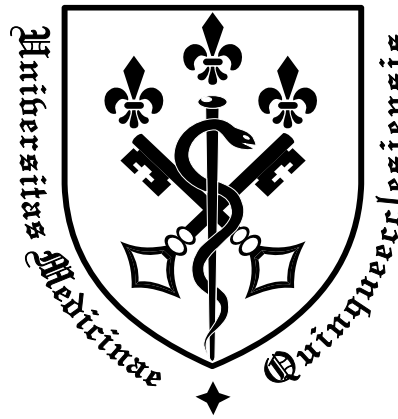


EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

**Az endogén hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)
hiányának vizsgálata génkiütött egerek
hallórendszerében, érrendszerében és fogfejlődése során**

Dr. Fülöp Balázs Dániel



Témavezető: Dr. Tamás Andrea, egyetemi docens

Programvezető: Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár

Doktori iskola vezetője: Dr. Szekeres Júlia, egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Anatómiai Intézet

2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
I. Bevezetés	5
1.1. A PACAP előfordulása és hatásai	5
1.1.1. Neuroprotektív, neurotrofikus, citoprotektív hatások	5
1.1.2. A PACAP érzékszervekben betöltött szerepe	6
1.1.3. A PACAP regulációs funkciói	6
1.2. A PACAP izoformái és receptorai	7
1.3. A PACAP hatását közvetítő intracelluláris jelátviteli utak	8
1.4. A PACAP előfordulása és hatásai a hallórendszerben	10
1.4.1. A PACAP és PAC1 receptor előfordulása a belső fülben	10
1.4.2. A PACAP és PAC1 receptor előfordulása a hallópálya magjaiban	13
1.4.3. A PACAP hatása a belső fül fehérjeprofiljára	15
1.4.4. A PACAP hatása belső fülből készült sejtenyészeten	16
1.5. A PACAP szerepe a fogfejlődésben	17
1.5.1. A fogfejlődés	17
1.5.2. A PACAP előfordulása fog és parodontalis mintákon	18
1.5.3. A PACAP és a fogfejlődésben résztvevő jelátviteli útvonalak	18
1.6. A PACAP szerepe a cardiovascularis rendszerben	21
1.7. A PACAP-génkiütött (KO) egerek vizsgálata	22
1.7.1. A hallórendszer vizsgálata PACAP KO egerekben	23
1.7.2. A PACAP-génkiütött egerek fogfejlődése	23
1.7.3. A PACAP-génkiütött egerek cardiovascularis rendszere	25
1.8. A PACAP és az öregedés	25
II. Célkitűzés	26
III. Anyagok és módszerek	27

3.1. A hallórendszer funkcionális vizsgálata ABR módszerrel	27
3.2. Idegsejtaktiváció mérése a hallópálya magjaiban – c-Fos immunfestés.....	27
3.3. Idegsejt számolás a cochlearis magok területén – Nissl-festés.....	30
3.4. PAC1 receptor immunfestés a hallópálya magjaiban	30
3.5. Fehérjeprofil analízis ductus cochlearisból.....	31
3.6. A Notch jelátviteli út elemeinek vizsgálata molaris fogakon	33
3.7. A PACAP1-38, PACAP1-27, VIP vazorelaxációs hatásának vizsgálata	34
3.8. A PAC1, VPAC1, VPAC2 receptorok mRNS-ének kimutatása	36
3.9. A PAC1, VPAC1, VPAC2 receptorfehérjék Western-blot analízise.....	37
3.10. Statisztika	38
IV. Eredmények	39
4.1. A hallórendszer funkcionális vizsgálata ABR módszerrel	39
4.2. Idegsejtaktiváció mérése a hallópálya magjaiban – c-Fos immunfestés.....	39
4.2.1. Cochlearis magok	39
4.2.2. A hallópálya centrális átkapcsoló állomásai.....	41
4.3. Idegsejt számolás a cochlearis magok területén – Nissl-festés.....	46
4.4. PAC1 receptor immunfestés a hallópálya magjaiban	47
4.5. Fehérjeprofil analízis belső fül ductus cochlearisából	48
4.6. A Notch jelátviteli útvonal változásai PACAP KO egerek fogaiban.....	51
4.6.1. A Notch receptorok vad, HZ és KO egerek őrlőfogában	51
4.6.2. A Notch ligandok vad, HZ és KO egerek őrlőfogában	51
4.6.3. A Notch intracelluláris elemei vad, HZ és KO egerek őrlőfogában.....	51
4.7. A PACAP1-38, PACAP1-27, VIP vazorelaxációs hatása vad és KO egerekben.....	56
4.8. PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor mRNS és fehérje az érrendszerben.....	57
V. Megbeszélés.....	59
5.1. A PACAP KO egerek hallásvizsgálata	59
5.2. A PACAP KO egerek fogfejlődése.....	66

5.3. A PACAP KO egerek érrendszere	73
5.4. Konklúzió.....	75
VI. Új eredmények összefoglalása.....	76
VII. Köszönetnyilvánítás	77
VIII. Irodalomjegyzék	78
IX. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények és a szerző további publikációi	89
9.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	89
9.2. A szerző további társszerzős közleményei.....	89
9.3. A szerző társszerzős könyvfejezete.....	91

Rövidítések jegyzéke

AC: adenilát-cikláz	LSO: oliva superior, nucleus lateralis
ABR/BERA: agytörzsi kiváltott válasz vizsgálat	Mam: mastermind
Akt (PKB): protein-kináz B	MNTB: corpus trapezoideum, nucleus medialis
ANOVA: analysis of variance - variancia analízis	MSO: oliva superior, nucleus medialis
ATF2: aktiváló transzkripció faktor 2	MTT: dimetiltiazol-difeniltetrazolium-bromid
AU1: primér hallókéreg	NDS: normál számárszérum
Bad: Bcl-2 asszociált halál promóter	NFκB: nukleáris faktor-kappa B
Bcl-2: B-sejtes lymphoma protein 2	NGS: normál kecskeszérum
Bcl-xL: B-sejtes lymphoma protein – extra large	NICD: Notch intracelluláris domén
BLC: B-lymphocyta kemoattraktáns	NLL: nuclei lemnisci lateralis
BMP: csont morfogénikus protein	Numb: Numb fehérje
CA: arteria carotis communis	p38MAPK: p38 mitogén-aktivált protein-kináz
cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát	PAC1: a PACAP 1-es típusú receptora
CGM: corpus geniculatum mediale	PACAP: hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid
ChAT: kolin-acetiltranszferáz	PACAP1-27: a PACAP 27 aminosavból álló formája
CI: colliculus inferior	PACAP1-38: a PACAP 38 aminosavból álló formája
CREB: cAMP rezponzív elem kötő protein	PBS: foszfátpufferes sóoldat
CSL: CSL transzkripció faktor	PBST: foszfátpufferes sóoldat 0,1% Tween 20-szal
CXCL12: C-X-C motif chemokine 12	PF4: trombocyta faktor 4
DAB: 3,3'-diaminobenzidin	PIP₂: foszfatidil-inozitol 4-5-biszfoszfát
DAG: diacilglicerol	PI3K: foszfatidil-inozitol 3-kináz
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol	PKA: protein-kináz A
DBH: dopamine β-hidroxiláz	PLC: foszfolipáz C
DCN: nucleus cochlearis dorsalis	PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid
DLL1, 3, 4: Notch ligandok (Delta-like ligand 1, 3, 4)	PTCH1: Protein patched homológ 1 fehérje
DPPIV: dipeptidyl-peptidáz-4	RT-PCR: reverz transzkripció polimeráz láncreakció
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav	RUNX2: Runt-kapcsolt transzkripció faktor 2
EGTA: tritilén-glikol-diamin-tetraecetsav	SDS-PAGE: SDS poliakrilamid gélelektroforézis
ERK: extracelluláris szignál regulált kináz	SEM: standard error of mean; standard hiba
FA: arteria femoralis	Shh: Sonic Hedgehog gén
FGF: fibroblaszt növekedési faktor	SOC: oliva superior complex
Gli1: glioma-asszociált onkogén 1	TACE: TNF-α konvertáló enzim
GluR2/3: glutamát receptor 2/3	TF: szöveti faktor
HE: hematoxylin-eosin	TNF-α: tumor nekrozis faktor α
HZ: heterozigóta PACAP-génkiütött	VCN: nucleus cochlearis ventralis
IGFBP: inzulin-szerű növekedési faktor kötő fehérje	VIP: vazoaktív intestinalis polipeptid
i.p.: intraperitonealis	VLPN, VMPN: nucleus periolivaris ventrolateralis/medialis
IP₃: inozitol-1,4,5-triszfoszfát	VNTB: corpus trapezoideum, nucleus ventralis
JC-1: mitochondriális membrán-potenciál assay kit	VPAC1, VPAC2: vazoaktív intestinalis peptid receptorok
JNK: c-Jun N-terminális kináz	VT: vad típus
KO: homozigóta PACAP génkiütött (knock-out)	WNT: wingless-related integration site
LF: lunatic fringe	

I. Bevezetés

A Ph.D. értekezésem alapjául szolgáló kutatások során hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)-génkiütött egerekben vizsgáltuk, hogy az endogén PACAP hiánya milyen módon befolyásolja különböző szervrendszerek működését. A kutatócsoport munkája folyamán szinte minden szervrendszert alapos vizsgálatnak vetettünk alá fiziológias körülmények között, öregedéssel modellben és sok esetben károsító hatásokat követően. Ph.D. hallgatóként a legtöbb PACAP-génkiütött egeret érintő kutatásban részt vettem az elmúlt 7 évben, többek között az egerternyészet fenntartása is az én feladatom. Értekezésemben ezen vizsgálatok közül a hallórendszerrel, az érrendszerrel és a fogfejlődéssel kapcsolatos legújabb eredmények kerülnek leírásra.

1.1. A PACAP előfordulása és hatásai

A PACAP-ot 1989-ben izolálták Arimura és munkatársai (Miyata et al., 1989) birka hypothalamusból. Tagja a vazóaktív intestinalis polipeptid (VIP)/glükagon/szekretin peptidcsaládnak, szerkezete a VIP-vel 68%-os homológiát mutat. Nevét a hypophysisben kifejtett hatásáról kapta, miszerint az adenilát-cikláz (AC) stimulálásával emeli a hypophysis sejtjeiben a cAMP szintjét. Az elmúlt évek kutatásai azonban bebizonyították, hogy mind előfordulásában, mind funkcióiban túlmutat ezen hatásokon (Reglődi és Tamás, 2016).

1.1.1. *Neuroprotektív, neurotrofikus, citoprotektív hatások*

A PACAP legnagyobb mennyiségben az idegrendszerben és az endokrin szervekben fordul elő. Nagy mennyiségben megtalálható mind a központi, mind pedig a perifériás idegrendszerben, ahol legelőször neurotrof és neuroprotektív hatásait írták le (Botia et al., 2007; Reglődi és Tamás, 2016). A PACAP mind a gerinctelenek, mind a gerincesek szervezetében jelen van, és védő funkciókat lát el különböző sejt- vagy szövetkárosító hatásokkal szemben. Protektív funkcióit antiapoptotikus, antiinflammatorikus és antioxidáns hatásainak köszönheti. Számos degeneratív idegrendszeri betegségben, valamint cerebrális iszkémia modellben is kimutatták védő szerepét (Ohtaki et al., 2008; Reglődi et al., 2011, 2018d). Citoprotektív funkciói más szervrendszerekben is ismertek, például a bélrendszerben, a vesében és a cardiovascularis rendszerben is (Szakály et al., 2011; Horváth et al., 2016).

1.1.2. A PACAP érzékszervekben betöltött szerepe

A PACAP az idegrendszerhez mind funkcionalitásában, mind fejlődésében szorosan kapcsolódó érzékszervekben is protektív hatásokkal rendelkezik. Ismert, hogy a PACAP az érzékszervek sejtjeinek a szaporodását is befolyásolja (például a szaglórészletben vagy retinoblastómában) (Hansel et al., 2001; Wojcieszak és Zawilska, 2014). A kifejlett szaglórészletben a PACAP előfordulását számos ponton kimutatták: növeli az intracelluláris Ca^{2+} -szintet és károsító hatások esetén védi a szaglópálya sejtjeit (Lucero, 2016). A peptid retinoprotektív hatásai jól ismertek, a retina különböző károsodása esetén a PACAP védő hatása mind morfológiai, mind funkcionális, mind pedig molekuláris szinten kimutatható. *In vivo* intravitreális PACAP adása csökkenti a károsodás mértékét számos modellben – többek között glutamát/N-metil-D-aszpartát indukálta excitotoxicitás és arteria carotis communis leköltése okozta iszkémia esetén is. A molekuláris biológiai vizsgálatok kimutatták, hogy az *in vivo* detektált védőhatás hátterében az antiapoptotikus jelátviteli utak aktiválása, az apoptotikus utak gátlása és antiinflammatorikus hatások állnak (Atlasz et al., 2016; Shioda et al., 2016; Váczy et al., 2018). A neuropeptidnek a hallórészletben is fontos szerepe van, melyet külön fejezetben részletezek.

1.1.3. A PACAP regulációs funkciói

A PACAP, mint számos más neuropeptid, nemcsak a központi idegrendszerben, hanem a periférián is jelen van, és citoprotektív hatásain túl neurotranszmitterként, neuromodulátorként több alapvető fiziológiai folyamat szabályozásában vesz részt (Vaudry et al., 2009). Fontos regulációs szerepét az is bizonyítja, hogy különböző fajokban a PACAP szekvenciája evolúciósan nagy mértékben konzervált (White et al., 2000; Vaudry et al., 2009). Az egyedfejlődés során a neuroepithelialis sejtek már egészen korai szakaszban kifejezik a PACAP-ot és receptorait (Waschek, 2002), és a PACAP már ekkor számos fejlődési folyamat szabályozásában vesz részt (Vaudry et al., 2009; Reglödi és Tamás, 2016; Watanabe et al., 2016; Farkas et al., 2017).

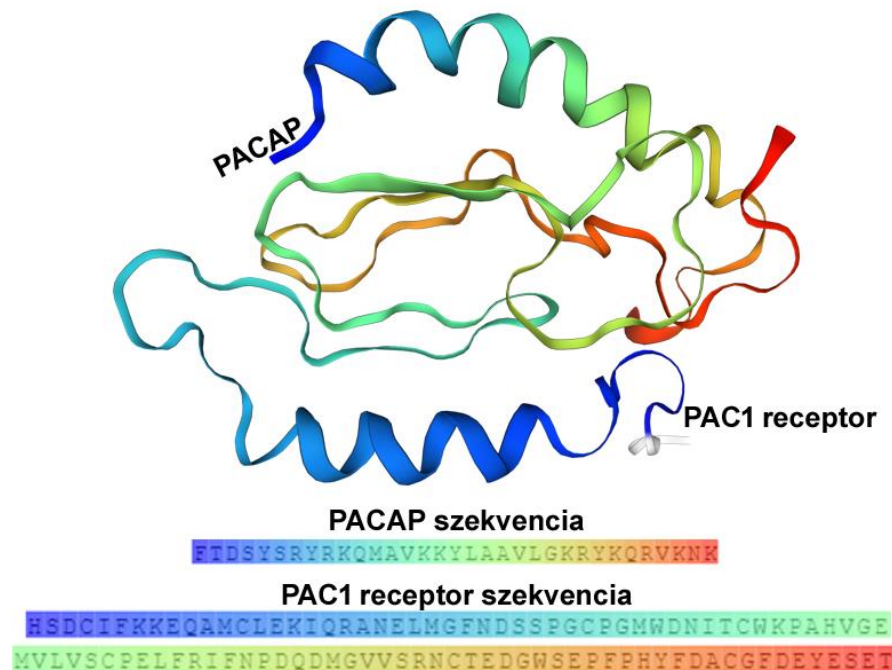
A peptid befolyásolja különböző neurotranszmitterek és hormonok termelését, a bélrendszer motilitását, az immunrendszert, a cirkadián ritmust, a test hőszabályozását, az ivarszervek és a placenta működését, a migrén és számos pszichiátriai kórkép kialakulását valamint a cardiovascularis rendszer működését, amit külön fejezetben tárgyalok (Reglödi és Tamás, 2016; Meggyes et al., 2019).

A PACAP részt vesz a szervezet kötő- és támasztószöveteinek fejlődésében és működésének szabályozásában is, beleértve a csontokat, porcokat és fogakat is. Csontban először Strange-Vognsen és munkatársai mutatták ki a PACAP-ot sertés epifízis porckorongból (Strange-Vognsen et al., 1997). *In vitro* kísérletek kimutatták, hogy egér calvariából készült osteoblast sejtvonalon a cAMP szintet emeli, valamint patkány osteosarcoma sejtvonalon az I-es típusú kollagén mennyiségét szintén emeli, és a csont mineralizációját is növeli (Nagata et al., 2009; Juhász et al., 2014b). Patkányban a PACAP-ot hyalinporcból is kimutatták, csirkéből készült porcsejttenyészetben pedig elősegítette a sejtproliferációt és ezen keresztül a porc képződését is (Juhász et al., 2014a, 2015; Giunta et al., 2015). A PACAP fogfejlődésben betöltött szerepét külön fejezetben foglalom össze.

1.2. A PACAP izoformái és receptorai

Az elsőként izolált 38 aminosavas izoformán (PACAP1-38) túl a PACAP N-terminális felőli 27 aminosavas fragmense szintén a természetben előforduló, biológiailag aktív forma (PACAP1-27) (Miyata et al., 1990), míg további, a PACAP-pal agonista vagy antagonistá hatású fragmensek csak mesterségesen állíthatóak elő. Receptorai G-protein kapcsolt receptorok, melyek közül a VPAC1 és VPAC2 (vazoaktív intestinalis peptid receptor 1 és 2) receptorok a PACAP-ot és a VIP-t egyforma affinitással kötik, míg a PAC1 receptor (PACAP receptor 1-es típus) egy PACAP-ra specifikus transzmembrán G-protein receptor (1.2. ábra) (Hirabayashi et al., 2018). A PAC1 receptor specificitását jól mutatja a disszociációs konstans értéke (az a ligand koncentráció, amelynél a ligand a receptor kötőhelyeinek 50%-át foglalja el), mely PACAP-ra $K_d \approx 0,5$ nM, míg VIP-re nézve $K_d > 500$ nM; ezzel szemben a VPAC1 és 2 receptor esetében mindkét ligandra nézve $K_d \approx 1$ nM (Vaudry et al., 2009). A PACAP pleiotrop hatása részben annak köszönhető, hogy a receptorok nem szövetspecifikusak, tehát a receptortípusok eloszlása egy adott szöveten belül is nagymértékű variabilitást mutat, részben pedig annak, hogy alternatív splicing során a PAC1 receptornak is számos variánsa kialakulhat. A receptor 7 transzmembrán doménje három extracelluláris és három intracelluláris hurkot hidal át. A harmadik intracelluláris hurokba beépülő génkzetták alapján elkülönítünk rövid, hip, hop1, hop2, hip-hop1 és hip-hop2 variánsokat, mely génkzetták jelenléte nagyban befolyásolja az intracelluláris jelátviteli utakat – például a hip génkzetta jelenléte mind a két fő útvonalat, az adenilát-cikláz (AC) és a foszfolipáz C (PLC) által közvetített hatásokat is gátolja

(Journot et al., 1994). Az N-terminális felőli extracelluláris domén splice variánsa a receptor affinitását változtatja meg a PACAP különböző izoformái iránt, a 4-es transzmembrán domén variánsa pedig a fent említett jelátviteli útvonalakat nem befolyásolja, azonban az L típusú feszültség-függő kalcium-csatornák megnyitásával a sejtekbe Ca^{2+} beáramlást idéz elő (Chatterjee et al., 1996).



