltozásokhoz vezethet, mint a csökkent dentin vastagság (Butler et Ritchie 1995; Ye et al. 2004; Nanci 2013d). Az egy éves (felnőtt) vad-típusú és PACAP-génhiányos egerek alsó metszőfogai között is morfometriai különbségeket találtunk mikro-CT vizsgálattal. A mérések eredményeként a PACAP-génhiányos egerek metszőfogai kisebb méretűnek bizonyultak (zománc, dentin és pulpa volumen összege). Az egy éves állatokban talált kisebb fogméret összhangban van kutatócsoportunk korábbi eredményeivel, miszerint a PACAP-génhiányos egerek elmaradnak növekedésben (csökkent súlynövekedés) vad-típusú társaikhoz viszonyítva (Farkas et al. 2017). A pulpa dentinhez viszonyított relatív mérete kisebb volt az 1 éves PACAP-génhiányos egerekben. A pulpakamra szűkülése a kor előrehaladtával fiziológiásnak tekintendő, de előfordulhat védekező reakcióként a pulpát érő káros behatásokkal szemben. Esetenként a pulpa teljes obliterációja is előfordulhat fog fejlődési rendellenességekben, mint például a dentinogenezis imperfecta esetén (Hart et Hart, 2007; Nanci, 2013d; McCabe et Dummer, 2012; Hargreaves et Berman, 2016). Vizsgálataink során bizonyítást nyert az, hogy PACAP hiányában a PACAP-génhiányos egerek fogfejlődése elmarad a vad-típusú egerekéhez képest.

Raman mikroszkópiával végzett strukturális összehasonlítás eredményeként a 7 napos egereknél a zománc réteg fehérjéiben, illetve a dentin hidroxipatit fázisában találtunk szignifikáns eltéréseket. A foszfát sávok ($\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$) FWHM értéke a dentinben szignifikáns különbséget mutatott a vad-típusú és PACAP-génhiányos egerek között. A felvett Raman spektrumon ez a sáv $959\text{-}960 \text{ cm}^{-1}$ között található, mely jellemző a biológiai apatitokra (Thomas et al. 2011). A foszfát sávokban talált eltérések a kristályok rövidtávú atomos

rendezettségében való különbségekre utal. Szignifikánsan magasabb FWHM értékeket találtunk a foszfát csúcsokban ($\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$) PACAP-génhiányos egerekben, amely a hidroxipapatit kristályok magasabb fokú rendezetlenségére utal. A rendezetlenség mértéke a kristályok méretével és a hidroxipapatit kristályok relatív karbonát tartalmával hozható összefüggésbe. Raman spektrumon a nanométeres mérettartományú apatit kristályokban a foszfát csúcsok FWHM értéke magasabb, míg a nagyobb méretű kristályok esetén a $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ sávok alacsonyabb FWHM értéket mutatnak (Thomas et al. 2011). A kristályok rendezettségében és méretében való eltérés lehet a „ β szubsztitúció” következménye, mely során a molekuláris struktúrában a foszfát csoportok (PO_4^{3-}) karbonát csoportokkal (CO_3^{2-}) helyettesítődnek (de Mul et al. 1986; Penel et al. 1998). A karbonát (CO_3^{2-}) vibrációs mód, azon hidroxipapatit kristályokra jellemző, ahol a kristályrácsszerkezetben a foszfát csoportok „ β szubsztitúciója” előfordul. Az ionos szubsztitúció és a kis kristályméret nem független egymástól, mindkettő a rendezetlenséget növeli (Wopenka et Pasteris, 2005; Puceat et al. 2004). A „ β szubsztitúció” mértékének meghatározására a karbonát és foszfát ($\nu_1 \text{CO}_3^{2-}/\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$) sávok relatív intenzitása használható. A PACAP-génhiányos egerek dentinjében mért magasabb értékek a 7 napos egerek moláris fogaiban magasabb ionos szubsztitúcióra utal (karbonát foszfát helyére) az apatit kristályban, ami összefüggésbe hozható a dentin csökkent mértékű kristályosságával a génhiányos csoportban, melyet a kristályossági index (CI_{Raman}) eredményei is alátámasztanak. A „jól” kristályosodott hidroxipapatit sávok keskenyebbek (alacsonyabb FWHM érték), míg csökkent kristályosodás esetén a sáv kiszélesedik (magasabb FWHM érték). Az eredmények tükrében elmondhatjuk, hogy a PACAP-génhiányos egerek dentinjét kevésbé kristályosodott, rendezetlenebb, kisebb kristallit méretű bioapatit jellemzi. A nagyobb mértékű karbonát szubsztitúció („ β -szubsztitúció”) a kristályrácásban szerkezeti eltérést okoz.

A 7 napos egerek fejlődő molárisainak zománcában kimutatott különbség az amid III sávok deformációs rezgéseinek (kötésszög változás) intenzitás hányadosában, a fehérjék másodlagos szerkezetének eltérésére utal. Ez az eredmény a rendezett és rendezetlen ún. „random coil” (nem valós másodlagos konformáció) szakaszok arányában való eltérést jelöli. Vad-típusú egerekben a rendezett és rendezetlen szakaszok nagyobb fokú diverzitását észleltük összehasonlítva a PACAP-génhiányos egerekkel (az 1,240 és 1270 cm^{-1} hullámszámú amid III csúcsok intenzitás aránya szélesebb skálán mozog). A legjellemzőbb rendezett konformációk az ún. „ α -hélix”, „ β -redők” és a β -kanyar (Nelson et Cox, 2008). A kapott különbségek alapján e rendezett és

rendezetlen szakaszok arányában eltérés mutatkozik. Fehérjék esetén a konformációk kialakulása az aminosav szekvencia függvénye (Berg et al. 2002). Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a különböző zománcfehérjék egymáshoz viszonyított arányában, vagy adott fehérjék izoformái közötti arányban van eltérés a két csoport zománca között. A gyűjtött információ nem elegendő ahhoz, hogy a különböző jelentősebb konformációk arányát meghatározza, de alkalmas arra, hogy a másodlagos struktúrák heterogenitását megmutassa, különösen a rendezett és rendezetlen (random coil) struktúrák tekintetében. Bizonyos zománc fejlődési rendellenességekben, mint az amelogenezis imperfecta esetén, az elváltozás részben az amelogenin másodlagos konformációjában bekövetkező zavar következménye (Lakshminarayanan et al. 2010).

Az egy éves egerek Raman mikroszkópos vizsgálata során is szignifikáns eltéréseket találtunk a dentinben, mind a fehérje, mind a hidroxipatit fázisban. Ezen eredmények szerint a PACAP-génhiányos egerek dentinjében a karbonát/foszfát arány magasabb volt, mely nagyobb fokú β -típusú szubsztitúciót jelent, ahol a foszfát csoportok helyén karbonát csoportok találhatóak a kristályszerkezetben. Hasonlóan a hét napos egereknél leírtakhoz, ebben az esetben is ez az eredmény kisebb méretű kristályokra és a kristályszerkezet nagyobb fokú rendezetlenségére utal (de Mul et al. 1986; Penel et al. 1998; Thomas et al. 2007, 2011). A dentin magasabb karbonát tartalma összhangban van a 7 napos egerekben leírtakkal, és összefüggésben lehet a az 1 éves egerekben talált denzitometriai eredményeinkkel, mely szerint a PACAP-génhiányos egerek dentinjének kalcium-hidroxipatit térfogati sűrűsége szignifikánsan alacsonyabb volt. Keményszövetek sűrűségének mérése során a röntgensugár gyengülése feltételezhetően függ az anyag kalcium-hidroxipatit tartalmától. Bár nem találtunk adatot arra vonatkozólag, hogy van-e összefüggés a karbonát/foszfát arány és a szöveti ásványi anyag denzitás között, osteoporózis esetén a magasabb karbonát/foszfát tartalomhoz alacsonyabb denzitometriai eredmények társulnak (Faibish et al. 2006).

A dentin és csontok extracelluláris mátrixában sok a hasonlóság (Opsahl Vital et al. 2012). A dentin extracelluláris mátrixának fő alkotóeleme az I-es típusú kollagén, mely a mineralizáció strukturális vázát adja. A kollagén specifikus területeihez asszociáltan találhatóak a nem-kollagén fehérjék, melyek a hidroxipatit kristály nukleációját és növekedését szabályozzák (Seow, 2014). A mátrixban található alkalikus-foszfátáz enzim feltehetően az anorganikus

foszfát biztosítása (defoszforizálás) révén játszik fontos szerepet a mineralizációban (Goldberg et al. 2011). Oszteogenezisben a PACAP fokozta mind az alkalikus foszfatáz, mind az I-es típusú kollagén mennyiségét. Ezen felül a PACAP feltehetően indirekt módon befolyásolhatja az oszteoblasztok Ca^{2+} transzportját, és fokozza a csont mátrix mineralizációját is (Juhasz et al. 2014).