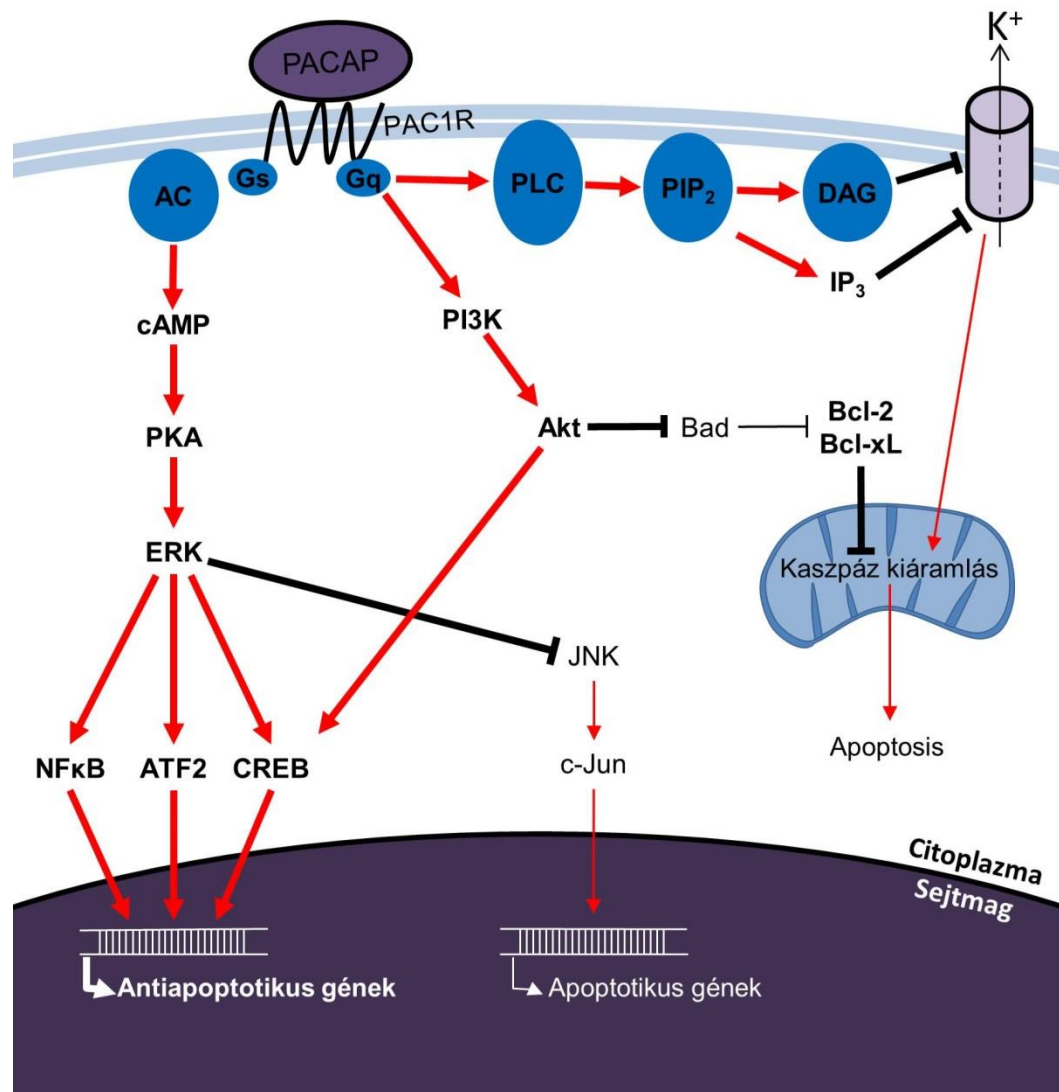
1.2. ábra: A PACAP kötődése a PAC1 receptor short splice variánsának extracelluláris doménjéhez.

(Forrás: A Swiss-Model program segítségével generált ábra. Biozentrum, University of Basel, Svájc. <https://swissmodel.expasy.org/>)

1.3. A PACAP hatását közvetítő intracelluláris jelátviteli utak

A PACAP hatásait közvetítő legfontosabb jelátviteli utakat az 1.3. ábra mutatja (Manecka et al., 2016). A PACAP kanonikus útvonala a PAC1 receptoron keresztül a ciklikus adenzin-monofoszfát – protein-kináz A (cAMP-PKA) útvonal aktiválása (Kienlen Campard et al., 1997). Ez az extracelluláris szignál regulált kináz (ERK) foszforilációjához vezet, amely számos molekulán keresztül a sejtek túlélését elősegítő génexpressziós változásokat idéz elő a sejtmagban (Villalba et al., 1997). A PKA-ERK aktivációja gátolja a c-Jun N-terminális kinázt (JNK), ezen keresztül a c-Jun foszforilációját, és az apoptotikus útvonalakat (Dohi et al., 2002). A PACAP cAMP-től függetlenül az Akt-on keresztül gátolja a proapoptotikus Bad és Bax molekulákat, így aktiválja az antiapoptotikus B-sejtes lymphoma protein 2 (Bcl-2) és a B-sejtes

lymphoma protein - extra large (Bcl-xL) fehérjét (Aubert et al., 2008), ezzel megakadályozva a kaspáz kiáramlást és a mitokondriális apoptózist. A PACAP szintén a cAMP-től függetlenül aktiválja a foszfolipáz C-t (PLC), ami ugyancsak csökkent kaspáz-aktivációt okoz (Lakk et al., 2015).



1.3. ábra: A PACAP hatását közvetítő főbb intracelluláris jelátviteli utak. Piros nyíl: aktiváció. Fekete tompa nyíl: gátlás. Vastag nyíl és félkövér betű: PACAP hatására fokozott aktivitás. Vékony nyíl és normál betű: PACAP hatására csökkent aktivitás. **AC**: adenilát-cikláz; **ATF2**: aktiváló transzkripciós faktor 2; **Akt**, **PKB**: protein-kináz B; **Bcl-2**: B-sejtes lymphoma protein 2; **Bcl-xL**: B-sejtes lymphoma protein – extra large; **cAMP**: ciklikus adenozin-monofoszfát; **CREB**: cAMP rezponzív elem kötő fehérje; **DAG**: diacilglicerol; **ERK**: extracelluláris szignál regulált kináz; **G_s** és **G_q**: G_s és G_q protein; **IP₃**: inozitol-1,4,5-triszfoszfát; **JNK**: c-Jun N-terminális kináz; **NFκB**: nukleáris faktor-kappa B; **PACAP**: hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid; **PAC1R**: PACAP receptor 1-es típus; **PIP₂**: foszfatidil-inozitol 4-5-biszfoszfát; **PI3K**: foszfatidil-inozitol 3-kináz; **PLC**: foszfolipáz C; **PKA**: protein-kináz A.

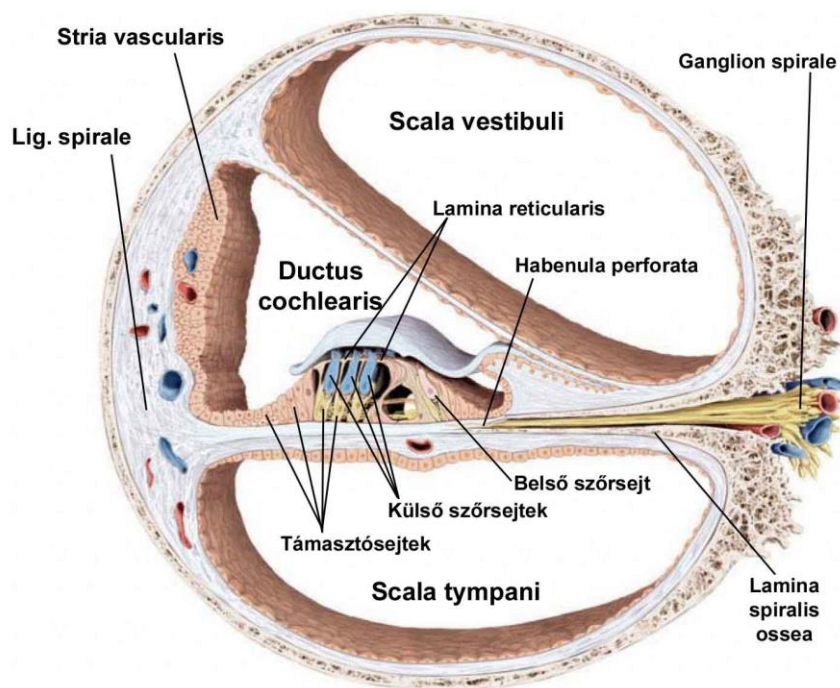
1.4. A PACAP előfordulása és hatásai a hallórendszerben

Mind a PACAP-ot, mind a PAC1 receptort a belső fül és a hallópálya számos területén kimutatták.

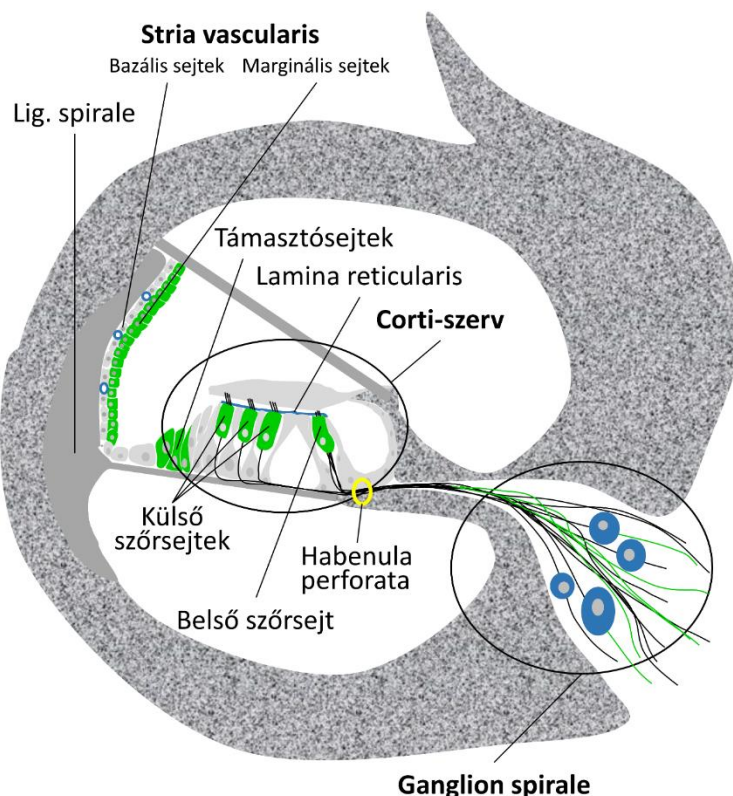
1.4.1. A PACAP és PAC1 receptor előfordulása a belső fülben

Abu-Hamdan és munkatársai PACAP mRNS-t találtak patkányban a Corti-szerv, ganglion spirale és stria vascularis területén (1.4.1.1. és 1.4.1.2 ábra) (Abu-Hamdan et al., 2006). Kawano és munkatársai in situ hibridizáció segítségével a PACAP mRNS-ét lokalizálták a ganglion spirale sejteinek többségében, és a stria vascularis marginalis sejteiben (Kawano et al., 2001). Ezzel egybevágóan Abu-Hamdan és munkatársai ezen területen immunfestéssel a marginalis sejtek bazális-lateralis felszínén találtak PACAP immunpozitivitást. Ezzel szemben sem ezen sejtek apikális felszíne, sem a kötőszöveti eredetű bazális sejtek, erek, lig. spirale fibroblast sejtejei nem mutattak PACAP immunpozitivitást (Abu-Hamdan et al., 2006).

A PAC1 receptornak a különböző területeken különböző splice variánsait mutatták ki (Abu-Hamdan et al., 2006). A stria vascularis területén a PAC1 receptor az erek endothel sejteiben és a marginalis sejtek oldalán, a zonula occludens régiójában jelölődött (1.4.1.1. és 1.4.1.2 ábra). Sem a bazális sejtek, sem a marginalis sejtek apikális felszíne nem jelölődött. A PACAP-nak és receptorának kolokalizációja egyazon sejten annak autocrin/intracrin szabályozására utalhat, amit patkány cortex cerebriából készült sejttenyészetben már kimutattak (Shintani et al., 2005). Feltételezhetően a PACAP a tight junction integritásában és a K⁺-transzportban játszik fontos szerepet (Drescher et al., 2000; Florian et al., 2003; Kitajiri et al., 2004), amivel az endolympmha összetételére és a megfelelő ionkoncentráció fenntartására is hatással lehet (Drescher et al., 2000).



1.4.1.1. ábra: A Corti-szerv keresztmetszeti képe
(Forrás: Scuenke et al. *THIEME Atlas of Anatomy, Head and Neuroanatomy, New York, 2007*)



1.4.1.2. ábra: A PACAP és PAC1 receptor előfordulása a belső fülben. PACAP a habenula perforata területén mutatható ki (sárga szín). PAC1 receptor a stria vascularis területén az erek endothel sejteiben, a lamina reticularisban és a ganglion spirale sejttestjein található (kék szín). PACAP-ot és PAC1 receptort is kimutattak a stria vascularis marginalis sejteiben, a belső és külső szőrsejtek körül, a támasztósejtekben és a ganglion spirale rostjaiban (zöld szín).

Drescher és munkatársai patkányban a PACAP és a PAC1 receptor jelenlétét, valamint a belső fül afferens és efferens neurotranszmittereivel való kolokalizációját vizsgálták immunhisztokémia segítségével (Drescher et al., 2006). PACAP immunpozitivitást találtak a belső szőrsejtek basolateralis felszíne körül, a külső szőrsejtek bázisánál és apikális részénél, a habenula perforata és a támasztósejtek területén. Erős PACAP-jelölődést mutattak ki a ganglion spirale-t elhagyó, és a ganglionsejteken végződő axonok területén. PAC1 receptorra immunpozitivitást találtak a belső szőrsejtek apikális oldalán, a külső szőrsejteken, a lamina reticularis területén és számos támasztósejten. A ganglion spirale területén az I-es típusú ganglion sejtek, és a nervus cochlearis jelölődött pozitívan (1.4.1.1. és 1.4.1.2 ábra).

A kolokalizációs vizsgálatokból kiderült, hogy a PACAP többségében a belső fül efferens beidegzésében vesz részt. Az efferens neurotranszmitterek közül a kolin-acetiltransferáz (ChAT) és a dopamin β -hydroxiláz (DBH) a PACAP-pal kolokalizációban jelent meg a Corti-szervben a külső a belső szőrsejtek bázisánál. A ChAT a ganglion spiraleban végződő kis idegrostokban is a PACAP-pal megegyező területeken expresszáldott. Ezen felül a DBH a PAC1 receptorral is kolokalizációt mutatott a belső szőrsejtek apikális felszínén, a lamina reticularisban, a külső szőrsejtek területén és számos támasztósejten.

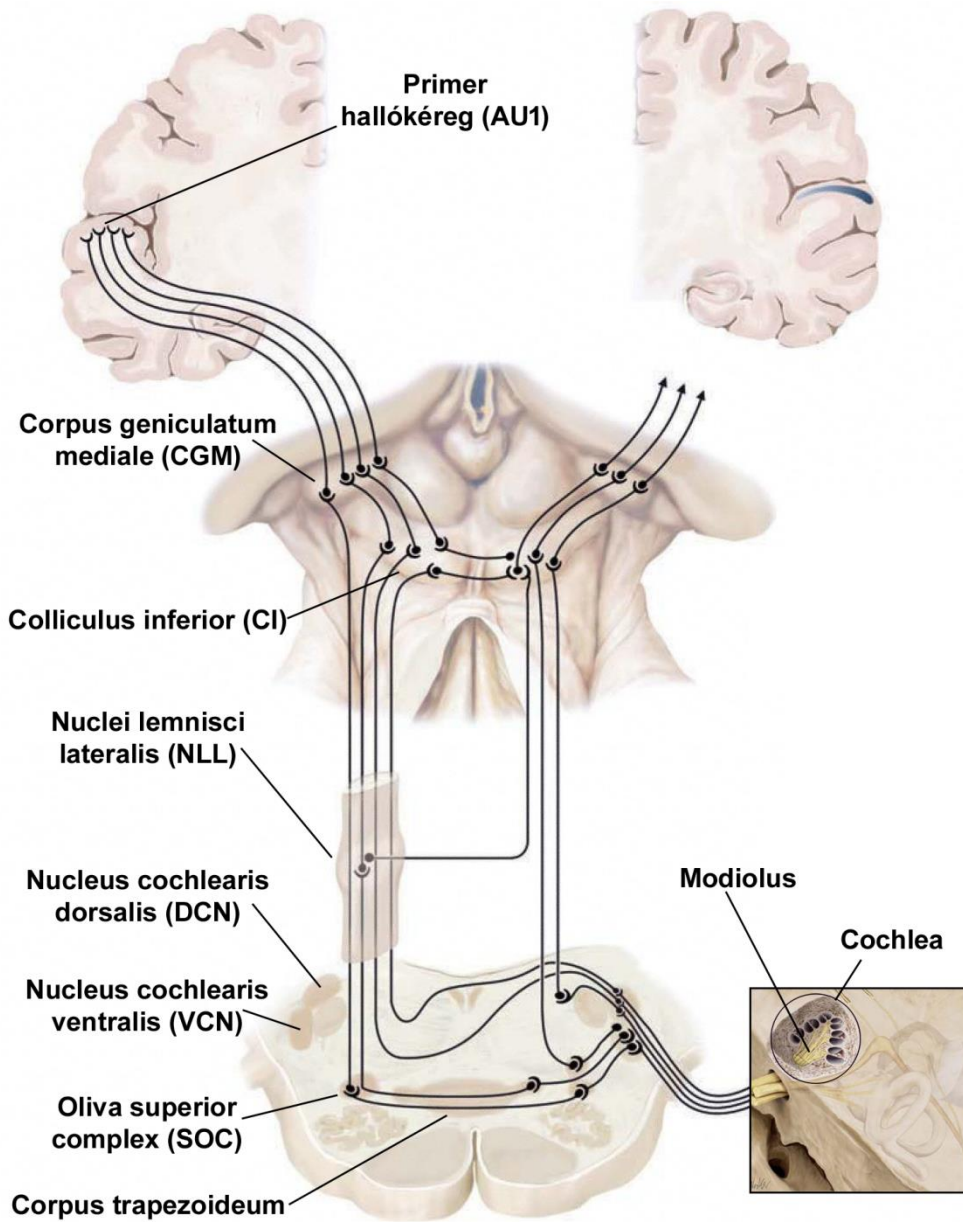
A glutamát a cochlea elsődleges afferens neurotranszmittere (Eybalin, 1993; Matsubara et al., 1996), azonban akusztikus trauma vagy iszkémia esetén a túlzott glutamát kiválasztás sejtkárosító hatású (Pujol et al., 1993; Puel, 1995). A glutamát receptor 2/3 (GluR2/3) a PACAP-pal nem kolokalizál, azonban a PAC1 receptorral együtt jelenik meg az alábbi területeken: a külső és belső szőrsejteken és számos támasztósejten. A PACAP a glutamát okozta sejtkárosodást csökkenteni képes (Morio et al., 1996), ami alapján feltételezhető, hogy a belső fülben a PAC1 receptor és a Glu2/3 receptor kolokalizációja arra utal, hogy a PACAP a glutamát indukálta excitotoxicitás elleni védelemben szerepet játszhat.

1.4.2. A PACAP és PAC1 receptor előfordulása a hallópálya magjaiban

A cochlearis magokban, és a nervus cochlearisban mérsékelt, ezen belül a nucleus cochlearis ventralis (VCN) területén kifejezettebb PACAP jelölődést találtak korábbi vizsgálatok patkányban (1.4.2.1. és 1.4.2.2. ábra) (Kausz et al., 1999; Hannibal, 2002).

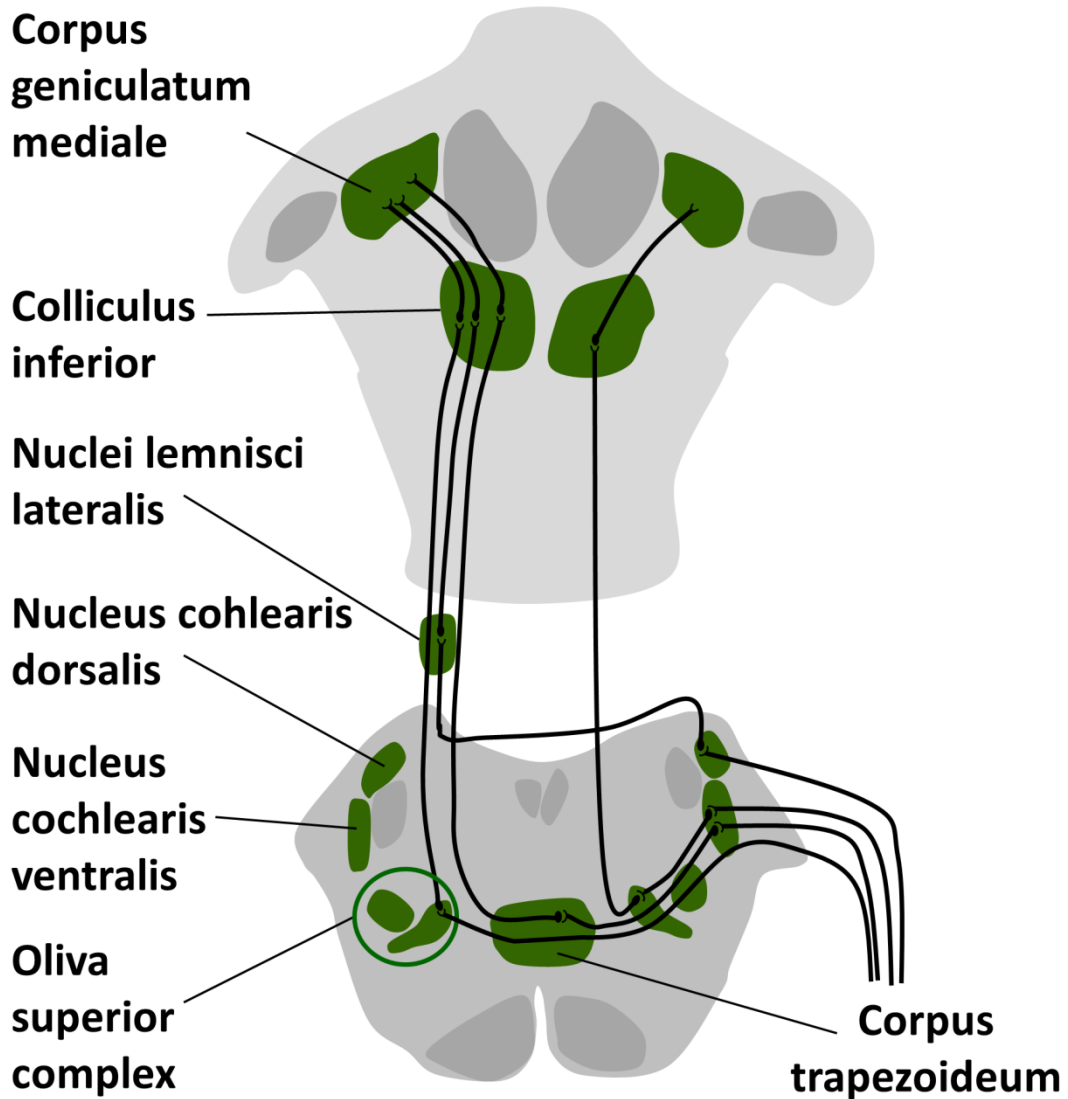
Az oliva superior (SOC) területén Reuss és munkatársai számos peptid, közöttük a PACAP előfordulását vizsgálták dzsungáriai törpehőrcsögben (*Phodopus sungorus*) (1.4.2.1. és 1.4.2.2. ábra) (Reuss et al., 2009). PACAP az idegsejtek mintegy 30%-ában volt jelen, míg VIP nem volt kimutatható ezen a területen. Az oliva superior nucleus medialisának (MSO) és a corpus trapezoideum nucleus medialisának (MNTB) területén a PACAP-ot számos nagy méretű idegsejtben kimutatták, amely sejtek feltételezhetően az colliculus inferior (CI) mellett az oliva superior nucleus lateralisba (LSO) és a periolivaris magokba is továbbítanak információt (Schwartz, 1992). Az LSO és a periolivaris magok területén a neuronoknak körülbelül a negyede tartalmazott PACAP-ot. A corpus trapezoideum területén található cochlea efferens neuronok (a cochleába juttatott fluorochrom retrográd jelölőanyaggal pozitívítást mutattak) mintegy 40%-ban PACAP pozitívak voltak. Feltételezhető, hogy a cochleában Kawano és Drescher munkacsoportok által leírt PACAP-pozitív rostok perikarionjai itt találhatóak. Az olivocochlearis pályákat tekintve a PACAP a külső szőrsejteken végződő tractus olivocochlearis medialisban expresszáldott, míg a belső szőrsejteken végződő tractus olivocochlearis lateralisban nem, ami tovább erősíti Drescher és munkatársainak elméletét, miszerint a PACAP funkcionális regulációs szerepe a hallórendszerben leginkább a külső szőrsejtek efferens beidegzésében van, és ezen keresztül a belső szőrsejtektől érkező afferens beidegzésre csak közvetetten hat (Drescher et al., 2006). Ezen eredmények egybevágóak Kausz és munkatársai korábbi eredményével, akik patkányban PACAP immunreaktivitást mutattak ki az SOC területén, beleértve a corpus trapezoideum magjait (Kausz et al., 1999).

A colliculus inferior területén patkányban gyenge PACAP pozitívítást mutattak ki mind a sejtekben, mind a rostokban (Hannibal, 2002). Emberi agymintákon mind itt, mind pedig a corpus geniculatum mediale területén lehetséges volt a PACAP kimutatása radioimmunoassay segítségével (1.4.2.2. ábra) (Palkovits et al., 1995).



1.4.2.1. ábra: A hallópálya felépítése

(Forrás: Scuenke et al. *THIEME Atlas of Anatomy, Head and Neuroanatomy, New York, 2007*)



1.4.2.2. ábra: A hallópálya magjai. A PACAP-ot a nucleii lemnisci lateralis kivételével mindegyik magban, a PAC1 receptor mRNS-ét mindegyik magban kimutatták (zöld szín).

1.4.3. A PACAP hatása a belső fül fehérjeprofiljára

Az endolympa termelésének fő helye a stria vascularis, összetétele és ionkoncentrációja az intracelluláris folyadéktérrel egyezik meg: alacsony a Na^+ és magas a K^+ tartalma. Elektromos potenciálja $+80\text{mV}$ a perilymphához viszonyítva, mely potenciálkülönbség elengedhetetlen a szőrsejtek megfelelő működéséhez: a hanghullámok által a szőrsejtek apikális oldalán található stereo- és kinocíliumok elmozdítása révén megnyílnak a köztük található tip-linkhez kötött kationcsatornák,

lehetőséget teremtve az endolymphában található kationoknak a szőrsejtbe való beáramlására. Az endolympha megfelelő összetétele így elengedhetetlen a belső fül működéséhez, elváltozásai a belső fül különböző patológiás folyamataihoz köthetőek (Hanner et al., 2004; Fukushima et al., 2005). Feltételezhető, hogy az aminoglikozid antibiotikumok halláskárosító hatásának is egyik útja, hogy ezen antibiotikumok az endolymphán keresztül érik el a szőrsejteket endocitózissal, vagy nem specifikus kation csatornákon keresztül (Li és Steyger, 2009).

Ismert, hogy számos neuropeptid befolyásolja az endolympha összetételét, úgymint a substance P, vazopresszin, szomatosztatin (Ferrary és Sterkers, 1998; Kitano et al., 1999). Az endolympha ionkoncentrációja és elektromos potenciálja grádiens képez a bazálistól az apikális kanyarulat felé, csakúgy mint a PACAP és a PAC1 receptor a stria vascularisban (Sterkers et al., 1984; Abu-Hamdan et al., 2006), ami alapján feltételezhető, hogy a PACAP-nak hatása van az endolympha összetételére. Kutatócsoportunk korábban már vizsgálta a ductus cochlearisban található endolympha fehérjéinek változását intraperitonealis PACAP-kezelés hatására 1 napos csirkében (Gaál et al., 2008). A kísérlet során számos fehérjecsúcsot találtunk a 14-80 kDa közötti tartományban, amely megfeleltethető az endolymphában előforduló főbb fehérjéknek (albumin, α -kilotripszin, α -antitripszin, transzferrin, apolipoprotein D, apolipoprotein J, fetuin), a PACAP kezelésnek azonban nem volt hatása a fehérjék összetételére az általunk alkalmazott kísérleti elrendezésben.

1.4.4. A PACAP hatása belső fülből készült sejtenyészeten

Az apoptózis a belső fül fiziológiás folyamataiban fontos szerepet játszik. Különböző károsító hatások, például túlzott akusztikus ingerlés, ototoxikus ágensek, oxidatív stressz, fertőzések vagy ezek kombinációja a szőr- és/vagy idegsejtek túlzott mértékű apoptózisához, ennek következtében pedig halláscsökkenéshez vezethet (Huang et al., 2000). Az apoptózis folyamatában az oxidatív stressz fontos szerepet játszik, többek között a ciszplatin eredetű ototoxicitás is intracellulárisan reaktív oxigéngyökök és szabadgyökök képzését indítja meg. Ezek alapján azon molekulák, melyek antioxidáns és antiapoptotikus hatásokkal rendelkeznek, mint például a PACAP, a belső fül károsodások kivédésében fontos szerepet játszhatnak (Kopke et al., 1997; Seidman és Vivek, 2004). Ezen jelátviteli utak vizsgálatára kutatócsoportunk napos csirkék belső füléből készített sejtenyészetet. A reaktív oxigén gyökök létrehozására

H₂O₂ kezelést alkalmaztunk 1 mM koncentrációban, védőfaktoroként pedig 100 nM PACAP1-38-at használtunk (Rácz et al., 2010a).

A sejtek túlélését MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid) teszttel vizsgáltuk. Az MTT teszt mind a kontroll csoportban, mind a csak PACAP-pal kezelt csoportban 90%-os élő sejtszámot mutatott, a két csoport között nem volt különbség. H₂O₂ kezelés hatására a sejtek túlélése a felére csökkent, ami PACAP kezelés hatására szignifikánsan javult. JC-1, Annexin V és propidium jodid kettős festésével készült flow citometria kimutatta, hogy a H₂O₂ hatására mind az apoptózis, mind a nekrozis mértéke növekszik, amelyek közül a PACAP az apoptózis mértékét szignifikáns mértékben csökkenteni tudta. Szintén kimutattuk, hogy a párhuzamosan végzett PACAP és H₂O₂ kezelés esetén a kaszpáz-3 apoptotikus fehérje aktivációja kisebb mértékű volt, mint a csak H₂O₂-al kezelt sejtek esetében (Rácz et al., 2010a).

A lehetséges molekuláris mechanizmusokat korábban részletesen kifejtettem, röviden elmondhatjuk, hogy az általános bevezetőben említett útvonalak közül a belső fülben részt vesznek mind cAMP függő és független útvonalak. A cAMP-n keresztül a PKA/ERK/CREB útvonalak aktiválódnak, a JNK/p38MAPK pedig gátlás alá kerül. A cAMP-től függetlenül a PACAP az apoptózis intrinsic mitokondriális útvonalát gátolja egyrészt a Bad/Bax molekulák gátlásával és a Bcl-2/Bcl-xL molekulák aktiválásával, másrészt a PLC/DAG és PLC/IP₃ útvonalakon keresztül is. Ezek a mitochondriumból csökkent citokróm c kiáramlást, csökkent kaszpáz aktivációt és ennek megfelelően csökkent apoptózist eredményeznek. Ez lehet a molekuláris magyarázata, hogy a PACAP miként képes a belső fülben védő hatást kifejteni különböző ototoxikus ágensek, öregedés, zaj túlingerlés vagy más károsító hatások esetén.

1.5. A PACAP szerepe a fogfejlődésben

1.5.1. A fogfejlődés

A fogak fejlődése a száj ektoderma és az alatta található ektomesenchyma folyamatos egymásra hatása révén alakul ki, aminek hatására az ektoderma benyomul az ektomesenchymába és kialakítja a lamina dentalist, egériben a 10-11. embrionális napon (E10-11). Később ebből alakulnak ki a fogbimbók (E12-15), melyekből a sapka (E16-19) és harang stádiumok (korai: E19-4. postnatalis nap, késői: 5. postnatalis nap-fogáttörés) jönnek létre (1.5. ábra). A sapka stádiumban már felismerhetőek a belső és

külső zománcsejtek rétege, valamint a köztük található zománcpulpa. A korai harang stádiumban a belső zománcsejtek rétegének bazális oldalán a stratum intermedium már azonosítható. A késői harang stádiumban a belső zománcsejtek már zománctermelő ameloblastokká differenciálódtak, az általuk közrezárt térben elhelyezkedő ektomesenchymából pedig a dentin képzéséért felelős odontoblast sejtek rétege, az alattuk elhelyezkedő subodontoblast réteg, és a későbbi pulpakamra helyén megjelenő fogpapilla látható. Az egerek foga a születés utáni 9-11. napon tör át (Tucker és Sharpe, 2004; Cai et al., 2011). A fogfejlődés befolyásolásában több, mint 300 faktort azonosítottak, melyek közül a csont morfogénikus protein (BMP), sonic hedgehog (SHH), wntless-related integration site (WNT), fibroblast növekedési faktor (FGF) és Notch jelátviteli utak a leggyakrabban vizsgált faktorok (Harada et al., 1999, 2006; Thesleff, 2006).

1.5.2. A PACAP előfordulása fog és parodontalis mintákon

A PACAP-ot először az odontoblast sejtekben, és a subodontoblast rétegben, valamint a pulpa területén az erek körül mutatták ki mind patkány, mind emberi mintákban (Ichikawa és Sugimoto, 2003). Nonaka és munkatársai leírták, hogy fog luxációját követően mind a PAC1 receptor, mind a PACAP mennyisége megnő a ligamentum parodontale területén (Nonaka et al., 2013). Kutatócsoportunk a PACAP hatásait a fogakra egéren vizsgálta, ezeket az eredményeket külön fejezetben részletezem (Sándor et al., 2014, 2016).