A génihiányos csoport dentinjében talált szerkezeti eltérések mind a 7 napos, mind az 1 éves csoport esetén (nagyobb mértékű karbonát szubsztitúció, csökkent kristályosság, nagyobb rendezetlenség) a dentin csökkent ellenállásra utal, mivel a kisebb kristallit méret a specifikus felszín növekedésével jár, ezáltal nagyobb felszínt biztosítva a savas behatásoknak (Featherstone et Lussi, 2006). A felnőtt egerek esetében ez lehet oka szűkebb pulpakamrának.

A Raman mikroszkópia az egy éves egerek metszőfogainak dentinjének fehérje struktúrájában is különbségeket mutatott a két csoport összehasonlítása során. Az amid III 1240/1270 csúcsok arányai a vad-típusú egerekben szélesebb skálán helyezkedik el, ami egy nagyobb fokú strukturális diverzitásra (több „random coil”) utal a fehérjék másodlagos konformációját illetően. A dentin kialakulásának és mineralizációjának pontos mechanizmusa még nem pontosan ismert. A dentin fehérjék predomináns alkotóeleme az I-es típusú kollagén. Az egyéb fehérjéket a dentinben a nem-kollagén fehérjék (NCP-non-collagenous protein) csoportjába soroljuk. Az NCP és ezen belül is a kis integrin kötő N-glikolizált fehérjék (SIBLING-small-integrinbindingligand, N-linked glycoproteins) fontos szerepet játszanak a kristálynövekedés és a mineralizáció szabályozásában (Butler and Ritchie, 1995; Qin et al. 2004; Orsini et al. 2008). Korábbi vizsgálatok igazolták a SIBLING fehérjecsaldába tartozó dentin mátrix protein-1 (DMP1) fehérje fontos szabályozó szerepét a biomineralizáció szabályozásában. Teljes hosszúságú DMP1 gátolja a hidroxapatit kialakulását és növekedését, míg N-terminális fragmentuma (37K) hidroxapatit képzést indukál. A teljes láncú fehérje konformációja változik a hidroxapatithoz való kötődés során (Gericke et al. 2010). A fehérje „random coil” struktúrái lehetővé teszik a kötődést az ásványi anyagokhoz, a kollagénhez és a sejt felszínéhez (Boskey et Robey, 2013).

A metszőfogak morfológiáját, a kemény szövetek kialakulását és a fogak méretét a fogfejlődésben résztvevő jelátviteli útvonalak finom összehangolt egyensúlya határozza meg. A teljes mechanizmus nem tisztázott, és fogtípusok között is jelentős eltérések vannak a

molekuláris szabályozásban (Wang et al. 2007a; Tummers et Thesleff, 2009; Jussila et Thesleff, 2012).

Eredményeink, miszerint a PACAP hatással lehet a fogak fejlődésére, nem meglepő a számtalan fejlődésben kimutatott szerepének ismeretében. A PACAP és receptorai számos szervben megtalálható, és fejlődésükre hatással van az embrionális élet során (Waschek, 2002). A 7 napos egerek moláris fogain végzett immunhisztokémiai vizsgálatban a PACAP-génhiányos csoportban a csökkent PAC1 szignáltranszdukciós kaszkád „downstream target” aktivációja fokozott SHH, PTCH1 és Gli expressziót eredményezett. Kutatásokban igazolódott, hogy más szövetekben is befolyásolja a PACAP a fogfejlődésben résztvevő és leggyakrabban tanulmányozott faktorok, mint az SHH és a BMP-k expresszióját (Dassule et al. 2000; Jernvall et Thesleff, 2000; Thesleff, 2006; Bei, 2009). Az Shh gén expresszió szabályozásáért a Runx2 (Runt-related transcription factor) transzkripciós faktor felelős, melynek aktivációja (foszforilációja) a PKA-n keresztül történik (Juhász et al. 2015). Az SHH expresszió Runx2 transzkripciós faktor általi szabályozását fogban is igazolták, ahol Runx2^{-/-} (génhiányos) egerek alsó moláris fogaiban hiányzik, a felső molárisokban csökkent SHH expressziót figyeltek meg (Wang et al. 2005). A BMP jelátviteli útvonalaknak jelentős szerepe van a szkeletális fejlődésben és az őssejtek differenciációjában. BMP2 és BMP 4 receptorán BMPRI keresztül az intracelluláris Smad (transzkripciós faktor) aktivációt eredményez (Zhang et al. 2016). A BMP receptorok ktivációja a csontban alkalikus foszfatáz, I-es típusú kollagén vagy csont specifikus gének expressziójához vezet, mint az osterix transzkripciós faktor. A BMP-k expresszióját a CREB (cAMP-reszponzív elem kötő fehérje- cAMP response element-binding protein) transzkripciós faktor szabályozza a PKA jelátviteli útvonalon keresztül (Juhász et al. 2014, 2015).

A PACAP ezen útvonalakra gyakorolt hatásainak vizsgálati eredményei nem konzekvensek. Osteosarcoma sejtvonalban (UMR-106) az oszteogenezis során az exogén PACAP fokozza a BMP-k (2,4,6,7) és az SHH expresszióját (Juhász et al. 2014), míg más vizsgálatokban a PACAP BMP4 és SHH antagonistájaként viselkedett. A PACAP receptorok által szabályozott protein kináz A (PKA) aktiváció a Gli1 transzkripciós funkcióját gátolja, következésképpen a PACAP idegi struktúrákban az SHH jelátvitel szupresszoraként viselkedik (Otto et al. 2000; Nicot et al 2002; Lelievre et al. 2006; Hirose et al. 2011; Niewiadomski et al.

2013). Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a PACAP szerepe sejt specifikusan függ bizonyos növekedési faktorok jelenlététől (Lelievre et al. 2006).