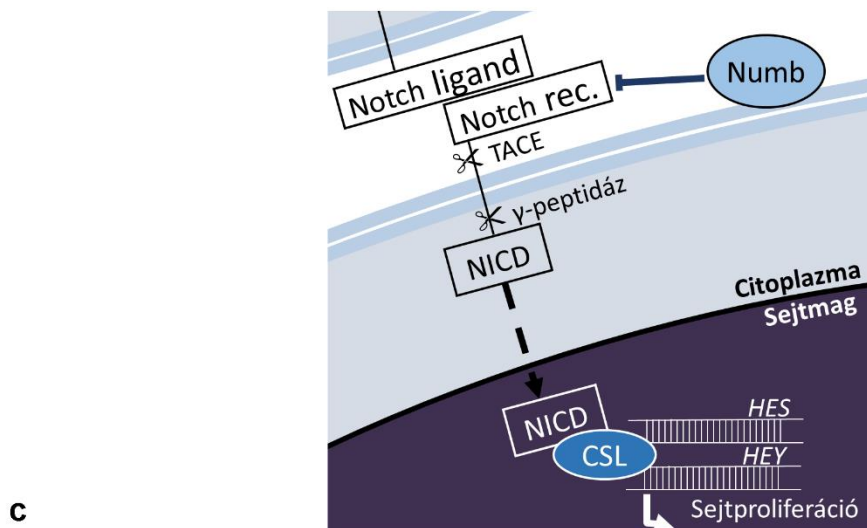
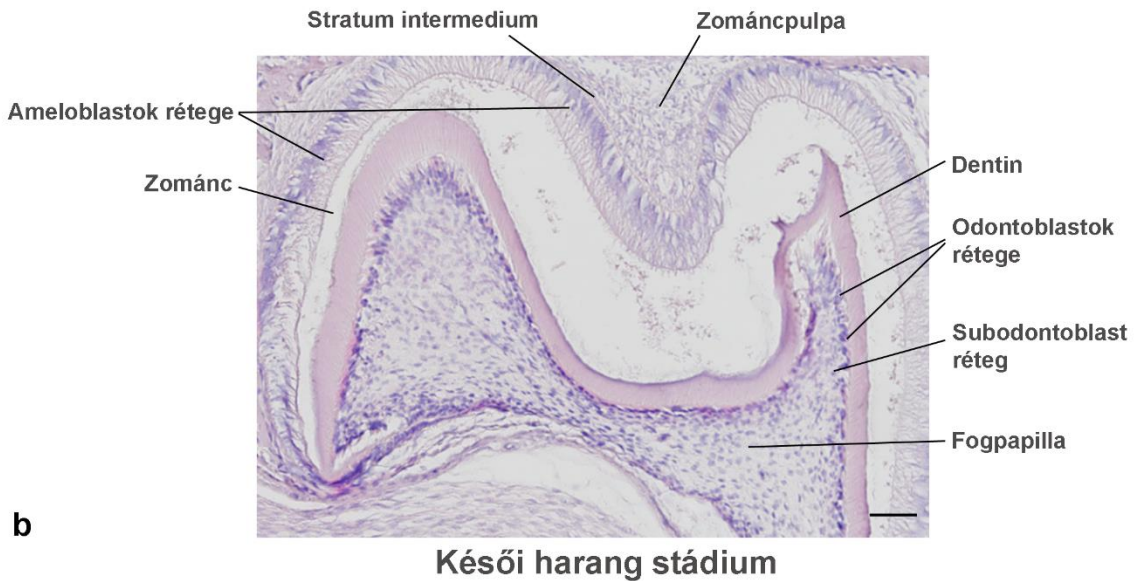
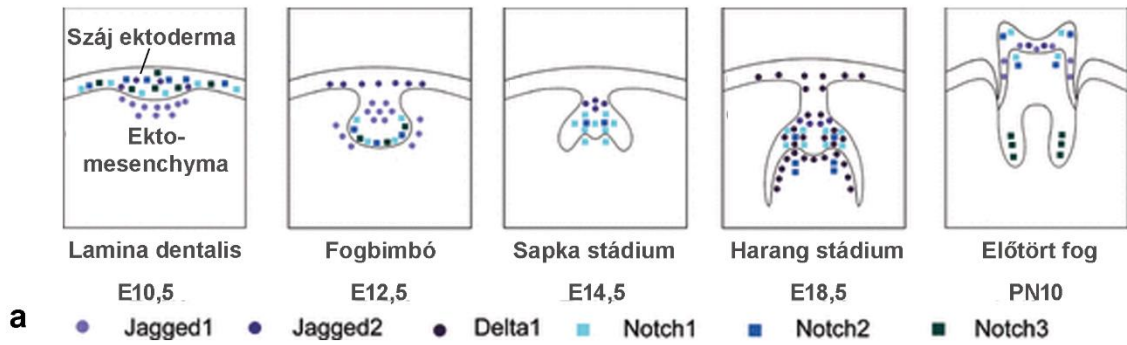
1.5.3. A PACAP és a fogfejlődésben résztvevő jelátviteli útvonalak

A csont és fogfejlődésben fontos szerepet játszó molekulák közül a PACAP a PKA-n keresztül a Runx-kapcsolt transzkripciós faktor (RUNX2) molekula aktivitását, és ezzel az SHH gén, valamint osteoblast sejt kultúrában a BMP-k és a Smad fehérjecsald expresszióját is befolyásolja (Wang et al., 2005; Juhász et al., 2014b, 2015).

A Notch jelátviteli útvonal egy evolúciós szinten nagy mértékben konzervált jelátviteli útvonal, amelynek számos szerv kialakulásában szerepe van, beleértve a fogak fejlődését is (Mitsiadis et al., 1998). Egymással szomszédos sejteken expresszálandó ligandjainak és receptorainak egymáshoz kötésével befolyásolja a sejtek proliferációját és/vagy apoptózisát. Aszimmetrikus sejtosztódást és különböző irányú

sejtdifferenciációt indukál, így az egymás melletti azonos eredetű sejtekből különböző funkciójú leánysejtek létrejöttét és így különböző rétegek kialakulását segíti elő (1.5. ábra) (Cai et al., 2011). A Notch jelátviteli útvonal részben a PACAP-pal átfedést mutat, így feltételeztük, hogy változásai PACAP-génkiütött egerekben annak hatásait pótolni hivatottak. Célunk volt feltérképezni, hogy PACAP hiányában ezek az útvonalak hogyan változnak, és hogy a Notch útvonal szolgálhat-e a PACAP-génkiütött egerekben a PACAP hiányának kompenzálására.

A Notch jelátviteli útvonalban négy receptor molekula (Notch1, 2, 3, 4), valamint öt ligand (DLL1, 3, 4 és Jagged1, 2) vesz részt, amelyek I-es típusú transzmembrán fehérjék (Lindsell et al., 1995; Luo et al., 1997). A ligandok receptorhoz való kötésének hatására a TNF- α konvertáló enzim (TACE) levágja a Notch intracelluláris egységet (Notch intracelluláris domén, NICD) a receptorról, ami a sejtmagba kerül (1.5. ábra). Ott kötést hoz létre a CSL transzkripciós faktorról (CBF1 humans/Su (H) *Drosophila*/LAG1 *Caenorhabditis elegans*) (Blokzijl et al., 2003; Katoh és Katoh, 2007). A Numb fehérje a Notch jelátviteli útvonalat gátolja, direkt fehérje-fehérje kontakt útján ubiquitinációt és más folyamatokat indít el, melyek az osztódás utáni leánysejtek különböző irányú fejlődéséért felelősek (Guo et al., 1996; McGill és McGlade, 2003).



1.5. ábra: a) A Notch jelátviteli útvonal elemeinek lokalizációja a fogfejlődés különböző szakaszaiban (átdolgozva: Cai et al., 2011 alapján). b) Kis nagyítású hematoxylin-eosin (HE) festett metszet egér első alsó molaris fogából késői harang stádiumban.

Aránymérték: 50 μ m. c) A Notch jelátviteli útvonal főbb elemei. **CSL**: CSL transzkripciós faktor; **Ex**: x. embrionális nap; **HES**: hairy and enhancer of split; **HEY**: Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif; **NICD**: Notch intracelluláris domén; **PN10**: 10. postnatalis nap; **TACE**: TNF- α konvertáló enzim.

1.6. A PACAP szerepe a cardiovascularis rendszerben

A PACAP sokféle hatást fejt ki az szív- és érrendszerre. PACAP kezelés hatására vazodilatáció és a szisztémás vérnyomás csökkenés alakul ki. Vazodilatációs hatását számos szervrendszer ereiben kimutatták különböző kísérleti állatokban (egér, patkány, macska, kutya, sertés) és emberben is (Nandha et al., 1991; Ishizuka et al., 1992; Minkes et al., 1992; Ross-Ascutto et al., 1993; Anzai et al., 1995; Wallengren, 1997; Markovics et al., 2012). Ezen hatásokat a PACAP mindhárom receptora közvetíti, melyek főként az artériák és arteriolák falában helyezkednek el. Jelenlétüket kimutatták többek között az aortában, a koronáriákban és az agy ereiben is (Cardell et al., 1991; Miyata et al., 1998; Harmar et al., 2004; Baun et al., 2011). A PACAP egyértelmű vazodilatációs hatásait árnyalja, hogy a PACAP különböző katekolaminok elválasztásához, és ezen keresztül szisztémás vérnyomásemelkedéshez vezet bizonyos tanulmányok szerint (Minkes et al., 1992; Moller és Sundler, 1996). Kutatócsoportunk a PACAP angiogenetikus hatásait is kimutatta az agy microvaszkuláris ereiből származó endothelsejteken (Bánki et al., 2015). Egérből izolált endothel sejttenyészetben az ERK útvonal aktiválásával, így a JNK és p38MAPK útvonalak gátlásán keresztül a PACAP csökkentette az oxidatív stressz okozta apoptózist (Rácz et al., 2007).

Az intrathecalisan adagolt PACAP szívre gyakorolt pozitív inotrop, chronotop és dromotop hatásait patkányban mutatták ki, miközben ezen kezelések a vérnyomást nem befolyásolták (Farnham et al., 2011). Kutatócsoportunk a PACAP védő hatását igazolta cardiomyocita sejttenyészetben oxidatív stressz és doxorubicin indukálta apoptózis, valamint iszkémia-reperfúzió okozta károsodás ellen, amelyet részben a Bad, Bcl-2, kaszpáz-3 mitokondriális útvonalon keresztül fejt ki (Gasz et al., 2006; Rácz et al., 2008, 2010b). A szív- és érrendszer területén több klinikai kísérletet is elvégeztek, amelyek kimutatták a PAC1 receptor mRNS-ét emberi myocardium mintákon, valamint a PACAP szintjének változását szöveti szinten myocardialis iszkémiában és a szérumban dilatatív cardiomyopathia esetén (Saetrum Opgaard et al., 2001; Szántó et al., 2012; Sárszegi et al., 2019).

1.7. A PACAP-génkiütött (KO) egerek vizsgálata

Az endogén PACAP hiányának vizsgálatára Hashimoto és munkatársai 2001-ben PACAP-génkiütött (KO) egértörzset hoztak létre (Hashimoto et al., 2001). Ezen egerek makroszkóposan nem különböznek vad társaiktól, azonban a mikroszkópos morfológia és a funkcionális vizsgálatok eltéréseket mutatnak, valamint az egerek viselkedése is eltér vad társaikétól (Reglódi et al., 2012). A KO egerek szaporodási képessége csökkent, aminek hátterében mindkét nemben a genitális rendszer változásai, valamint a viselkedésbeli eltérések állnak (Reglódi et al., 2018b; Meggyes et al., 2020). A KO egerek mortalitása emelkedett, metabolikus rendszerükben számos eltérés, például emelkedett inzulin érzékenység detektálható (Tomimoto et al., 2008). Az állatokra hiperaktivitás, csökkent félelemérzet és depressziós jelek jellemzőek (Hashimoto et al., 2001; Gaszner et al., 2012). A PACAP KO állatok fájdalomra a vad típustól eltérő választ adnak, stresszreakciójuk is eltérő (Hashimoto et al., 2011). A PACAP KO állatokban a kisagy mikroszkópos felépítése eltér a vad egerekétől, valamint az idegsejtek abnormális arborisatioja és myelinisatiois eltérések mutathatók ki (Allais et al., 2007; Yamada et al., 2010).

A KO egerek különböző toxikus vagy károsító hatásokra a vad egereknél szignifikánsan nagyobb mértékű károsodással reagálnak. Ezt kimutatták iszkémiás és iszkémia-reperfúzió modellekben többek között az agy, a retina, a vese és a bél területén (Ohtaki et al., 2006; Szakály et al., 2011; Horváth et al., 2016). Számos toxicitás modellben is a PACAP KO egerek megnövekedett érzékenységét detektálták, például N-metil-D-aszpartát okozta retinakárosodásban, autoimmun encephalitis modellben, gerincevelő és perifériás ideg sérülése esetén, pancreas glucotoxicitás modellben és a szív doxorubicin okozta károsodásában (Mori et al., 2010; Endo et al., 2011; Tsuchikawa et al., 2012). Arthritis modellben a PACAP KO egerek csont újdonszövetképződése is zavart mutatott (Botz et al., 2014).

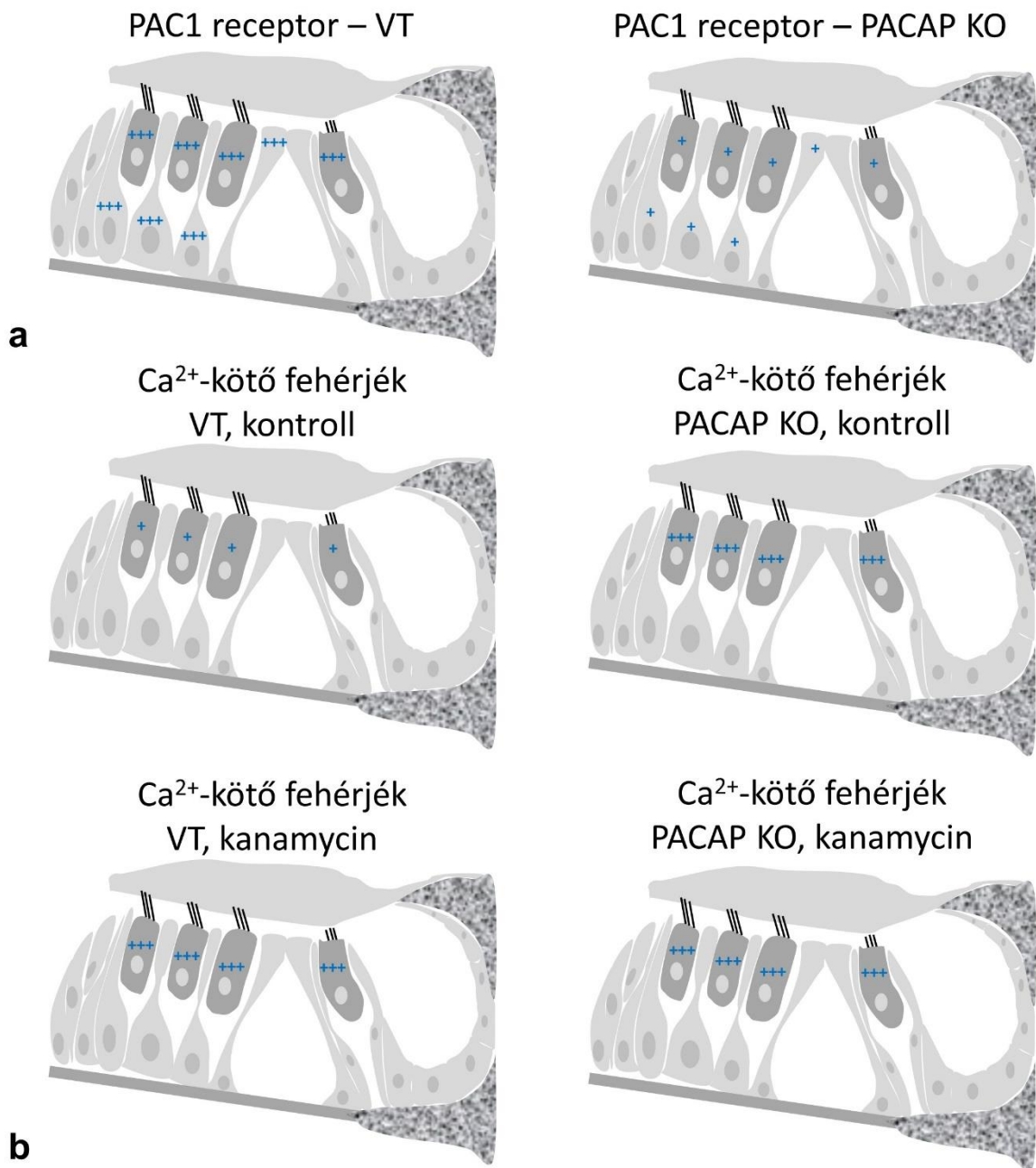
1.7.1. A hallórendszer vizsgálata PACAP KO egerekben

Kutatócsoportunk korábban heterozigóta és homozigóta PACAP-génkiütött egereken vizsgálta a cochlea felépítését és a PAC1 receptor jelenlétét (Tamás et al., 2012). Míg hematoxylin-eosin (HE) festett metszeteken nem találtunk különbséget a vad és KO egércsoportok között, a PAC1 receptor fehérje kimutatás különbségeket mutatott a vad és KO csoportok között. Mind a két csoportban PAC1 receptor immunpozitivitást tudtunk kimutatni a belső és külső szőrsejtek területén, a Deiters-sejtek és a külső pillér sejtek területén, ami egybevág a korábban leírt eredményekkel. A PAC1 receptor lokalizációja nem különbözött vad és PACAP KO állatok esetében, azonban a jel intenzitásában különbséget találtunk. A PACAP KO állatok esetében minden területen a PAC1 receptor szignifikánsan alacsonyabb jelintenzitást mutatott, mint vad társaikban (1.7.1. ábra).

Kutatócsoportunk ezután az endogén PACAP hiányának hatását vizsgálta a Ca^{2+} -kötő fehérjék (parvalbumin, calretinin, calbindin) immunpozitivitására kontroll körülmények között, valamint kanamycin indukálta ototoxikus modellben vad és PACAP KO állatokon (Tamás et al., 2012; Németh et al., 2014). Kimutattuk 5 napos egerekben, hogy kontroll körülmények között a vad egerekben alacsonyabb a Ca^{2+} -kötő fehérjék mennyisége, amely ototoxikus kanamycin-kezelés hatására szignifikánsan emelkedett. A PACAP KO egerekben kezelés nélkül is emelkedett Ca^{2+} -kötő fehérje pozitivitást mutattunk ki, amely kanamycin-kezelés hatására nem emelkedett tovább (1.7.1. ábra).

1.7.2. A PACAP-génkiütött egerek fogfejlődése

Hét napos egerek molaris fogainak vizsgálata során azt találtuk, hogy a PACAP KO egerek esetében a vad egerekhez képest a dentin vékonyabb, kristályszerkezete rendezetlenebb, a zománc fehérjepofilja pedig csökkent variabilitást mutat (Sándor et al., 2014). A jelátviteli útvonalakat tekintve az SHH, GLI1 (glioma-associated oncogene 1) és a PTCH1 (protein patched homolog 1 protein) immunpozitivitása volt emelkedett a PACAP KO egerekben a vad állatokhoz képest. A metszőfogak vizsgálatánál azt találtuk, hogy a PACAP KO egerek fogai 2 nappal előbb törnek át, mint a vad egereké. Felnőtt egerekben a PACAP KO egerek metszőfogainak mérete kisebb, pulpakamrája szűkebb, mint a vad egerekben, és szintén rendezetlenebb kristályszerkezet jellemzi a dentin állományát (Sándor et al., 2016; Farkas et al., 2017).



1.7.1. ábra: a) A PAC1 receptor mennyisége vad típusú (VT) és PACAP KO egerek Corti-szervében. b) A Ca²⁺-kötő fehérjék immunpozitivitása vad típusú (VT) és PACAP KO egerek Corti-szervében kontroll körülmények között, és kanamycin-kezelést követően.

+: alacsony; +++: emelkedett immunpozitivitás.

1.7.3. A PACAP-génkiütött egerek cardiovascularis rendszere

A PACAP KO egerekben a cardiovascularis rendszer is változásokat mutat a vad típusú egerekhez képest. Doxorubicin kezelést követően az egerek echocardiographia segítségével mért szívfunkciói csökkentek, balkamra dilatáció alakult ki, a szívben megnövekedett fibrózist és szívizomsejt-degenerációt írtak le (Mori et al., 2010). A KO egerek meningeális ereinek vazodilatációs képessége csökkent (Markovics et al., 2012).

1.8. A PACAP és az öregedés

Egyre több kutatási adat utal arra, hogy a PACAP antiapoptotikus és antiinflammatorikus hatásának fontos szerepe van az öregedési folyamatok lassításában és szabályozásában. Feltételezhető, hogy a PACAP KO egerekben ezen hatások hiányában az öregedési folyamatok felgyorsulnak, ugyanis a KO egerek számos szervrendszere sokkal fiatalabb korban mutatja az öregedés jeleit, mint vad társaik szervei. A KO egerekben az emelkedett érzékenység károsító hatásokra, a szervrendszerek korai degenerációja, a fokozott apoptózis, oxidatív stressz és gyulladás mind alátámasztják ezen elméletet (Reglődi et al., 2018a). Számos öregedéssel járó folyamat a KO egerekben előbb és/vagy kifejezettebben jelenik meg. Ismert, hogy a KO egerekben csökkent a könny termelődése, és emelkedett a cornea elszarusodása (Nakamachi et al., 2016). A PACAP KO egerek retinájának morfológiája, a ganglionsejtek számának csökkenése, a Müller-glia sejtek fehérjeprofiljának változása a retina korai öregedésére utalnak (Kovács-Valasek et al., 2017). Kutatócsoportunk a KO egerek szinte minden szervrendszerében szisztémás amiloidózist mutatott ki, amely súlyosabb volt, és korábban jelent meg, mint vad társaikban (Reglődi et al., 2018c).

II. Célkitűzés

Kísérleteink során célul tűztük ki, hogy a PACAP-génkiütött egerek különböző szervrendszereiben felderítsük a PACAP hiányából adódó elváltozásokat.

- I. A hallórendszer vizsgálata során célul tűztük ki a PACAP KO egerek hallásának vizsgálatát valamint a belső fül és a hallópálya eltéréseinek kimutatását, ezért az alábbi vizsgálatokat végeztük el:
 1. A PACAP KO egerek hallását agytörzsi kiváltott válasz módszerrel (auditory brainstem respons = ABR) vizsgáltuk kollaborációs partnereinkkel, mely eredmények nem képezik a dolgozat részét, de szorosan összefüggnek az alábbi morfológiai vizsgálatainkkal.
 2. A hallópálya magjaiban a hanginger hatására létrejövő idegsejt aktivációt vizsgáltuk c-Fos immunfestéssel.
 3. Annak céljából, hogy különbséget tehesünk az össz sejtszám és az aktivált sejtek száma között, a cochlearis magokban Nissl-festést végeztünk.
 4. A cochlearis magokban PAC1 receptor immunfestést végeztünk.
 5. A halláscsökkenés okának felderítése céljából belső fülből származó ductus cochlearisok lizátumának fehérjeprofil analízisét végeztük el.

- II. Fogfejlődéses vizsgálataink során a KO egerekben a Notch jelátviteli útvonal megváltozását vizsgáltuk immunfluoreszcens festés segítségével 5 napos egerek molaris fogain.

- III. Az érrendszer vizsgálatokor célul tűztük ki vad típusú és PACAP KO egerekből izolált arteria carotis communis és arteria femoralis ereken a PACAP1-38, PACAP1-27 és VIP vazorelaxációs hatásának vizsgálatát, valamint a PACAP receptorok eloszlásának leírását.

III. Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok

Kísérleteinket vad és PACAP KO (heterozigóta és homozigóta) állatokon végeztük. Az egereket CD1-es alapon tenyésztettük. Az állattartás 20-24°C-on, 50-60% relatív páratartalommal, 12-12 órás sötét-világos ciklusban történt. Az állatok táplálékfelvételét és vízfogyasztását nem korlátoztuk. Minden beavatkozást a Pécsi Tudományegyetem és a Semmelweis Egyetem etikai szabályzatának megfelelően végeztünk, állatkísérleteinket a Baranyai Megyei és Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Osztályai engedélyezték (BA02/2000-24/2011, XIV-I-001/1028-4/2012; PE/EA/1912-7/2017). A PACAP-génkiütött egértörzs Hashimoto és munkatársai laborjából származik, a tenyészetet 10 generációnként kereszteztük vissza vad CD1-es egerekkel (Hashimoto et al., 2001). Az egerek genotípusának ellenőrzése a Phire Animal Tissue Direct PCR Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) segítségével történt. Az ellenőrzéshez használt primer szekvenciákat a 3.1. táblázat tartalmazza.

	sense	antisense
VT	5'-ACCGAAAACAAATGGCTGTC-3'	5'-GTCCACAAAGTATATCTGTGCATTCT-3'
KO	5'-ATCTCCTGTCATCT CACCTGCTCCT-3'	5'-GAAGAAGTTCGTCAAG AGAGGCGATAG-3'

3.1. táblázat: A genotípus ellenőrzéséhez használt sense és antisense primerek szekvenciái.

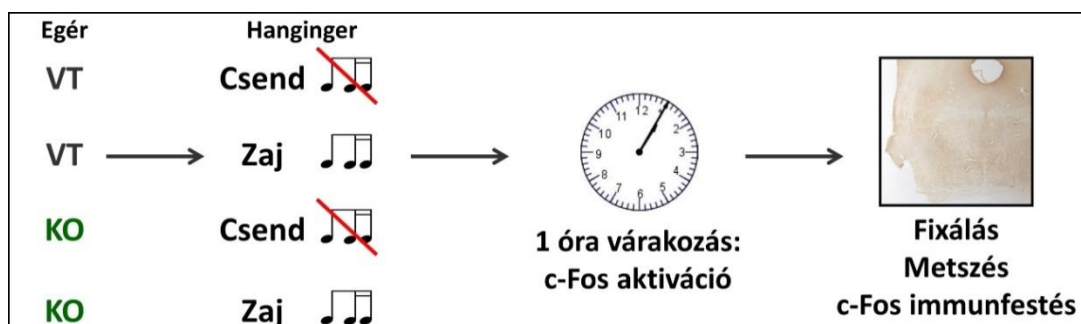
3.1. A hallórendszer funkcionális vizsgálata ABR módszerrel

A Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetével kollaborációban elvégzett vizsgálatok metodikájának és eredményeinek részletes tárgyalása nem képezi jelen dolgozat részét, azonban a saját morfológiai eredményeimmel való szoros összefüggés miatt azokat a diszkusszióban röviden ismertetem.

3.2. Idegsejtaktiváció mérése a hallópálya magjaiban – c-Fos immunfestés

A hallópálya magjaiban található idegsejtek aktivációjának méréséhez c-Fos immunfestést végeztünk (3.2. ábra). Ezen vizsgálatokhoz a hím egereket (1,5 hónapos, n=9 VT, és n=8 KO) 24 óráig csendes környezetben tartottuk. Ezután a hangingerrel

kezelt csoportot (továbbiakban: „zaj”) egy erre a célra kialakított hangszigetelt tárolóban helyeztük el, ahol 100 dB hangnyomással 4 és 20 kHz közötti ún. fehér zajt kaptak 30 percig. A hanginger forrása egy speciális, magas frekvencia kibocsátására is alkalmas, hangszóró, amelyet a tároló tetején helyeztünk el. A hangingert egy Mc.Taato, Nightline Pro 400 típusú erősítőn keresztül az Audacity program segítségével szabályoztuk (Dominic Mazzoni, GNU GPL licenc). A tárolóban a zaj erősségét és frekvencia-összetételét egy előre kalibrált mikrofon és egy SVAN971 típusú zajszintmérővel (SVANTEK, Lengyelország) ellenőriztük. A kontroll csoportot (továbbiakban „csend”) a kísérlet kezdetét megelőzően ugyancsak 24 óráig csendben tartottuk, majd a tárolóba helyeztük szintén fél órára hanginger alkalmazása nélkül. A zajdobozból való kivétel után mindkét csoport esetében 1 órát vártunk, mely idő alatt az akut zaj hatására a hallópálya magjaiban az aktiválódott sejtek sejtmagjában megtörtént a c-Fos transzkripciója, a citoplazmában mRNS-ének transzlációja, majd a fehérje sejtmagba való transzlokációja. Ezt követően az egereket túlaltattuk intraperitonealis ketamin-xylazin (200 mg/ttkg CP-Ketamin 10% és 20 mg/ttkg CP-Xylazine 2%, Produlab Pharma B.V., Hollandia) oldattal. A mellkas megnyitását követően a bal kamrán át az aortába vezetett kanül segítségével az érrendszert foszfát pufferes sóoldattal (PBS, 20 ml, 0,1 M, pH=7,4) mostuk át, majd pedig 4%-os paraformaldehid oldattal (150 ml 4%-os paraformaldehid 0,2 M-os Millonig-féle foszfát pufferes sóoldatban, pH=7,4) perfúziós fixálás történt. Az agyakat kipeparáltuk, és 24 órára a fent leírt 4%-os paraformaldehid oldatba helyeztük immerziós posztfixálás céljából. Az agyak hallópályát tartalmazó részeiből 30 µm-es frontális metszeteket készítettünk, Leica VT1000S típusú vibratome segítségével (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország), a ventralis és dorsalis cochlearis magok (VCN, DCN), az SOC különböző részei, a nuclei lemnisci lateralis (NLL), a CI valamint a primer hallókéreg (AU1) vizsgálata céljából (1.4.2.1. és 1.4.2.2. ábra).



3.2. ábra: Kísérleti protokoll: a hallópályában található idegsejtek aktivációjának mérése c-Fos immunfestéssel.

Szabadon úszó metszeteinken végeztük el a c-Fos immunfestést DAB előhívással. A metszeteket 0,1 M-os PBS oldatban mostuk 3x10 percig, hogy a fixáló oldatot kimossuk. Ezután a metszeteket 0,5%-os Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Magyarország) oldatban inkubáltuk fél óráig, majd blokkolóoldatba helyeztük újabb 30 percre. A blokkolóoldat esetünkben 2%-os normál kecske szérumot tartalmazó (NGS, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Suffolk, Egyesült Királyság) PBS volt. Ezután a blokkolóoldathoz adtuk a nyúlban termelt poliklonális primer c-Fos ellenes antitestet (Santa Cruz Biotechnology Inc, sc-52, Santa Cruz, CA, Amerikai Egyesült Államok) 1:500 hígításban, és a metszeteket ezen oldatban egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap 3x10 perc PBS mosás után a metszeteket 1:200 hígítású kecskében termelt biotinilált nyúl ellenes szekunder antitesttel (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, Amerikai Egyesült Államok) kötöttük, szintén blokkolóoldatban, 2 órán keresztül. Ezután 3x10 perc PBS mosás következett, majd a metszeteket avidin-biotinilált tormaperoxidáz komplexet tartalmazó oldatba helyeztük 1 órára. Ismételt 3x10 perc PBS mosás után a híváshoz 0,02% 3,3' diamino-benzidint (DAB, D5637, Sigma-Aldrich, Magyarország) és 3x10⁻⁵% H₂O₂-t tartalmazó Tris puffert készítettünk. A hívást 10 perc után állítottuk le PBS oldattal. 3x10 perc PBS mosás után a metszeteket zselatinos tárgylemezre húztuk fel, és 2x10 perc xilolban történő derítés után DePex-el (Fluka, Heidelberg, Németország) fedtük.

A kísérlet során negatív kontrollként kihagytuk a primer, illetve a szekunder antitestet, mely esetekben specifikus festődést nem láttunk. A Santa Cruz által forgalmazott c-Fos ellenes antitest (sc-52) specifitását kutatócsoportunk korábban kimerítéses vizsgálattal ellenőrizte, a primer antitest c-Fos fehérjével történő preinkubálását követően a festés specifikus jelet nem adott (Gaszner et al., 2012).

A metszetek digitalizálásához Nikon Microphot FXA mikroszkópot használtunk Spot RT kamerával (Nikon, Tokió, Japán). A morphometriai méréseket ImageJ (ImageJ 1.50i) programmal végeztük. A dolgozatba került reprezentatív képeket kontrasztosítottuk, a mikroszkóp látótér szélének egyenetlen megvilágítását korrigáltuk, a képeken látható artefaktokat (beágyazó anyag maradványok, porszemek) eltávolítottuk Photoshop program segítségével (7.0.1, Adobe, San Jose, CA, Amerikai Egyesült Államok).

3.3. Idegsejt számolás a cochlearis magok területén – Nissl-festés

A cochlearis magok területén az idegsejtek számának meghatározására Nissl-festést végeztünk. Négy hónapos vad és KO hím egér (n=3-3) agyát dolgoztuk fel a c-Fos festésnél leírtakkal megegyezően. A metszést követően a metszeteket zselatinos tárgylemezre húztuk, majd Nissl-oldattal (0,5 g Azur III, 0,5 g nátrium-tetraborát, 0,5 g toluidin-kék és 30 g szacharóz 100 ml desztillált vízben) megfestettük. A metszeteket 96%-os és abszolút alkohollal differenciáltuk. Xilolban 10 perc derítést követően a metszeteket DePex-el fedtük (Fluka, Heidelberg, Németország). A metszetek digitalizációja és a reprezentatív képek utókezelése a c-Fos-nál leírtaknak megfelelően történt. A sejtszámolásnál csak azon sejteket vettük számításba, amelyeket jól definiált nucleolusa alapján egyértelműen idegsejtként lehetett azonosítani.

3.4. PAC1 receptor immunfestés a hallópálya magjaiban

A hallópálya magjaiban (VCN, DCN, SOC, NLL, CI) PAC1 receptor festést végeztünk 2 hónapos vad és KO hím egerekben (n=4-4). Az egerek túlaltatása, perfundálása és a metszetkészítés a c-Fos immunfestésnél leírtaknak megfelelően történt. A szabadon úszó metszeteken végeztük el a PAC1 receptor immunfestést fluoreszcens jelöléssel. A fent leírtakkal megegyező mosás, Triton X-100 kezelés és blokkolás (normál szamar szérummal) után a metszeteket nyúlban termelt poliklonális anti-PAC1 receptor ellenes antitesttel (Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael, 1:200) inkubáltuk egy éjszakán át. Másnap mosás után a metszeteket 1:200 hígítású szamarban termelt biotinilált nyúl ellenes szekunder antitesttel (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, Amerikai Egyesült Államok) kötöttünk blokkolóoldatban 3 órán keresztül. PBS mosás után (3x10 perc) Cy3 konjugált streptavidin (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, BE, Amerikai Egyesült Államok, 1:1000) következett 3 órán át. Háromszor 10 perc PBS mosás után a metszeteket zselatinos tárgylemezre húztuk, majd glicerin-PBS 1:1 arányú keverékével fedtük, és a digitalizálásig -20°C-on tároltuk. A kísérlet során a c-Fos esetében említett negatív kontrollokat elvégeztük, a primer antitestet az Alomone Labs által forgalmazott PAC1 receptor fehérjével kimerítettük. A metszetek digitalizálásához Olympus Fluoview 1000 konfokális mikroszkópot használtunk foton-számláló módban 20x objektívvel (NA: 0,75). A gerjesztés 542 nm-es lézerrel 100%-os intenzitással történt, a konfokális apertúra 80 µm, az expozíciós idő 10 µs volt. A morphometriai méréseket ImageJ

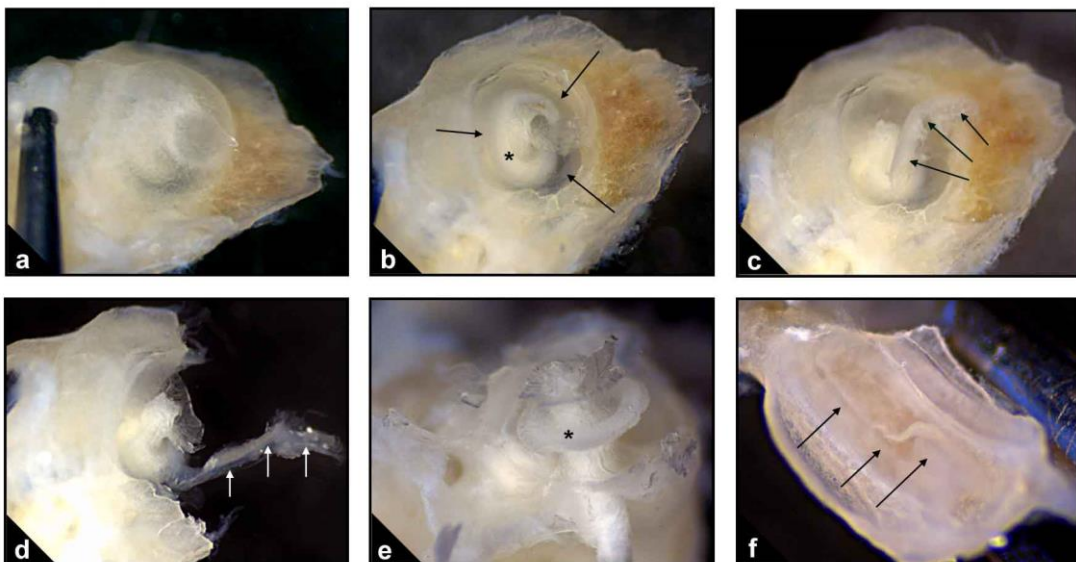
(ImageJ 1.50i) programmal végeztük. A sejtek denzitásának meghatározásához 3 sejt citoplazmájának átlagdenzitásából vontuk ki a körülötte található neuropil háttérdenzitását. A dolgozatba került reprezentatív képeket kontrasztosítottuk, a képeken látható artefaktokat (beágyazó anyag maradványok, porszemek) eltávolítottuk Photoshop program segítségével (7.0.1, Adobe, San Jose, CA, Amerikai Egyesült Államok).