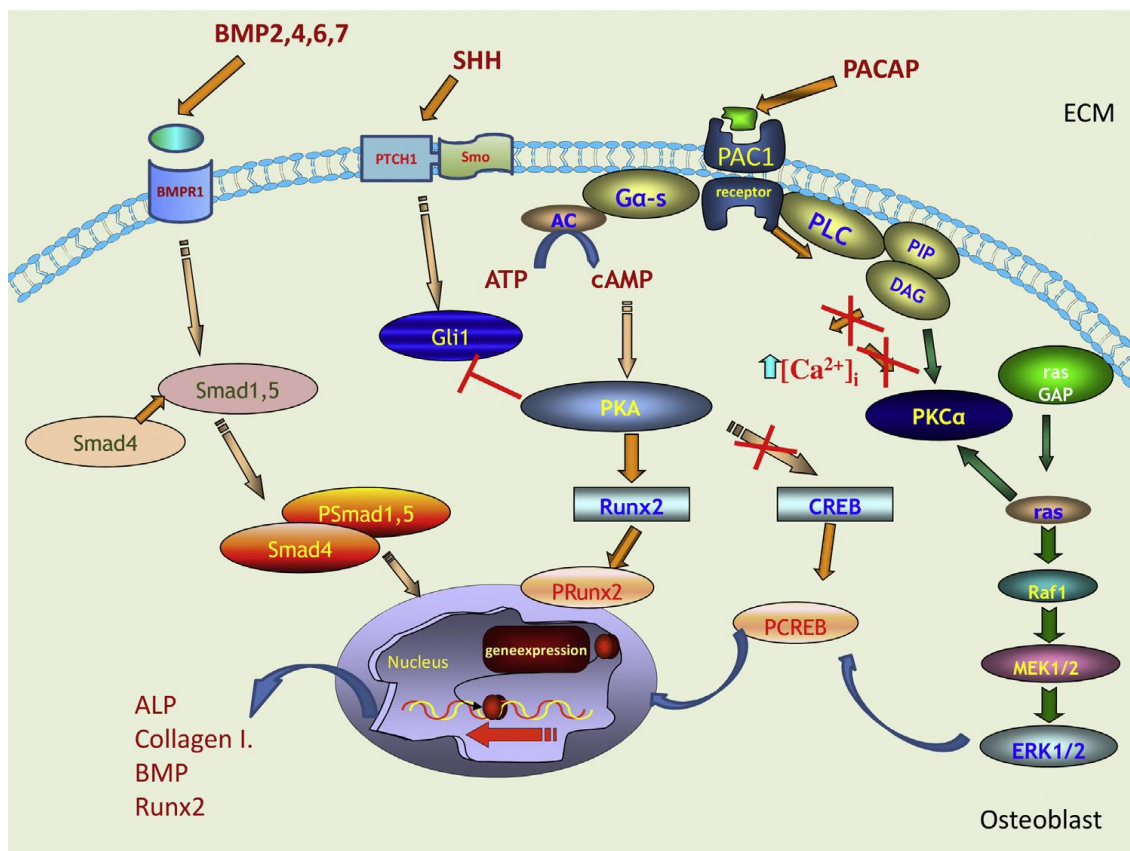
A főbb faktorok közül a BMP4, BMP2 és az FGF8-nak jelentős szerepe van a homeobox gének expressziójának szabályozásában. A sejtek differenciációja és a morfogenezis homeobox gén expresszió által vezérelt folyamatok. A test különböző területein kialakuló egyedi struktúrák fejlődésének szabályozásában a homeobox gének játsszák a fő szerepet. A homeobox gének 180 bázispár hosszú DNS szakaszok, melyek a DNS-kötő homeodomén (60 bázispár) fehérjéket kódolják, mely más gének expresszióját szabályozzák (transzkripciós faktorok) (Suryadeva et Khan, 2015). Fogfejlődés (6. ábra) során a legkorábban megjelenő mesenchymális markerek az Lhx-6 és Lhx-7 (Lim homeobox gén) melyeket az epitheliális eredetű FGF8 indukál. Elsők között jelenik expresszáldik a Pax9 (paired box-9) gén, mely a fogak lokalizációját határozza meg. Ennek expresszióját az FGF8 indukálja, míg a BMP2 és BMP4 a gén regressziójához vezet (Nanci, 2013b). A homeobox gének közül fokozott Msx1 (muscle segment box) expresszió figyelhető meg sapka stádiumban a zománccsomó és a belső zománchám területén, és fokozott Msx2 expresszió figyelhető meg az odontoblasztokban. A Dlx (distal less box) gének megfigyelhetőek mind az epitheliumban, mind a mesenchymában. Dlx2 és Dlx3 szerepet játszik az ameloblaszt differenciációban és az amelogenezisben csírástádiumban (bud stage). Dlx1 és Dlx6 expresszió figyelhető meg a sapka stádiumban és korai harang stádiumban, Dlx5 pedig a „nyaki hurokban” expresszáldik (Rinky et al. 2013). A csírák kialakulását megelőzően Msx1 és Msx2 csak a metszők területén, míg Dlx1 és Dlx2 a több csücskű fogak területén expresszáldik. A Barx1 (BarH-like homeobox 1) gén expressziója a metszőfog területén moláris fog fejlődéséhez vezet. Moláris fogak területén a FGF8 indukálja a Barx1 expresszióját, míg a metszőfogak területén BMP4 regresszálja azt. A BMP4 expresszió kísérletes gátlása metszőfogak területén, Barx1 indukációjához és MSX gén regressziójához vezet (Nanci, 2013b). Fontos azonban megjegyezni, hogy a BMP4 és az SHH útvonal nem független egymástól. Az epitheliumban expresszáldó BMP4, MSX1, MSX2, és LEF1 expressziót indukál a mesenchymában. MSX1-en keresztül indukált mesenchymális BMP4 expresszió, az epitheliumra „feedback”-ként hatva fenntartja az SHH expresszióját. BMP4 gátlása az SHH regressziójához vezet. Ezzel szemben az a BMP4 túlzott expressziója is az SHH és BMP2 szint regresszióját okozza (Zhang et al. 2000; Nie et al. 2006).

Az SHH befolyásolja a differenciációt, a növekedést, a sejtek polarizációját (ameloblasztok és odontoblasztok) és a csücsök morfológiáját a fogfejlődés során (Gritli-Linde et al. 2002; Zhang et al. 2008), így SHH jelátvitel fokozott aktivációja a 7 napos PACAP-génhiányos egerek fejlődő molárisaiban részben felelős lehet a vizsgálatainkban talált különbségekért, úgymint a génhiányos állapotokban talált csücsök morfológiai eltérésekéért.

A leírtakon túl, miszerint a csont és a dentin extracelluláris mátrixában sok a hasonlóság, fejlődésük is hasonló, szabályozásában ugyanazon molekulák játszanak szerepet (BMP, SHH, WNT), feltehetően ugyanazon funkcióval (Goldberg et al. 2011). A csontokhoz hasonlóan a dentin fejlődése, az odontoblasztok differenciációjával kezdődik a dentális papillában (ectomesenchyma), az epithelialis eredetű belső zománchám által termelt növekedési faktorok és jelátviteli molekulák hatására. A dentin fejlődés következő lépése az organikus mátrix kialakulása, melyet a mátrix mineralizációja követ (Nanci, 2013d). Oszteoblasztokban exogén PACAP RUNX2 faktor expresszió fokozódást indukál (Juhász et al. 2015). A RUNX2 faktornak jelentős szerepe van az odontoblasztok differenciációjának szabályozásában, expresszióját többek közt a WNT jelátviteli útvonal indukálja (Lim et al. 2014). A WNT-k a β -catenin független útvonalon (nem-kanonikus) (McCarthy és Centrella, 2010), és a β -catenin függő (kanonikus) útvonalon is képes a RUNX2 faktor indukációjára (Gaur et al. 2005). A WNT/ β -catenin útvonal jelentős szerepet játszik a fogak morfogenezisében, bár az egyéb jelátviteli útvonalakkal való interakciói még nem tisztázottak (Liu et al. 2008). Mesenchymális WNT/ β -catenin jelátvitel gátolja az FGF10 antiapoptotikus hatását a metszőfogak „nyaki hurka” (cervical loop) körül található mesenchymában (apikális papilla) (Yang et al. 2015). Kimutatták, hogy a megváltozott FGF10 expresszió (FGF10 génhiányos egerek, késői FGF10 expresszió) a metszőfogak csökkent méretéhez vezet (Yokohama-Tamaki et al. 2006; Kyrylkova et al. 2012). A PAC1 receptor ligandtól független aktivációja direkt hatással van a WNT/ β -catenin útvonalra. A PAC1 receptor ligand independens intrinsic/nyugalmi aktivációja kulcsfontosságú szerepet játszik a WNT/ β -catenin jelátviteli út aktivációjában és szabályozásában, a PAC1 receptor dimer képződése révén. Felvetődik a lehetősége, hogy a PACAP gátolja a PAC1 receptor dimerizációját, ezáltal blokkolva a ligand független aktivitását (Yu et al. 2014). Ezek alapján feltételezzük, hogy PACAP hiányában a génhiányos egerekben a ligand independens hatás és ennek következtében a WNT/ β -catenin jelátviteli út serkentődik, mely felelős lehet a PACAP-génhiányos egerekben talált kisebb méretű metszőfogakéért. A WNT / β -catenin túl-aktivációja a

belső zománchám és a mesenchyma késői és elhúzódó differenciációját eredményezi, mely a fogak morfológiai és mineralizációs eltéréséhez vezet (Zhang et al. 2016). A β -catenin folyamatos aktivációja a dentális papilla mesenchymális sejtjeiben fokozott dentin képződéshez vezet (Kim et al. 2011), mely felelős lehet a szűkebb pulpaúrért. A WNT/ β -catenin független jelátviteli útvonalak és a PACAP illetve PAC1 receptor összefüggéseire jelenleg nincs információ az irodalomban. A WNT jelátvitelben a Wingless saperon fehérje esszenciális. Ennek deléciónja (Wlsfl/fl egerek) osteoclastin expresszáló sejtekben (oszteoblaszt, odontoblaszt, cementoblaszt, ameloblaszt) a dentin fejlődés zavarához vezet. A legszembetűnőbb morfológiai változás a génhányos csoportban a pulpakamra szűkülése, fokozott dentin vastagság mellett. Ennek hátterében a Runx2 faktor odontoblaszt differenciációt gátló hatásának (DSP gátlás, melynek feloldása szükséges az odontoblaszt differenciációhoz) hiányát feltételezik. Lee és munkatársai vizsgálatában a megnövekedett dentin volumen és szűkebb pulpakamra mellé fokozott dentin denzitás is társult, melyet vizsgálataik alapján nem WNT jelátvitel hiánya okoz (Lee et al. 2014). Mivel a PACAP szintén képes a Runx2 transzkripció faktor indukciójára PKA aktivációján keresztül (25. ábra), feltételezhető, hogy a PACAP-génhányos csoportban, a csökkent faktorszint okozza a metszőfogakban Lee és munkatársai vizsgálatához hasonló eltéréseket.