3.5. Fehérjeprofil analízis ductus cochlearisból

A fehérjeprofil analízist 3-6 hónapos vad és KO hím egerek mindkét oldali belső füléből végeztük el (n=20-20). Az egerek dekapitációját követően a csontos cochleát az os temporáléból kipreparáltuk, és perilympa oldatba helyeztük (NaCl 22,5 mM, KCl 3,5 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES-Na 10 mM, Na-glukonát 120 mM, glükóz 5,55 mM, pH 7,4, 320 mOsm/l) (Berekméri et al., 2019). A ductus cochlearis kipreparálása a csontos cochleából ezen oldatban történt operációs mikroszkóp alatt. A cochlea külső csontos falát eltávolítottuk, és a ductus cochlearis apikális részét leszakítottuk a modiolusról. Ezután a cochleát kettétörtük, és a mindkét részből eltávolítottuk a ductus cochlearis fennmaradó részét (3.5. ábra). A kipreparált ductus cochlearis részeket PBS-t és proteáz inhibitor tartalmazó Eppendorf csövekbe helyeztük, kézi homogenizátorral homogenizáltuk, jégen 2 percig szonikáltuk, majd 5 percig 14.000-es fordulatszámon centrifugáltuk (RCF=18.620, Hettich Mikro 200R, MA, Amerikai Egyesült Államok). A felhasználásig a mintákat proteáz inhibitoros oldatban tároltuk -20°C-on. A minták fehérjekoncentrációját abszorpciós fotometria segítségével megmértük, és a kitek eredményeinek összehasonlíthatósága érdekében egyforma hígításban vittük fel. Méréseinkhez az R&D Systems (R&D Systems, Biomedica, Magyarország) fehérjeprofil analízisre alkalmas egér „Cytokine Array Panel A” és egér „Angiogenesis Array Kit”-eket használtuk, melyek 40, illetve 53 fehérje jelenlétének és koncentrációjának a mérésére alkalmasak. A kiteket a gyártó utasításainak megfelelően használtuk (Horváth et al., 2010):

A mintákat 1 órára 1,5 ml pufferbe helyeztük szobahőmérsékleten, amelyhez 15 µl-t adtunk a primer antitesteket tartalmazó „Detection Antibody Cocktail”-ből. Ugyanezen idő alatt a nitrocellulóz membránokat blokkoló oldatba helyeztük. Ezután a minta-antitest koktélt ráhelyeztük a membránokra és egy éjjelen át inkubáltuk rázógépen 2-8 °C-on. Másnap a membránokat 3x10 percig mostuk PBS-ben,

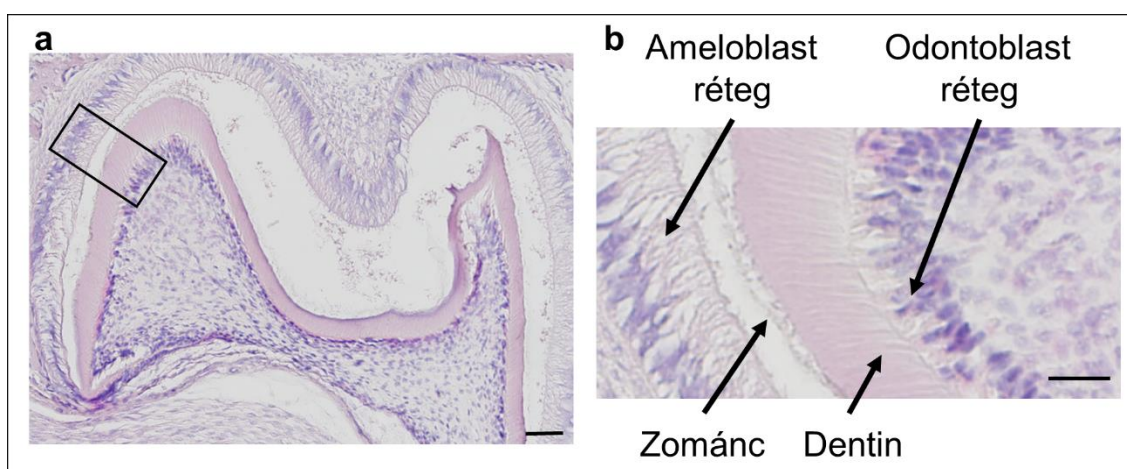
tormaperoxidázzal konjugált streptavidinnel kezeltük 30 percig, majd újabb 3x10 percig mostuk PBS-ben. Ezután a membránokat 2 ml chemilumineszcens detektáló oldattal (Amersham Biosciences, Magyarország) kezeltük 1 percig. A membránokat a fölénk helyezett röntgenfilmmel előhívtuk. A röntgenképeket digitalizáltuk, majd ImageJ 1.50i szoftver segítségével kiértékeljük. Az előhívódó pontok pixeldenzitása korrelál az adott fehérje mennyiségével, amely pixeldenzitást a pozitív kontrollokra normalizáltuk. Minden mérés eredmények két külön kitből származik, 4 külön mérésből (egy adott kit esetében 2 vad és 2 KO minta került felvitelre). Minden minta 5-5 állatból származó ductus cochlearis lizátumát tartalmazta. A reprezentatív képeket a megfelelő kontraszt érdekében korrigáltuk (Photoshop 7.0.1, Adobe, San Jose, CA, Amerikai Egyesült Államok).



3.5. ábra: A cochlea operációs mikroszkóp alatt történő boncolásának lépései. a) Az ép csontos cochlea. Az apex jobbra-felfelé tekint, a kanyarulatok áttűnnek a csonton. b) Az apikális kanyarulat a csontos fal részleges eltávolítása után. Nyilak: ductus cochlearis. *: lamina spiralis ossea. c) A ductus cochlearis apikális részének eltávolítása. Nyilak: ductus cochlearis. Ezután a cochleát a modiolus mellett két darabra törjük, hogy a ductus cochlearis bazális-középső részéhez is hozzáférjünk. d) A cochlea modiolust tartalmazó darabja. Nyilak: a ductus cochlearis bazális-középső része. e) A modiolust tartalmazó darab a ductus cochlearis teljes eltávolítása után. *: lamina spiralis ossea. f) A modiolust nem tartalmazó darab a ductus cochlearissal (nyilak).

3.6. A Notch jelátviteli út elemeinek vizsgálata molaris fogakon

A Notch jelátviteli út molekuláinak immunfestéséhez 5 napos vad, HZ és KO egerek molaris fogait használtuk (n=3-3-3). Dekapitációt követően az egerek fejét Saint-Marie fixálóba helyeztük (99% etil-alkohol, 1% vízmentes ecetsav) 24 órára. Ezután a mintákat felszálló alkoholsorban dehidráltuk, majd paraffinba ágyasztuk, végül 5 µm-es sagittális szeleteket készítettünk. A standardizálhatóság érdekében minden állat esetében a késői harang stádiumú fogak közül az első alsó molaris fog mesialis-buccalis csücskének a mesialis oldalát vizsgáltuk (3.6. ábra).



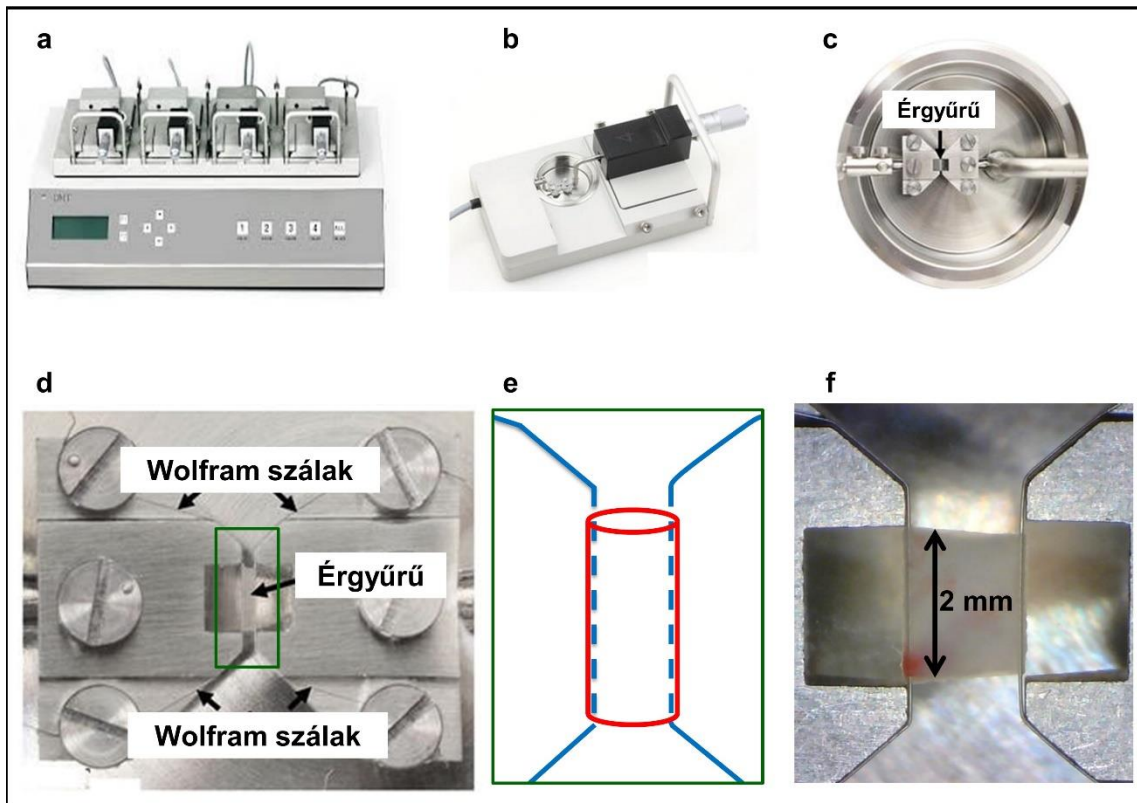
3.6. ábra: a) Kis nagyítású kép az egér első alsó molaris fogából HE festéssel. Metszeteink kiértékelése során ezen fogak mesialis-buccalis csücskének mesialis oldalát vizsgáltuk, amely a képen a fekete téglalappal jelölt, illetve attól a gyökércsúcs irányában található területnek felel meg. Aránymérték: 50 µm. b) Az (a) képen jelölt terület nagyobb nagyítással, melyen a zománcot termelő ameloblast réteg és a dentint termelő odontoblast rétegek jól elkülöníthetőek. Aránymérték: 20µm.

Metszés után a mintákat leszálló alkoholsorban rehidráltuk, majd 3x10 perc PBS mosás következett. Ezután a mintákat fél óráig blokkoltuk 1%-os normál marha szérummal PBS-ben 37°C-on. Ezt követte a nyúlban termelt primer antitestekkel (Notch1,2,3,4, DLL1,3,4, Jagged1,2, CSL, TACE, Numb) történő inkubáció 1:500 hígításban egy éjszakára (Cell Signaling Technology, Amerikai Egyesült Államok). A szekunder Alexa555-el konjugált marhában termelt nyúl ellenes antitest (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, Amerikai Egyesült Államok) 1:1000 hígításban került alkalmazásra 3 órán keresztül, majd 3x10 perc PBS mosás következett.

Ezután a metszeteket Vectashield Hard Set fedőanyaggal fedtük (Vector Laboratories, Peterborough, Egyesült Királyság), amely a sejtmagok jelölésére DAPI-t (4',6-diamidino-2-fenilindol) tartalmazott. A metszeteket a digitalizálásig -20°C-on tároltuk. Digitalizáláshoz Olympus Fluoview 1000 konfokális mikroszkópot használtunk foton-számláló módban 60x objektívvel (NA: 1,3). A morphometriai méréseket ImageJ (ImageJ 1.50i) programmal végeztük. Minden esetben 10 ameloblast és 10 odontoblast sejt citoplazmájának az intenzitását mértük le, majd ezen eredményeket átlagoltuk. Az eredményeket relatív skálán adtuk meg.

3.7. A PACAP1-38, PACAP1-27, VIP vazorelaxációs hatásának vizsgálata

Ezen kísérlethez 8-12 hetes hím vad és PACAP KO egereket használtunk (n=6-6). Az egereket *i.p.* ketamin-xylazin oldattal altattuk (81,7 mg/ttkg ketamin, Gedeon Richter Plc., Magyarország és 9,3 mg/ttkg xylazin, Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Hollandia), majd az arteria carotis communis (CA), és az arteria femoralis (FA) proximális részét távolítottuk el Olympus SZX7 operációs mikroszkóp alatt (Olympus Inc., Tokió, Japán). Az izolálendő ereket proximálisan és disztálisan is elkötöttük, majd az eret az elkötések között kimetszettük. Az izolált erek 4°C-os, 95%-os O₂-nel és 5%-os CO₂-dal dúsított (Linde, Répcelak, Magyarország) Krebs oldatba kerültek (NaCl 119 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, Mg₂SO₄ 1,2 mM, CaCl₂×2H₂O 1,6 mM, EDTA 0,026 mM, glükóz 11,1 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok; NaCl és KCl: VWR International, Radnor, PA, Amerikai Egyesült Államok). Az erek eltávolítása után az állatokat *i.p.* pentobarbitállal túlaltattuk (100 mg/ttkg, eva Sante Animale, Libourna, Franciaország). Az ereket 2 mm-es gyűrűkre vágtuk, amelyeket a méréshez 2 wolfram szál közé helyeztünk oxigenizált Krebs oldatban. A wolfram szálak átmérője a CA esetében 0,04 mm, a FA esetében 0,02 mm volt (3.7. ábra). Az erek oldatba helyezését követően elvégeztük a rendszer kalibrálását.



3.7. ábra: A DMT 610 M Wire Myograph felépítése. a) A DMT 610 M Wire Myograph készülék a 4 mérőhellyel. b) Egy mérőhely felülnézetben. Középen látható a kerek mintatartó kád. c) A mintatartó kád felépítése az érbefogóval. d) A befogók nagyobb nagyítású képe. A 3-3 csavart tartalmazó befogók 2 külső csavarja rögzíti a wolfram szálakat. Látható, ahogyan a bal és jobb oldali wolfram szál az ér hossz tengelyével párhuzamosan keresztülhalad az éren. e) A (d) ábrán zöld téglalappal jelölt terület sémás ábrája, ahol látható, amint a kékekkel jelölt wolfram szálak áthaladnak a pirossal ábrázolt éren. f) Nagy nagyítású kép, előfeszített artériával.

Ezt követően az ereket 60 percig kezelés nélkül hagytuk, majd első lépésben a mintákhoz 60 mM KCl-ot adtunk, mely az erek által elérhető maximális kontrakciót váltotta ki - ezt vettük a továbbiakban „0” értéknek (Vámos et al., 2014; Ivic et al., 2017). Miután az erek összehúzódása elérte a plató fázist, az erek relaxációs válaszát vizsgáltuk PACAP1-38, PACAP1-27 (Szegedi Tudományegyetem, Kémiai Intézet) és VIP (Bachem, Bubendorf, Svájc) kumulatív dózisára, 10^{-9} - 10^{-6} M koncentrációban. A vizsgálat folyamán 50 μ l-nyi 10^{-7} - 10^{-4} M-os koncentrációjú oldatot adtunk 5 ml-nyi Krebs-oldathoz, így értük el a kívánt 10^{-9} - 10^{-6} M-os koncentrációt. A fehérjéket desztillált vízben oldottuk fel. Amennyiben csak a vivőanyagot adtuk a mintához, nem

tapasztaltunk változást az ér motoros aktivitásában. Az erek izometrikus kontrakciójának erejét DMT 610 M Wire Myograph (Danish Myo Technology, Aarhus, Dánia) készülékkel mértük, az erek közti különbségek normalizációját Mulvany és Halpern leírása alapján végeztük (Mulvany és Halpern, 1977). Az adatok feldolgozását korábbi vizsgálatainknak megfelelően a LabChart 8 (AD Instruments, Dunedin, Új-Zéland) és Myodaq 2.01 (Danish Myo Technology) szoftverek segítségével végeztük (Vámos et al., 2014).

3.8. A PAC1, VPAC1, VPAC2 receptorok mRNS-ének kimutatása

A PACAP receptorainak előfordulását az arteria carotis communis és arteria femoralis erekből RT-PCR segítségével mutattuk ki. Az ereket folyékony nitrogénbe helyeztük, majd fagyasztva porítást követően Trizolban inkubáltuk (Applied Biosystems, Foster City, CA, Amerikai Egyesült Államok). Ezt követően a mintákhoz 20%(V/V) RNáz-mentes kloroformot adtunk, majd 4°C-on 10.000g-vel 15 percig centrifugáltuk. Ezután a mintákat 500 µl RNáz mentes izopropanolban inkubáltuk -20°C-on 1 órán keresztül, majd totál RNS-t izoláltunk és RNáz mentes vízben tároltuk -20°C-on. A reverz transzkripció munkaidőjét 2 µg RNS-t, 0,112 µM oligo(dT)-t, 0,5 mM dNTP-t és 200 egységnyi reverz transzkriptázt (Applied Biosystems) tartalmazott reverz transzkriptáz pufferben oldva. A PCR reakciót Labnet MultiGene™ 96-well Gradient Thermal Cycler-ben végeztük (Labnet International, Edison, NJ, Amerikai Egyesült Államok) 21 µl-nyi végtérfogatban, amely 1 µl-nyi sense és antisense primert (0,4 µM), 0,5 µl dNTP-t (200 µM) és 5 egység Promega GoTaq® DNS-polimerázt tartalmazott. A kezdeti denaturálás 2 percig 95°C-on történt, majd 35 ciklus következett (denaturálás 94°C, 1 perc; anelláció a 3.8. táblázatban megadott hőmérsékleten, 1 perc; DNS-szintézis, 72°C, 90 mp), lezárásként DNS-szintézis történt 72°C-on 10 percig. A PCR reakció termékeit etídium-bromidot tartalmazó 1,2%-os agaróz-gélben 120 V konstans feszültségen futtattuk, belső kontrollnak aktint használtunk. A géleképeket FluorChem E segítségével analizáltuk (ProteinSimple, San Jose, CA, Amerikai Egyesült Államok), majd a kapott jelek optikai denzitását ImageJ 1.40g programmal hasonlítottuk össze, a belső kontroll optikai denzitására normalizálva.

Gén	Primer	Nukleotid-szekvencia (5'-3')	Primerkötési hőmérséklet, °C	Amplifikációs termék mérete, bp
Aktin	sense	GCC AAC CGT GAA AAG ATG A (419 – 437)	54	462
	antisense	CAA GAA GGA AGG CTG GAA AA (861–880)		
PAC1	sense	TAT TAC TAC CTG TCG GTG AAG (912 – 932)	49	213
	antisense	ATG ACT GCT GTC CTG CTC (1107 – 1124)		
VPAC1	sense	TTT GAG GAT TTC GGG TGC (974 – 991)	52	266
	antisense	TGG GCC TTA AAG TTG TCG (1222 – 1239)		
VPAC2	sense	CTC CTG GTA GCC ATC CTT (805 – 822)	48	149
	antisense	ATG CTG TGG TCG TTT GTG (936 – 953)		

3.8. táblázat: A kísérletben használt primerek szekvenciái, az anelláció hőmérséklete és az amplifikációs termékek mérete.

3.9. A PAC1, VPAC1, VPAC2 receptorfehérjék Western-blot analízise

A vizsgálatot arteria carotis communis és arteria femoralis erekből végeztük, minden esetben háromszor ismételtük meg, csoportonként 3 állattal. Az izolált CA és FA fiziológias sóoldattal való átmosást követően 100 µl radio-immunoprecipitációs pufferbe került (150 mM NaCl, 1,0% NP40, 0,5% Na-deoxykolát, 50 mM Tris, pH 8,0), amely proteáz inhibitor (Aprotinin, 10 µg/mL), benzamidint (5 mM), leupeptint (10 µg/mL), tripszin-inhibitor (10 µg/mL), PMSF-t (1 mM), EDTA-t (5 mM), EGTA-t (1 mM), Na-fluoridot (8 mM) és Na-ortovanadátot (1 mM) tartalmazott. A mintákat a feldolgozásig -70°C-on tároltuk. A teljes artériafalat tartalmazó minták feldolgozásakor mechanikus aprítást követően a keletkezett szuszpenziót 30 mp-ig szonikáltuk (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, Amerikai Egyesült Államok). Az SDS-PAGE-hez való előkészítés során a mintákhoz Laemmli elektroforézis puffert adtunk (4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 20% glicerin, 0,004% bromofenol-kék, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8), amivel a minták fehérje-koncentrációját kiegyenlítettük, majd mintáinkat 10 percig forraltuk.

Mintánként 20 µg fehérjét szeparáltunk 10%-os SDS-PAGE gélen, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A blokkolás 5%-os PBST-ben (PBS 0,1% Tween 20-al, pH 7,4) oldott zsírintes tejpórral történt, majd a membránok mosása után az elsődleges antitesteket tartalmazó oldatot vittük fel rájuk, amely 4°C-on a

membránokon maradt másnapig. A PAC1 receptor ellenes poliklonális antitestet 1:600 (Sigma-Aldrich), a poliklonális VPAC1 receptor ellenes antitestet 1:800 (Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael) és a poliklonális VPAC2 receptor ellenes antitestet 1:600 hígításban használtunk (Abcam, Cambridge, UK). Másnap 3x10 perces PBST mosást követően anti-nyúl IgG szekunder antitestet használtunk 1:1500 hígításban (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Amerikai Egyesült Államok) 1%-os zsírmentes tejpor blokkolás mellett két óráig szobahőmérsékleten. A hívást chemilumineszcens hívófolyadékkal végeztük a gyártó utasításainak megfelelően (Advansta Inc., Menlo Park, CA, Amerikai Egyesült Államok). Belső kontrollnak aktint használtunk. A jelek optikai denzitását ImageJ 1.40 g szoftverrel detektáltuk, és a belső kontroll denzitására normalizáltuk.

3.10. Statisztika

Az értékeket mindenhol átlag \pm SEM formában adtuk meg. A c-Fos immunfestés esetében kétutas ANOVA-t végeztünk Bonferroni-féle post-hoc analízissel. A Notch jelátviteli út molekuláinak vizsgálatokor egyutas ANOVA-t végeztünk (kivétel Jagged1), Fisher-féle post-hoc analízissel. A vazorelaxációs mérések esetében kétutas ANOVA-t végeztünk Tukey-féle post-hoc analízissel. A minták szóráshomogenitását Bartlett's kh-négyzet próbával, normáeloszlását pedig Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük. A Nissl-festés, a Jagged1 Notch ligand, a PAC1 receptor festés, a erekben a RT-PCR és a Western-blot esetében kétmintás t-próbát végeztünk. A szignifikancia szint 0,05 volt minden mérés esetében. A statisztikai analízishez Statistica v8.0 (StatSoft Inc., Amerikai Egyesült Államok), Prism 6.1 (GraphPad Software, Amerikai Egyesült Államok), Sigma Plot 12.5 (Systat, Chicago, IL, Amerikai Egyesült Államok) és Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Amerikai Egyesült Államok) programokat használtunk.

IV. Eredmények

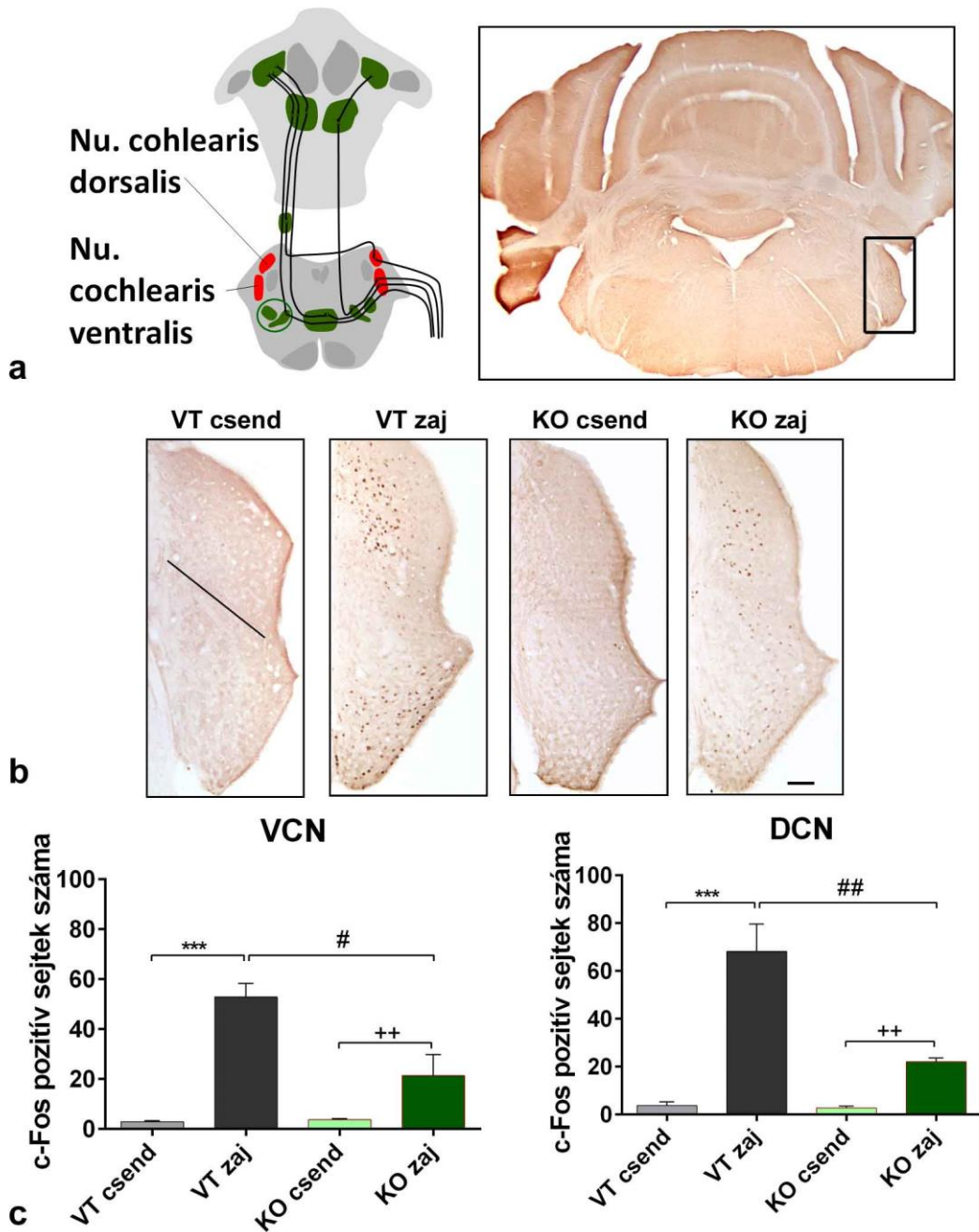
4.1. A hallórendszer funkcionális vizsgálata ABR módszerrel

A Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetével kollaborációban elvégzett vizsgálatokat Humli Viktória társelsőszerző végezte dr. Zelles Tibor halláslaborjában, így azok metodikájának és eredményeinek részletes tárgyalása nem képezi jelen dolgozat részét. Ezen eredmények azonban elengedhetetlenek a morfológiai vizsgálatok értelmezéséhez, ezért azokat a megbeszélésben röviden ismertetem.

4.2. Idegsejtaktiváció mérése a hallópálya magjaiban – c-Fos immunfestés

4.2.1. Cochlearis magok

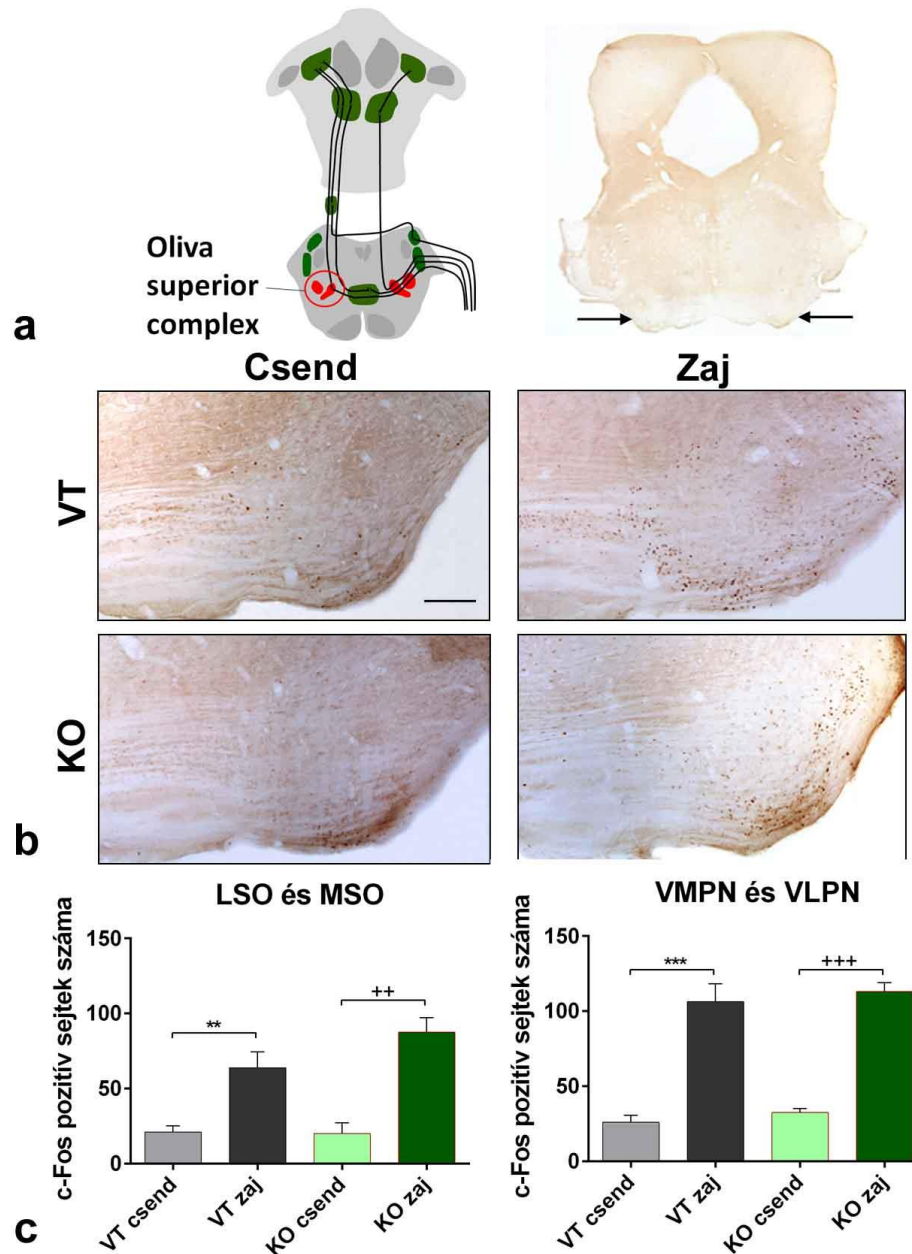
Mind a vad, mind pedig a KO csendben tartott állatok („csend”) esetében a nucleus cochlearis ventralis területén elvértve találtunk c-Fos expresszáló sejteket. A fehér zajnak kitett állatok („zaj”) esetében szignifikánsan emelkedett a c-Fos pozitív sejtek száma, mind a vad ($p < 0,0001$), mind pedig a KO állatok esetében ($p = 0,0012$). Az emelkedés szignifikánsan kisebb mértékű volt a KO állatokban, mint a vad állatok esetében ($p = 0,0214$). A nucleus cochlearis dorsalis területén hasonló eredményeket találtunk. A csendben tartott állatoknál minimális számú sejt aktiválódott ezen mag területén mindegyik genotípusban, azonban zaj hatására az aktiválódott sejtek száma szignifikánsan megemelkedett (vad: $p < 0,0001$; KO: $p = 0,0042$). A KO egerekben a vadhoz képest szignifikánsan kevesebb sejt aktiválódott ($P = 0,0012$) (4.2.1. ábra).



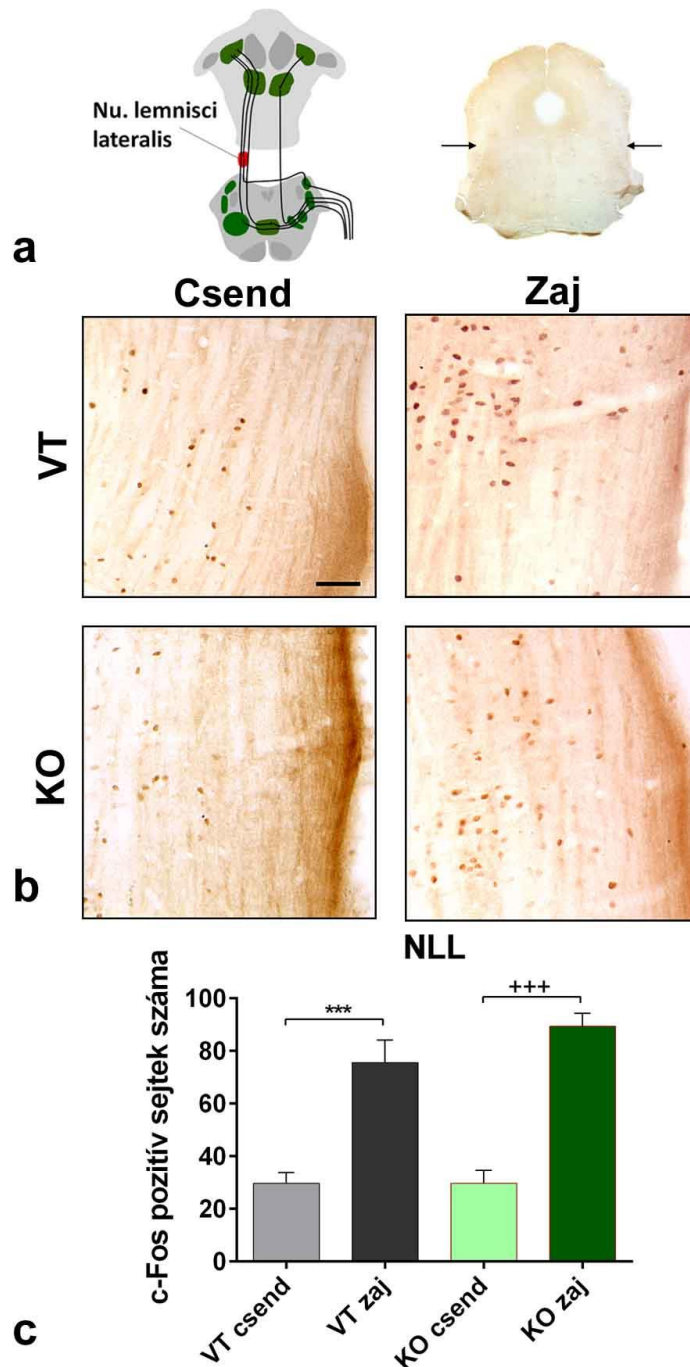
4.2.1. ábra: A cochlearis magokban található c-Fos pozitív sejtek száma csendben tartott (csend), és fél órás zajnak kitett (zaj) vad (VT) és KO egerekben. a) Bal oldalon a hallópálya sémás ábrája, jobb oldalon a VCN és DCN kis nagyítású képe látható. A VCN-t és DCN-t pirossal, illetve fekete téglalappal jelöltük. b) Reprezentatív képek. Ferde vonal: a VCN (balra lent) és DCN (jobbra fent) közötti határ. Aránymérték: 100 μ m. c) A c-Fos pozitív sejtek száma a VCN és DCN területén. Átlag \pm SEM. Kétutas ANOVA, Bonferroni post-hoc analízis, *** $p < 0,0001$ vs. VT csend, ++ $p < 0,001$ vs. KO csend, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. VT zaj. VCN: nucleus cochlearis ventralis; DCN: nucleus cochlearis dorsalis.