A fogak fejlődésének előzőekben leírt komplex szabályozása lehetőséget ad a PACAP interakciójára a különböző jelátviteli folyamatokban. Pontos szerepének és intrakciónak megismeréséhez további molekuláris biológiai vizsgálatok szükségesek. A PACAP hatásait csontban a fogfejlődésben ismert faktorokra korábban leírták (Juhász et al. 2015). A csont és fogak fejlődésében igazolt hasonlóságok miatt feltételezhetően a PACAP hatásai a fogakban is ugyanúgy érvényesülnek. A PAC1 receptor aktivációja intracellulárisan PKA aktivációt eredményez a megemelkedett cAMP szint eredményeként. Oszteoblasztban a CREB aktivációja PKA hatására nem jelentős. Ugyanakkor PACAP fokozza Runx2 expresszióját. SHH kötődése receptorához Gli1 nukleáris transzlokációját indukálja, a megemelkedett PKA szint szupresszálja (25. ábra) (Juhász et al. 2015). Érdekes módon oszteoblasztokban Runx2 maturációt indukál, míg odontoblasztokban az odontoblasztok differenciációját gátolja (Lim et al. 2014).



25. ábra: Az ábra a PACAP jelátvitel hatásait mutatja be oszteogén sejt differenciációban (oszteoblaszt) (Juhasz et al. 2015).

A fogfejlődés teljes molekuláris mechanizmusa máig nem tisztázott, és a hét napos egerek fejlődő moláris fogain végzett vizsgálatok immunhisztokémiai eredményei alapján feltételezhetjük, hogy a PACAP hiánya a faktorok érzékeny egyensúlyának zavarához vezet (Nagatomo et al. 2008). A hét napos PACAP-génhiányos egerekben végzett vizsgálatok a fogon elsőként mutatták ki, hogy a PACAP szerepet játszhat a fogfejlődés molekuláris szabályozásában.

Kutatásainkkal sikerült igazolni, hogy az endogén PACAP hiánya eltérésekhez vezet a fogak fejlődésében, mineralizációjában. Megállapításunk nem meglepő annak tükrében, hogy a PACAP fontos szerepet játszik az idegrendszer fejlődésében, és a fogak egyes részei (dentin, cement pulpa, és parodontális struktúrák) is a neuroectodermából fejlődnek. A mineralizációban és morfológiában tapasztalt eltérések esetén kérdéses, hogy a fogakban mért különbség a génhiányos csoportban a PACAP hiányának direkt hatása, vagy az egyéb fiziológiás

funkciókban bekövetkezett változások következménye-e. Kutatócsoportunk PACAP-génhiányos csoportban lassabb súlynövekedést figyelt meg. Ugyanebben a vizsgálatban a metszőfogak korábbi előtörését tapasztaltuk a génhiányos csoportban (Farkas et al. 2017). Bár ezek alapján feltételezhető, hogy a PACAP hiánya indirekten befolyásolja a fogak fejlődését, a 7 napos egereken, a fogfejlődésben résztvevő jelátviteli útvonalakon végzett immunhisztokémiai vizsgálatok direkt hatást igazolnak, hasonlóan a csontok és porcok fejlődésében résztvevő jelátviteli útvonalakhoz (Juhász et al. 2015.).

Jövőbeli céljaink között vizsgálni szeretnénk a PACAP és a fogfejlődésben résztvevő jelátviteli útvonalak összefüggéseit, illetve a PACAP antiinflammatorikus és antiapoptotikus hatásait a fogak pulpájára.

A fogak regeneratív, revitalizációs, illetve a pulpa gyulladásainak kezelési lehetőségei folyamatos kutatások célpontja. Mivel a fejlődő fogak gyökéri területén nagy számban találhatóak multipotens mesenchymális sejtek (SCAP- stem cell apical papilla), melyek nagy potenciállal rendelkeznek a fogak regenerációjában, célunk a pulpa ilyen irányú revitalizációs lehetőségeit vizsgálni. A mindennapi klinikai gyakorlatban ezen sejtek differenciációs és regeneratív potenciálját felhasználjuk a „*regeneratív endodonciai*” kezeléseink során. Ismerve a PACAP antiinflammatorikus valamint az itt bemutatott hatásait a fogak fejlődésére, felmerül a lehetősége a PACAP ilyen célú felhasználásának, bár ehhez további vizsgálatok szükségesek.

A parodontális ligamentum multipotens sejtjeiben rejlő lehetőségek a parodoncium regeneratív kezeléseiben a kutatásokat a növekedési faktorok és citokinek alkalmazásának irányába mozdította el (Chen et al. 2011). Nonaka korábban leírta a parodoncium regenerációja során a PAC1 receptorok aktivációját, illetve a PACAP pozitív idegrostok számának emelkedését (Nonaka et al. 2013). Ezek alapján feltételezhető, hogy a PACAP szerepet játszhat a fogágy regenerációjában.

Itt fontos megjegyezni, hogy más jelátviteli útvonalakhoz hasonlóan a PACAP hatásai eltérhetnek sejt (szövet) specifikusan, ezért e folyamatok molekuláris biológiai feltérképezése munkacsoportunk későbbi célja.

6. Összefoglalás

A munkánk során a következő új eredményeket mutattuk ki a PACAP-génhiányos és vad-típusú egerek fogfejlődésének összehasonlítása során:

1. Morfometriai mérés alapján 7 napos homozigóta PACAP-génhiányos egerek moláris fogaiban a dentin fejlődése elmarad a vad-típusú alomtestvérek moláris fogaihoz képest.
2. Strukturálisan eltérés mutatkozott a 7 napos vad-típusú és PACAP-génhiányos egerek moláris fogainak zománcában és dentinjében. A génhiányos csoport dentinjében magasabb karbonát tartalmat, nagyobb fokú rendezetlenséget és alacsonyabb kristályosságot igazoltunk (CI_{Raman}). A zománc fehérjék másodlagos struktúrájában nagyobb fokú diverzitást találtunk a vad-típusú csoportban.
3. A 7 napos egerek immunhisztokémiai vizsgálatával az SHH jelátviteli útvonalban eltérés mutatkozott. A PACAP-génhiányos csoportban fokozottabb SHH/PTCH1/Gli1 expressziót találtunk, mely az irodalommal összhangban van, miszerint a PACAP antagonizálja az SHH jelátviteli útvonalat.
4. Felnőtt (1 éves) egerek vizsgálata során mikro-CT-vel végzett morfometriai összehasonlítással eltérést találtunk a fogak méretében, a pulpa méretében, a dentin denzitásában. A PACAP-génhiányos egerek alsó metszőfogai szignifikánsan kisebbek, a pulpa a dentinhez viszonyítva kisebb és a dentin denzitása alacsonyabb a vad-típusú egerekhez képest.
5. Strukturális vizsgálattal a metszőfogak dentinjében magasabb karbonát tartalmat, nagyobb fokú rendezetlenséget találtunk. A dentin fehérjék összehasonlítása során a vad-típusú egerekben nagyobb fokú diverzitást találtunk a másodlagos struktúrában.

7. Irodalomjegyzék

Adams BA, Gray SL, Isaac ER, Bianco AC, Vidal-Puig AJ, Sherwood NM (2008) Feeding and metabolism in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Endocrinology* 149:1571-1580.

Allais A, Burel D, Isaac ER, Gray SL, Basille M, Ravni A, Sherwood NM, Vaudry H, Gonzalez BJ (2007) Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Eur J Neurosci.* 25:2604-2618.

Arimura A (1998) Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn J Physiol.* 48:301-331. Review.

Arimura A (2007) PACAP: the road to discovery. *Peptides* 28:1617-1619.

Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Weill C, Fiore RC, Tatsuno I, Bay V, Brenneman DE (1994) PACAP functions as a neurotrophic factor. *Ann N Y Acad Sci.* 739:228-243.

Atlasz T, Vaczy A, Werling D, Kiss P, Tamas A, Kovacs K, Fabian E, Kvarik T, Mammel B, Danyadi B, Lokos E, Reglodi D (2016) Protective Effects of PACAP in the Retina. In: Reglodi D, Tamas A (eds) *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide - PACAP. Current Topics in Neurotoxicity* vol 11; Springer, New York, pp. 501-527.

Bansal AK, Shetty DC, Bindal R, Pathak AJ (2012) Amelogenin: A novel protein with diverse applications in genetic and molecular profiling. *Oral Maxillofac Pathol.* 16:395-359.

Bartlett JD (2013) Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. *ISRN Dent.* 2013:684607. Review.

BeiM (2009) Molecular genetics of tooth development. *Curr Opin Genet Dev.* 19:504-510.

Beniash E, Simmer JP, Margolis HC (2012) Structural changes in amelogenin upon self-assembly and mineral interactions. *J Dent Res.* 91:967-972.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) Section 3.6, The amino acid sequence of a protein determines its three-dimensional structure in *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22342/>

Blechman J, Levkowitz G (2013) Alternative splicing of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor PAC1: mechanisms of fine tuning of brain activity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 4:55.

Boras-Granic K, Chang H, Grosschedl R, Hamel PA (2006) LEF1 is required for the transition of WNT signaling from mesenchymal to epithelial cells in the mouse embryonic mammary gland. *Dev Biol*. 295:219-231.

Boskey AL, Robey PG (2013) The regulatory role of matrix proteins in mineralization of bone in osteoporosis. Vol. 1. Marcus R, Feldman D, Dempster DW, Luckey M, Cauley JA; 4th ed. Elsevier Academic Press, Waltham, MA, pp. 235-255.

Botia B, Basille M, Allais A, Raoult E, Falluel-Morel A, Galas L, Jolivel V, Wurtz O, Komuro H, Fournier A, Vaudry H, Burel D, Gonzalez BJ, Vaudry D (2007) Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides* 28:1746-1752. Review.

Butler WT, Ritchie H (1995) The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol*. 39:169-179.

Caton J, Tucker AS (2009) Current knowledge of tooth development: patterning and mineralization of the murine dentition. *J Anat*. 214:502-515.

Chen FM, An Y, Zhang R, Zhang M (2011) New insights into and novel applications of release technology for periodontal reconstructive therapies. *J Control Release*. 149:92-110.

Chen Y, Samal B, Hamelink CR, Xiang CC, Chen Y, Chen M, Vaudry D, Brownstein MJ, Hallenbeck JM, Eiden LE (2006) Neuroprotection by endogenous and exogenous PACAP following stroke. *Regul Pept*. 137:4-19.

Cummings KJ, Pendlebury JD, Sherwood NM, Wilson RJ (2004) Sudden neonatal death in PACAP-deficient mice is associated with reduced respiratory chemoresponse and susceptibility to apnoea. *J Physiol.* 555(Pt 1):15-26.

Dassule HR, Lewis P, Bei M, Maas R, McMahon AP (2000) Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* 127:4775-4785.

de Mul FF, Hottenhuis MH, Bouter P, Greve J, Arends J, ten Bosch JJ (1986) Micro-Raman line broadening in synthetic carbonated hydroxyapatite. *J Dent Res.* 65:437-440.

Dessombz A, Lignon G, Picaud L, Rouziere S, Berdal A (2016) Mineral studies in enamel, an exemplary model system at the interface between physics, chemistry and medical sciences. *C R Chim.* 19:1656-1664.

Diane A, Nikolic N, Rudecki AP, King SM, Bowie DJ, Gray SL (2014) PACAP is essential for the adaptive thermogenic response of brown adipose tissue to cold exposure. *J Endocrinol.* 222:327-339.

Dollish FR, Fateley WG, Bentley FF (1974) Characteristic Raman frequencies of organic compounds, Wiley, New York.

Farkas J, Sandor B, Tamas A, Kiss P, Hashimoto H, Nagy AD, Fulop BD, Juhasz T, Manavalan S, Reglodi D (2017) Early neurobehavioral development of mice lacking endogenous PACAP. *J Mol Neurosci.* 61:468-478.

Faibish D, Ott SM, Boskey AL (2006) Mineral changes in osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res.* 443:28-38. Review.

Featherstone JD, Lussi A (2006) Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 20:66-76.

Felszeghy S, Modis L, Nemeth P, Nagy G, Zelles T, Agre P, Laurikkala J, Fejerskov O, Thesleff I, Nielsen S (2004) Expression of aquaporin isoforms during human and mouse tooth development. *Arch Oral Biol.* 49:247-257.

Ferencz A, Weber G, Helyes Z, Hashimoto H, Baba A, Reglodi D (2010) Presence of endogenous PACAP-38 ameliorated intestinal cold preservation tissue injury. *J Mol Neurosci.* 42:428-434.

Fisher CE, Howie SE (2006) *Molecular Biology Intelligence Unit: SHH and Gli signalling and development.* Springer, New York.

Fukae M, Shimizu M (1974) Studies on the proteins of developing bovine enamel. *Arch Oral Biol.* 19:381-386.

Gasz B, Racz B, Roth E, Borsiczky B, Tamas A, Boronkai A, Gallyas F Jr, Toth G, Reglodi D (2006) PACAP inhibits oxidative stress-induced activation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in cultured cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1070:293-297.

Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyann H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB (2005) Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem.* 280:33132-33140.

Gericke A, Qin C, Sun Y, Redfern R, Redfern D, Fujimoto Y, Taleb H, Butler WT, Boskey AL (2010) Different forms of DMP1 play distinct roles in mineralization. *J Dent Res.* 89:355-359.

Gibson CW (2011) The amelogenin proteins and enamel development in humans and mice. *J Oral Biosci.* 53:248-256.

Goldberg M, Kellermann O, Dimitrova-Nakov S, Harichane Y, Baudry A (2014) Comparative studies between mice molars and incisors are required to draw an overview of enamel structural complexity. *Front Physiol.* 5:359.

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A (2011) Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed).* 3:711-735. Review.

Gray SL, Yamaguchi N, Vencova P, Sherwood NM (2002) Temperature-sensitive phenotype in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Endocrinology* 143:3946-3954.

Gritli-Linde A, Bei M, Maas R, Zhang XM, Linde A, McMahon AP (2002) SHH signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development* 129:5323-5337.

Grumolato L, Liu G, Haremake T, Mungamuri SK, Mong P, Akiri G, Lopez-Bergami P, Arita A, Anouar Y, Mlodzik M, Ronai ZA, Brody J, Weinstein DC, Aaronson SA (2013) β -Catenin-independent activation of TCF1/LEF1 in human hematopoietic tumor cells through interaction with ATF2 transcription factors. *PLoS Genet.* 9:e1003603.

Hashimoto H, Hashimoto R, Shintani N, Tanaka K, Yamamoto A, Hatanaka M, Guo X, Morita Y, Tanida M, Nagai K, Takeda M, Baba A (2009) Depression-like behavior in the forced swimming test in PACAP-deficient mice: amelioration by the atypical antipsychotic risperidone. *J Neurochem.* 110:595-602.

Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tamimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A (2001) Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci. USA* 98:13355-13360.

Hart PS, Hart TC (2007) Disorders of human dentin. *Cells Tissues Organs.* 186:70-77.

Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, Sharpe PT (1998) The SHH signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development* 125:2803-2811.

Hargreaves KM, Berman LH (2016) Vital pulp therapy in Cohen's pathways of the pulp expert consult, 11th edn. Elsevier, St. Louis, pp. 849-476.

He XY, Sun K, Xu RS, Tan JL, Pi CX, Wan M, Peng YR, Ye L, Zheng LW, Zhou XD (2016) Spatial signalling mediated by the transforming growth factor- β signalling pathway during tooth formation. *Int J Oral Sci.* 8:199-204.

Heimesaat MM, Dunay IR, Schulze S, Fischer A, Grundmann U, Alutis M, Kuhl AA, Tamas A, Toth G, Dunay MP, Gobel UB, Reglodi D, Bereswill S (2014) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ameliorates experimental acute ileitis and extra-intestinal sequelae. *PLoS One* 9:e108389.

Hirose M, Niewiadomski P, Tse G, Chi GC, Dong H, Lee A, Carpenter EM, Waschek JA (2011) Pituitary adenylyl cyclaseactivating peptide counteracts hedgehog-dependent motor neuron production in mouse embryonic stem cell cultures. *J Neurosci Res.* 89:1363-1374.

Ichikawa H, Sugimoto T (2003) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-immunoreactive nerve fibers in rat and human tooth pulps. *Brain Res.* 980:288-292.

Jernvall J, Thesleff I (2000) Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev.* 92:19-29.

Jernvall J, Thesleff I (2012) Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. *Development* 139:3487-3497.

Journot L, Spengler D, Pantaloni C, Dumuis A, Sebben M, Bockaert J (1994) The PACAP receptor: generation by alternative splicing of functional diversity among G protein-coupled receptors in nerve cells. *Semin Cell Biol.* 5:263-272.

Juhasz T, Matta C, Katona E, Somogyi C, Takacs R, Hajdu T, Helgadottir SL, Fodor J, Csernoch L, Toth G, Bako E, Reglodi D, Tamas A, Zakany R (2014) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) signalling enhances osteogenesis in UMR-106 cell line. *J Mol Neurosci.* 54:555-573.

Juhasz T, Helgadottir SL, Tamas A, Reglodi D, Zakany R (2015) PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis. *Peptides.* 66:51-57.

Jussila M, Thesleff I (2012) Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(4):a008425.

Kyrylkova K, Kyryachenko S, Biehs B, Klein O, Kioussi C, Leid M (2012) BCL11B regulates epithelial proliferation and asymmetric development of the mouse mandibular incisor. *PLoS One* 7:e37670.

Komiya Y, Habas R (2008) WNT signal transduction pathways. *Organogenesis* 4:68-75.

Kratochwil K, Galceran J, Tontsch S, Roth W, Grosschedl R (2002) FGF4, a direct target of LEF1 and WNT signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in LEF1 (-/-) mice. *Genes Dev.* 16:3173-3185.

Kim TH, Lee JY, Baek JA, Lee JC, Yang X, Taketo MM, Jiang R, Cho ES (2011) Constitutive stabilization of β -catenin in the dental mesenchyme leads to excessive dentin and cementum formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 412:549-555.

Kvarik T, Mammel B, Reglodi D, Kovacs K, Werling D, Bede B, Vaczy A, Fabian E, Toth G, Kiss P, Tamas A, Ertl T, Gyarmati J, Atlasz T (2016) PACAP is protective in a rat model of retinopathy of prematurity. *J Mol Neurosci.* 60:179-185.

Laburthe M, Couvineau A (2002) Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP. *Regul Pept.* 108:165-173.

Lakshminarayanan R, Bromley KM, Lei YP, Snead ML, Moradian-Oldak J (2010) Perturbed amelogenin secondary structure leads to uncontrolled aggregation in amelogenesis imperfecta mutant proteins. *J Biol Chem.* 285:40593-40603.

Laszlo E, Kiss P, Horvath G, Szakaly P, Tamas A, Reglodi D (2014) The effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in renal ischemia/reperfusion. *Acta Biol Hung.* 65:369-378.

Lee EH, Seo SR (2014) Neuroprotective roles of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in neurodegenerative diseases. *BMB Rep.* 47: 369-375.

Lelievre V, Ghiani CA, Seksenyan A, Gressens P, de Vellis J, Waschek JA (2006) Growth factor-dependent actions of PACAP on oligodendrocyte progenitor proliferation. *Regul Pept.* 137:58-66.

Lesot H, Brook AH (2009) Epithelial histogenesis during tooth development. *Arch Oral Biol.* 54 Suppl 1:S25-33.

Li CY, Prochazka J, Goodwin AF, Klein OD (2014) Fibroblast growth factor signaling in mammalian tooth development. *Odontology* 102:1-13.

Lim WH, Liu B, Cheng D, Hunter DJ, Zhong Z, Ramos DM, Williams BO, Sharpe PT, Bardet C, Mah SJ, Helms JA (2014) WNT signaling regulates pulp volume and dentin thickness. *J Bone Miner Res.* 29:892-901.

Lindholm D, Makela J, Korhonen L (2016) PACAP and Neural Progenitor Cells. In: Reglodi D, Tamas A (eds) *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide - PACAP. Current Topics in Neurotoxicity* vol 11; Springer, New York, pp. 53-63.

Liu F1, Chu EY, Watt B, Zhang Y, Gallant NM, Andl T, Yang SH, Lu MM, Piccolo S, Schmidt-Ullrich R, Taketo MM, Morrisey EE, Atit R, Dlugosz AA, Millar SE (2008) WNT/beta-catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis. *Dev Biol.* 313:210-224.

Maasz G, Pirger Z, Reglodi D, Petrovics D, Schmidt J, Kiss P, Rivnyak A, Hashimoto H, Avar P, Jambor E, Tamas A, Gaszner B, Mark L (2014) Comparative protein composition of the brains of PACAP-deficient mice using mass spectrometry-based proteomic analysis. *J Mol Neurosci.* 54:310-319.

Margolis HC, Beniash E, Fowler CE (2006) Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *J Dent Res.* 85:775-793.

Matthaus C, Bird B, Miljkovic M, Chernenko T, Romeo M, Diem M (2008) Chapter 10: Infrared and Raman microscopy in cell biology. *Methods Cell Biol.* 89:275-308.

McCabe PS, Dummer PM (2012) Pulp canal obliteration: an endodontic diagnosis and treatment challenge. *Int Endod J* 45:177-197. Review.

McCarthy TL, Centrella M (2010) Novel links among WNT and TGF-beta signaling and Runx2. *Mol Endocrinol.* 24:587-97.

Mihu CM, Dudea D, Melincovici C, Bocsa B (2008) Tooth enamel, the result of the relationship between matrix proteins and hydroxyapatite crystals. *Appl Med Inform.* 23:68-72.

Mitsiadis TA, Pagella P (2016) Expression of nerve growth factor (NGF), TrkA, and p75 (NTR) in developing human fetal teeth. *Front Physiol.* 7:338.

Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 164:567-574.

Miyata A, Jiang L, Dahl RD, Kitada C, Kubo K, Fujino M, Minamino N, Arimura A (1990) Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun.* 170:643-648.

Mori H, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Sato A, Endo K, Iso Y, Suzuki H, Takeyama Y, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Shioda S (2010) Cardioprotective effect of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on Doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Circ J.* 74:1183-1190.

Mounien L, Do Rego JC, Bizet P, Boutelet I, Gourcerol G, Fournier A, Brabet P, Costentin J, Vaudry H, Jegou S (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits food intake in mice through activation of the hypothalamic melanocortin system. *Neuropsychopharmacology* 34:424-435.

Nagatomo KJ, Tompkins KA, Fong H, Zhang H, Foster BL, Chu EY, Murakami A, Stadmeier L, Canalis E, Somerman MJ (2008) Transgenic overexpression of gremlin results in developmental defects in enamel and dentin in mice. *Connect Tissue Res.* 49:391-400.

Nanci A (2013a) General embriology in Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 8th Edition. Mosby, St. Louis, pp. 14-25.

Nanci A (2013b) Development of the tooth and its supporting tissues in Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 8th Edition. Mosby, St. Louis, pp. 70-94.

Nanci A (2013c) Enamel: composition, formation and structure in Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 8th Edition. Mosby, St. Louis, pp. 122-164.

Nanci A (2013d) Dentin-pulp complex in Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 8th Edition. Mosby, St. Louis, pp. 165-204.

Nedvig K, Szabo G, Csukas D, Sandor J, Nemeth J, Kovacs K, Reglodi D, Kemeny A, Weber G, Ferencz A (2013) Examination of cytoprotective and anti-inflammatory effect of PACAP-38 on small bowel autotransplantation. *Magy Seb.* 66:250-255.

Nelson DL, Cox MM (2008) The three-dimensional structure of proteins in Lehninger Principles of Biochemistry. 5th edition. W.H. Freeman, New York, pp. 117-118.

Nemeth A, Szabadfi K, Fulop B, Reglodi D, Kiss P, Farkas J, Szalontai B, Gabriel R, Hashimoto H, Tamas A (2014) Examination of calcium-binding protein expression in the inner ear of wild-type, heterozygous and homozygous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-knockout mice in kanamycin-induced ototoxicity. *Neurotox Res.* 25:57-67.

Nicot A, Lelievre V, Tam J, Waschek JA, DiCicco-Bloom E (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and sonic hedgehog interact to control cerebellar granule precursor cell proliferation. *J Neurosci.* 22:9244-9254.

Nie X, Luukko K, Kettunen P (2006) BMP signaling in craniofacial development. *Int J Dev Biol.* 50:511-521.

Niewiadomski P, Zhujiang A, Youssef M, Waschek JA (2013) Interaction of PACAP with Sonic hedgehog reveals complex regulation of the hedgehog pathway by PKA. *Cell Signal.* 25:2222-2230.

Nonaka S, Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Takano-Yamamoto T (2013) Expression of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and PAC1 in the periodontal ligament after tooth luxation. *Cell Mol Neurobiol.* 33:885-892.

Nosrat CA, Fried K, Ebendal T, Olson L (1998) NGF, BDNF, NT3, NT4 and GDNF in tooth development. *Eur J Oral Sci.* 106 Suppl 1:94-99.

Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Aizawa Y, Takaki A, Hodoyama K, Yofu S, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kopf M, Iwakura Y, Matsuda K, Arimura A, Shioda S (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *Proc Natl Acad Sci. USA* 103:7488-7493.

Opsahl Vital S, Gaucher C, Bardet C, Rowe PS, George A, Linglart A, Chaussain C (2012) Tooth dentin defects reflect genetic disorders affecting bone mineralization. *Bone* 50:989-997.

Orsini G1, Ruggeri A, Mazzoni A, Nato F, Falconi M, Putignano A, Di Lenarda R, Nanci A, Breschi L (2008) Immunohistochemical localization of dentin matrix protein 1 in human dentin. *Eur J Histochem.* 52:215-220.

Otto C, Schutz G, Niehrs C, Glinka A (2000) Dissecting GHRH- and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-mediated signalling in *Xenopus*. *Mech Dev.* 94:111-116.

Penel G, Leroy G, Rey C, Bres E (1998) MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcif Tissue Int.* 63:475-481.

Penel G, Leroy G, Rey C, Sombret B, Huvenne JP, Bres E (1997) Infrared and Raman microspectrometry study of fluor-fluor-hydroxy and hydroxy-apatite powders. *J Mater Sci Mater Med.* 8:271-276.

Prasad M, Butler WT, Qin C (2010) Dentin sialophosphoprotein (DSPP) in biomineralization. *Connect Tissue Res.* 51:404-417.

Puceat E, Reynard B, Lecuyer C (2004) Can crystallinity be used to determine the degree of chemical alteration of biogenic apatites? *Chem Geol.* 205:83-97.

Qin C, Baba O, Butler WT (2004) Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 15:126-136.

Racz B, Reglodi D, Horvath G, Szigeti A, Balatonyi B, Roth E, Weber G, Alotti N, Toth G, Gasz B. (2010) Protective effect of PACAP against doxorubicin-induced cell death in cardiomyocyte culture. *J Mol Neurosci.* 42:419-427.

Ravni A, Bourgault S, Lebon A, Chan P, Galas L, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez B, Eiden LE, Vaudry D (2006) The neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells: control by multiple transduction pathways. *J Neurochem.* 98:321-329. Review.

Reglodi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gabriel R, Horvath G, Szakaly P, Sandor B, Lubics A, Laszlo E, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, Helyes Z, Welke L, Lakatos A, Tamas A (2012) PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. *J Mol Neurosci.* 48:482-492.

Reglodi D, Renaud J, Tamas A, Tizabi Y, Socías SB, Del-Bel E, Raisman-Vozari R (2015) Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's disease: Role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. *Prog Neurobiol.* S0301-0082(15)00128-8.

Reglodi D, Tamas A (2016) Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide - PACAP. *Current Topics in Neurotoxicity* vol 11, Springer, New York

Rinky A, Ankit A, Manisha TC, Shweta C (2013) Homeobox genes - the mirror of tooth development *Indian J Dent Adv.* 5: 1291-1293.

Rufini A, Barlattani A, Docimo R, Velletri T, Niklison-Chirou MV, Agostini M, Melino G (2011) p63 in tooth development. *Biochem Pharmacol.* 82:1256-1261.

Sakamoto K, Kuno K, Takemoto M, He P, Ishikawa T, Onishi S, Ishibashi R, Okabe E, Shoji M, Hattori A, Yamaga M, Kobayashi K, Kawamura H, Tokuyama H, Maezawa Y, Yokote K (2015) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects glomerular podocytes from inflammatory injuries. *J Diabetes Res.* 2015:727152.

Santos RV, Clayton RN (1995) The carbonate content in high temperature apatite; an analytical method applied to apatite from the Jacupiranga alkaline complex. *Am Min.* 80:336-344.

Scheid RC (2007) Basic terminology for understanding tooth morphology in Woelfel's Dental anatomy: its relevance to dentistry. 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 110-143.

Seow WK (2014) Developmental defects of enamel and dentine: challenges for basic science research and clinical management. *Aust Dent J.* 59 Suppl 1:143-154.

Shioda S, Nakamachi T (2015) PACAP as a neuroprotective factor in ischemic neuronal injuries. *Peptides* 72:202-207. Review.

Shioda S, Takenoya F, Wada N, Hirabayashi T, Seki T, Nakamachi T (2016) Pleiotropic and retinoprotective functions of PACAP. *Anat Sci Int.* 91:313-324. Review.

Simmer JP, Fincham AG (1995) Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 6:84-108.

Smith CE, Nanci A (1989) A method for sampling the stages of amelogenesis on mandibular rat incisors using the molars as a reference for dissection. *Anat Rec.* 225:257-266.

Smith E, Dent G (2005) *Modern Raman spectroscopy- A practical approach.* John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex.

Somogyvary-Vigh A, Reglodi D (2004) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: A potential neuroprotective peptide. *Curr Pharm Des* 10:2861-2889. Review.

Stoffel M, Espinosa R, Trabb JB, Lebeau MM, Bell GI (1994) Human type-I Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide Receptor (ADYAP1R) - Localization to chromosome band 7P14 and integration into the cytogenetic, physical, and genetic-map of chromosome-7. *Genomics* 23:697-699.

Sun JX, Horst OV, Bumgarner R, Lakely B, Somerman MJ, Zhang H (2012) Laser capture microdissection enables cellular and molecular studies of tooth root development. *Int J Oral Sci.* 4:7-13.

Suryadeva S, Khan MB (2015) Role of homeobox genes in tooth morphogenesis: a review. *J Clin Diagn Res.* 9:ZE09-12.

Sydney-Zax M, Mayer I, Deutsch D (1991) Carbonate content in developing human and bovine enamel. *J Dent Res.* 70:913-916.

Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Danyadi B, Tamas A, Helyes Z, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Toth G, Gabriel R, Reglodi D (2012) Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) are more susceptible to retinal ischemic injury in vivo. *Neurotox Res.* 21:41-48.

Tajiri M, Hayata-Takano A, Seiriki K, Ogata K, Hazama K, Shintani N, Baba A, Hashimoto H (2012) Serotonin 5-HT(7) receptor blockade reverses behavioral abnormalities in PACAP-deficient mice and receptor activation promotes neurite extension in primary embryonic hippocampal neurons: therapeutic implications for psychiatric disorders. *J Mol Neurosci.* 48:473-481.

Tamas A, Reglodi D, Farkas O, Kovesdi E, Pal J, Povlishock JT, Schwarcz A, Czeiter E, Szanto Z, Doczi T, Buki A, Bukovics P (2012a) Effect of PACAP in central and peripheral nerve injuries. *Int J Mol Sci.* 13:8430-8448.

Tamas A, Szabadfi K, Nemeth A, Fulop B, Kiss P, Atlasz T, Gabriel R, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Helyes Z, Reglodi D (2012b) Comparative examination of inner ear in wild type and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. *Neurotox Res.* 21:435-444.

Tamura M, Nemoto E (2016) Role of the WNT signaling molecules in the tooth. *Japanese Dental Science* 52:75-83. Review.

Thesleff I (2006) The genetic basis of tooth development and dental defects. *Am J Med Genet A.* 140:2530-2535.

Thesleff I (2014) Current understanding of the process of tooth formation: transfer from the laboratory to the clinic. *Aust Dent J.* 59 Suppl 1:48-54.

Thesleff I, Tummers M (2008) Tooth organogenesis and regeneration. StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; (<http://www.stembook.org/node/551.html>).

Thomas DB, Fordyce RE, Frew RD, Gordon KC (2007) A rapid, nondestructive method of detecting diagenetic alteration in fossil bone using Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc.* 38:1533-1537.

Thomas DB, McGoverin CM, Fordyce RE, Frew RD, Gordon KC (2011) Raman spectroscopy of fossil bioapatite - a proxy for diagenetic alteration of the oxygen isotope composition. *Palaeogeogr Palaeoclimatol.* 310:62-70.

Tucker AS, Headon DJ, Courtney JM, Overbeek P, Sharpe PT (2004) The activation level of the TNF family receptor, Edar, determines cusp number and tooth number during tooth development. *Dev Biol.* 268:185-194.

Tucker A, Sharpe P (2004) The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet.* 5:499-508.

Tummers M, Thesleff I (2009) The importance of signal pathway modulation in all aspects of tooth development. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 312B:309-319.

van Genderen C, Okamura RM, Fariñas I, Quo RG, Parslow TG, Bruhn L, Grosschedl R (1994) Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev.* 8:2691-2703.

Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev.* 52:269-324.

Vaudry D, Hamelink C, Damadzic R, Eskay RL, Gonzalez B, Eiden LE (2005) Endogenous PACAP acts as a stress response peptide to protect cerebellar neurons from ethanol or oxidative insult. *Peptides* 26:2518-2524.

Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev.* 61:283-357.

Veeman MT1, Axelrod JD, Moon RT (2003) A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent WNT signaling. *Dev Cell.* 5:367-377.

Weis A (2003) Amelogenin gene splice products: potential signaling molecules. *Cell Mol Life Sci.* 60:38-55.

Vincze A, Reglodi D, Helyes Z, Hashimoto H, Shintani N, Abraham H (2011) Role of endogenous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in myelination of the rodent brain: lessons from PACAP-deficient mice. *Int J Dev Neurosci.* 29:923-935.

Walker MP, Fricke BA (2006) Dentin-enamel junction of human teeth. In: Akay M (ed) *Wiley encyclopedia of biomedical engineering.* Wiley, Hoboken, pp. 1061-1064.

Wang C, Ren L, Peng L, Xu P, Dong G, Ye Ling (2010) Effect of WNT6 on human dental papilla cells in vitro. *J Endod.* 36:238-243.

Wang XP, Aberg T, James MJ, Levanon D, Groner Y, Thesleff I (2005) Runx2 (Cbfa1) inhibits SHH signaling in the lower but not upper molars of mouse embryos and prevents the budding of putative successional teeth. *J Dent Res.* 84:138-143.

Wang XP, Suomalainen M, Felszeghy S, Zelarayan LC, Alonso MT, Plikus MV, Maas RL, Chuong CM, Schimmang T, Thesleff I (2007a) An integrated gene regulatory network controls stem cell proliferation in teeth. *PLoS Biol.* 5:e159

Wang Y, Li L, Zheng Y, Yuan G, Yang G, He F, Chen Y (2012) BMP activity is required for tooth development from the lamina to bud stage. *J Dent Res.* 91:690-695.

Wang Y, Spencer P, Walker MP (2007b) Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res A.* 81:279-286.

Waschek JA (2002) Multiple actions of pituitary adenylyl cyclase activating peptide in nervous system development and regeneration. *Dev Neurosci.* 24:14-23.

Werling D, Reglodi D, Banks WA, Salameh TS, Kovacs K, Kvarik T, Vaczy A, Kovacs L, Mayer F, Danyadi B, Lokos E, Tamas A, Toth G, Biro Z, Atlasz T (2016) Ocular delivery of PACAP1-27 protects the retina from ischemic damage in rodents. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 57:6683-6691.

Wopenka B, Pasteris JD (2005) A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Mater Sci Eng.* 25:131-143.

Xu C, Wang Y (2012) Chemical composition and structure of peritubular and intertubular human dentine revisited. *Arch Oral Biol.* 57:383-391.

Xu C, Yao X, Walker MP, Wang Y (2009) Chemical/molecular structure of the dentin-enamel junction is dependent on the intratooth location. *Calcif Tissue Int.* 84:221-228.

Yamakoshi Y (2009) Dentinogenesis and dentin sialophosphoprotein (DSPP). *J Oral Biosci.* 51:134.

Yang Z, Balic A, Michon F, Juuri E, Thesleff I (2015) Mesenchymal WNT/ β -catenin signaling controls epithelial stem cell homeostasis in teeth by inhibiting the antiapoptotic effect of FGF10. *Stem Cells.* 33:1670-1681.

Ye L, MacDougall M, Zhang S, Xie Y, Zhang J, Li Z, Lu Y, Mishina Y, Feng JQ (2004) Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development. *J Biol Chem.* 279:19141-19148.

Yokohama-Tamaki T, Ohshima H, Fujiwara N, Takada Y, Ichimori Y, Wakisaka S, Ohuchi H, Harada H (2006) Cessation of FGF10 signaling, resulting in a defective dental epithelial stem cell compartment, leads to the transition from crown to root formation. *Development* 133:1359-1366.

Yu R, Cui Z, Li M, Yang Y, Zhong J (2014) Dimer-dependent intrinsic/basal activity of the class B G protein-coupled receptor PAC1 promotes cellular anti-apoptotic activity through WNT/ β -catenin pathways that are associated with dimer endocytosis. *PLoS One* 9:e113913.

Zhang L, Hua F, Yuan GH, Zhang YD, Chen Z (2008) Sonic hedgehog signaling is critical for cytodifferentiation and cusp formation in developing mouse molars. *J Mol Histol.* 39:87-94.

Zhang F, Song J, Zhang H, Huanga E, Song D, Tollemar V, Wang J, Wang J, Mohammed M, Wei Q, Fan J, Liao J, Zou Y, Liu F, Hu X, Qu X, Chen L, Yu X, Luu HH, Lee MJ, HeT, Ji P (2016) WNT and BMP signaling crosstalk in regulating dental stem cells: Implications in dental tissue engineering. *Genes & Diseases* 3:263-276.

Zhang Y, Zhang Z, Zhao X, Yu X, Hu Y, Geronimo B, Fromm SH, Chen YP (2000) A new function of BMP4: dual role for BMP4 in regulation of Sonic hedgehog expression in the mouse tooth germ. *Development.* 127:1431-1443.

8. Ph.D. értekezés alapjául szolgáló saját és egyéb közlemények

8.1. Ph.D. értekezés alapjául szolgáló saját közlemények PhD értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

Sandor B, Fintor K, Felszeghy S, Juhasz T, Reglodi D, Mark L, Kiss P, Jungling A, Fulop BD, Nagy AD, Hashimoto H, Zakany R, Nagy A, Tamas A (2014) Structural and morphometric comparison of the molar teeth in pre-eruptive developmental stage of PACAP-deficient and wild-type mice. J Mol Neurosci. 54:331-341. (IF: 2.343)

Sandor B, Fintor K, Reglodi D, Fulop DB, Helyes Z, Szanto I, Nagy P, Hashimoto H, Tamas A (2016) Structural and morphometric comparison of lower incisors in PACAP-deficient and wild-type mice. J Mol Neurosci. 59:300-308. (IF: 2.229)

Reglodi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gabriel R, Horvath G, Szakaly P, Sandor B, Lubics A, Laszlo E, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, Helyes Z, Welke L, Lakatos A, Tamas A. (2012) PACAP is an endogenous protective factor- insights from PACAP-deficient mice. J Mol Neurosci. 48:482-492. (IF: 2.293)

8.2. Egyéb közlemények

Farkas J, Sandor B, Tamas A, Kiss P, Hashimoto H, Nagy AD, Fulop BD, Juhasz T, Manavalan S, Reglodi D (2017) Early Neurobehavioral Development of Mice Lacking Endogenous PACAP. J Mol Neurosci. 61:468-478. (IF:2.229²⁰¹⁶)

Szanto I, Mark L, Bona A, Maasz G, Sandor B, Gelencser G, Turi Z, Gallyas F Jr (2012) High-throughput screening of saliva for early detection of oral cancer: a pilot study. Technol Cancer Res Treat. 11:181-188. (IF: 1.962)

9. Köszönetnyilvánítás

Hálámat és köszönetemet szeretném kifejezni témaveztőimnek, **Dr. Tamás Andrea** egyetemi docensnek és **Dr. Nagy Ákos**, egyetemi docensnek, továbbá a MTA PACAP Kutatócsoport vezetőjének és a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar Anatómiai Intézet vezetőjének, **Prof. Dr. Reglódi Dórának** támogatásukért és kutatásaim során, valamint dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom **Dr. Fintor Krisztiánnak**, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar, Ásványtani, Geokémiai és Kőzettani Tanszék tudományos munkatársának; **Dr. Juhász Tamás** egyetemi adjunktusnak, **Dr. Felszeghy Szabolcs** egyetemi docensnek és **Dr. Papp Tamásnak** a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetéből; **Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna** egyetemi tanárnak, **Dr. Nagy Péternek** és **Kiss Tamásnak** a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet és Szentágotthai János Kutatóközpont munkatársainak; **Dr. Márk László** egyetemi docensnek a PTE Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet munkatársának, **Dr. Markovics Dórának** a PTE ÁOK Fogászati és Szájsebészeti Klinika egyetemi tanársegédének, **Dr. Hani Eszter** fogorvosnak, szerzőtársaimnak, és a PTE ÁOK Anatómiai Intézet dolgozóinak.

Szeretném, megköszöni a Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Fogászati és Szájsebészeti Klinika Gyermekfogászati Osztálya dolgozóinak támogatásukat és megértésüket. Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni feleségemnek és gyermekeimnek, Gergőnek és Pannának szeretetüket, támogatásukat és türelmüket.

Támogatások:

OTKA K104984, PD109644, NKFI K119759 TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 „Nemzeti Kiválóság Program” TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0024; Arimura Alapítvány; Bolyai Ösztöndíj; MTA-PTE „Lendület Program”; Debreceni Egyetem belső kutatási pályázata (RH/885/2013); GINOP-2.3.2-15-2016-00050 “PEPSYS”; UNKP-16-4-IV Új Nemzeti Kiválóság Program a Nemzeti Erőforrás Minisztérium Támogatásával; MTA TKI 14016 Program.