4.2.2. *A hallópálya centrális átkapcsoló állomásai*

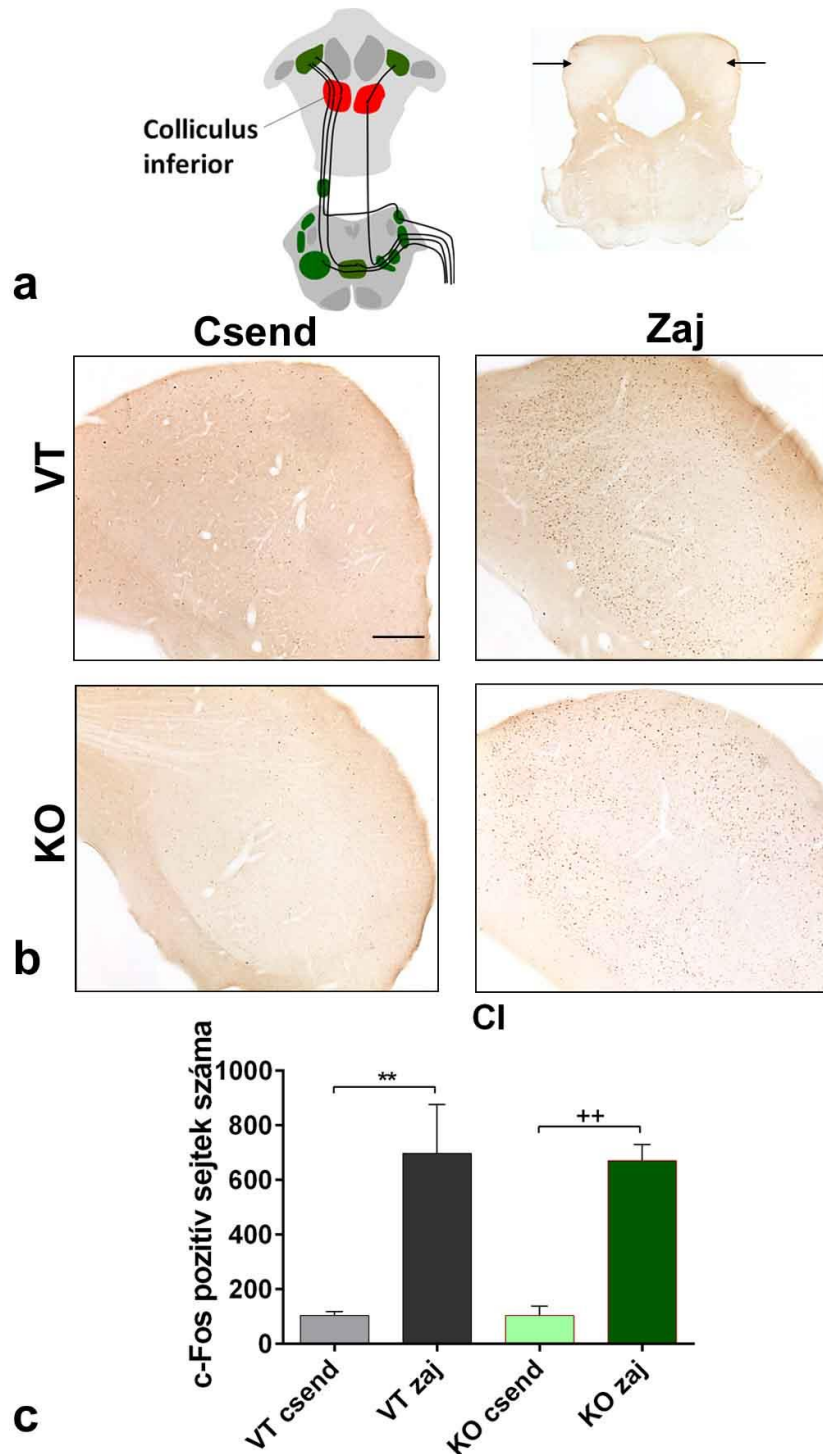
A hallópálya centrálisabb magjaiban is vizsgáltuk a c-Fos pozitív sejtek számát vad típusú és KO egerekben. Az oliva superior (SOC) területét két részre osztottuk, és sejtszámolást végeztünk egyrészt az MSO-LSO (oliva superior nucleus medialis - nucleus lateralis) területén, valamint a periolivaris magok közül a ventromedialis és ventrolateralis paraolivaris magok (VMPN, VLPN) területén. Mindkét esetben azt találtuk, hogy ezekben a magokban már a csendben tartott állatok esetében is láthatunk c-Fos pozitív sejteket, genotípustól függetlenül. Ezen sejtek száma szignifikánsan megemelkedik zaj hatására (MSO-LSO: VT $p=0,0096$, KO $p=0,0033$; VMPN-VLPN: VT $p<0,0001$, KO $p=0,0007$), azonban a zajjal kezelt vad és KO egerek között nincs különbség a sejtaktivációban (4.2.2.1. ábra). A nuclei lemnisci lateralis (NLL) területén és a colliculus inferiorban (CI) is hasonló eredményeket kaptunk. Már a csendben tartott állatoknál is sejtaktivációt figyelhettünk meg, amely zaj hatására mind a vad mind a KO egerek esetében szignifikánsan megemelkedik (NLL: VT $p<0,0001$, KO $p<0,0001$; IC: VT $p=0,0019$; KO $p=0,0038$), azonban nincsen különbség a vad és a KO egerek c-Fos pozitív sejtjeinek száma között (4.2.2.2. és 4.2.2.3 ábra). A primér hallókéreg területén nagymértékű sejtaktivációt találtunk már a csendben tartott állatok esetében is, amely c-Fos pozitív sejtek száma zaj hatására tovább nőtt, azonban ez az emelkedés nem volt szignifikáns. Ezen a területen sem volt különbség a vad és KO egerek között (4.2.2.4. ábra).



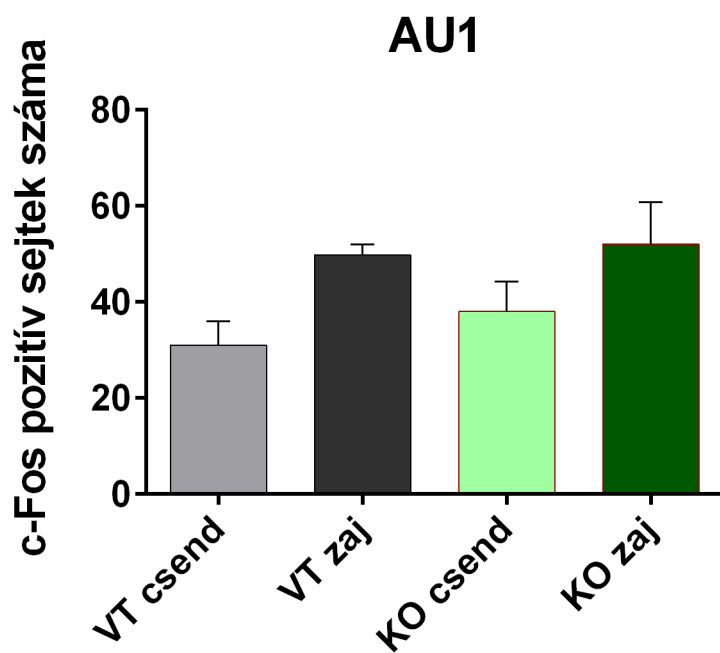
4.2.2.1. ábra: Az oliva superiorban (SOC) található c-Fos pozitív sejtek száma csendben tartott (csend), és fél órás zajnak kitett (zaj) vad (VT) és KO egerekben. a) Bal oldalon a hallópálya sémás ábrája, jobb oldalon az SOC kis nagyítású képe látható. Az SOC-t pirossal, illetve fekete nyilakkal jelöltük. b) Reprezentatív képek. Aránymérték: 200 μ m. c) A c-Fos pozitív sejtek száma az SOC-ban. Átlag \pm SEM. Kétutas ANOVA, Bonferroni post-hoc analízis, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ vs. VT csend, ++ $p < 0,001$, +++ $p < 0,0001$ vs. KO csend. MSO: oliva superior medialis, LSO: oliva superior lateralis, VMPN: nucleus periolivaris ventromedialis, VLPN: nucleus periolivaris ventrolateralis.



4.2.2.2. ábra: Az NLL magjaiban található c-Fos pozitív sejtek száma csendben tartott (csend), és fél óras zajnak kitett (zaj) vad (VT) és KO egerekben. a) Bal oldalon a hallópálya sémás ábrája, jobb oldalon az NLL kis nagyítású képe látható. A NLL-t pirossal, illetve fekete nyilakkal jelöltük. b) Reprezentatív képek az NLL dorsalis részéből. Aránymérték: 100 μ m. c) A c-Fos pozitív sejtek száma az NLL területén. Átlag \pm SEM. Kétutas ANOVA, Bonferroni post-hoc analízis, *** $p < 0,0001$ vs. VT csend, +++ $p < 0,0001$ vs. KO csend. NLL: nuclei lemnisci lateralis.



4.2.2.3. ábra: A CI-ben található c-Fos pozitív sejtek száma csendben tartott (csend), és fél órás zajnak kitett (zaj) vad (VT) és KO egerekben. a) Bal oldalon a hallópálya sémás ábrája, jobb oldalon a CI kis nagyítású képe látható. A CI-t pirossal, illetve fekete nyilakkal jelöltük. b) Reprezentatív képek. Aránymérték: 500 μ m. c) A c-Fos pozitív sejtek száma a CI-ban. Átlag \pm SEM. Kétutas ANOVA, Bonferroni post-hoc analízis, ** $p < 0,001$ vs. VT csend, ⁺⁺ $p < 0,001$ vs. KO csend. CI: colliculus inferior.

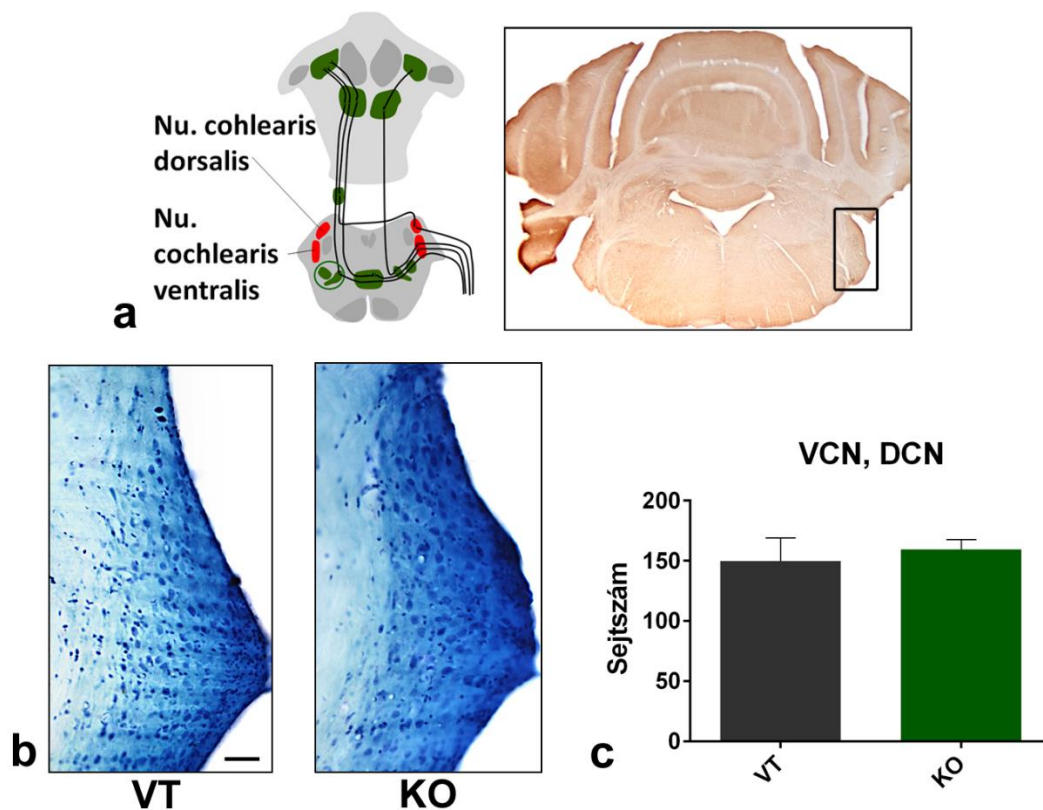


Mag	VT csend	VT zaj	KO csend	KO zaj
AU1	31,06±4,90	49,85±2,15	38,00±6,21	52,09±8,78

4.2.2.4. ábra: A primér hallókéregben található c-Fos pozitív sejtek száma csendben tartott (csend), és fél óras zajnak kitett (zaj) vad (VT) és KO egerek esetében. Átlag ± SEM. Kétutas ANOVA, Bonferroni post-hoc analízis. AU1: primér hallókéreg.

4.3. Idegsejt számolás a cochlearis magok területén – Nissl-festés

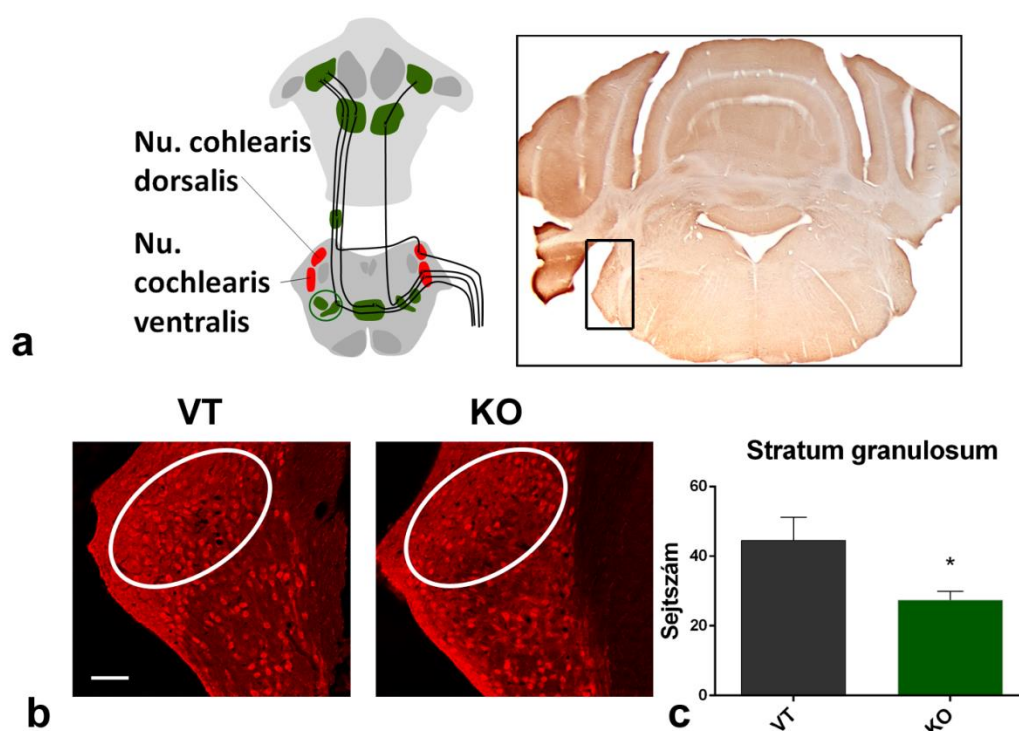
A VCN és DCN területén eltérő c-Fos sejtaktivációs marker immunpozitivitást találtunk. Annak felderítésére, hogy ennek háttérében az idegsejtek pusztulása vagy pedig a csökkent aktivációja áll-e, ezen magokban Nissl-festést végeztünk. A definitív nucleolus alapján egyértelműen idegsejtként azonosítható sejtek számát lemértük. Az eltérő sejtaktivációs mintázattal szemben nem volt különbség a VCN-DCN területén található idegsejtek számában a vad típusú és KO egerek között (VT=149,88±18,99 és KO=159,50±8,00) (4.3. ábra).



4.3. ábra: A cochlearis magok területén található idegsejtek száma Nissl-festéssel vad (VT) és KO egerekben. a) Bal oldalon a hallópálya sémás ábrája, jobb oldalon a cochlearis magok kis nagyítású képe látható. A VCN-t és DCN-t pirossal, illetve fekete téglalappal jelöltük. b) Reprezentatív képek. Aránymérték: 100 μ m. c) Az idegsejtek száma a cochlearis magok területén. Átlag \pm SEM. Kétmintás t-próba.

4.4. PAC1 receptor immunfestés a hallópálya magjaiban

A cochlearis magvakban a PAC1 receptor immunfestését is elvégeztük. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a VCN és a DCN között elhelyezkedő stratum granulosum területén a KO egerekben a PAC1 receptort expresszáló sejtek száma csökken vad társaikhoz képest ($p=0,0314$) (4.4. ábra). A VCN többi magjában, a DCN területén, illetve a hallópálya centrálisabb magjaiban (SOC, NLL, IC) nem találtunk különbséget a vad és KO egerek között. A sejtek denzitásában egyik magban sem volt különbség a két csoport között.

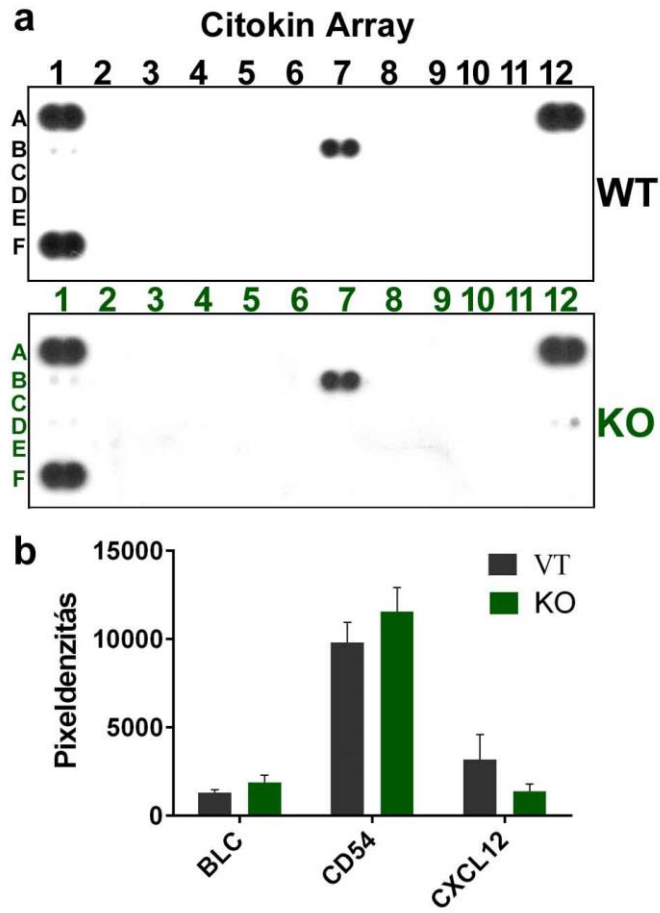


Mag	VT sejtszám	KO sejtszám	VT denzitás	KO denzitás
Stratum granulosum	44,52±6,65	27,48±1,22*	11,8±1,21	10,66±0,56

4.4. ábra: A cochlearis magokban található PAC1 receptor immunpozitív sejtek száma, és a PAC1 receptor citoplazmatikus denzitása vad (VT) és KO egerekben. a) Bal oldalon a hallópálya sémás ábrája, jobb oldalon a VCN és DCN kis nagyítású képe látható. A VCN-t és DCN-t pirossal, illetve fekete téglalappal jelöltük. b) Reprezentatív képek a stratum granulosum területéről. c) A PAC1 receptor pozitív idegsejtek száma a stratum granulosum területén. Táblázat: Sejtszám és PAC1 receptor denzitás. Átlag ± SEM. Kétfoldos t-próba, * $p < 0,05$ vs. VT sejtszám. VCN: nucleus cochlearis ventralis; DCN: nucleus cochlearis dorsalis. Aránymérték: 100 μ m.

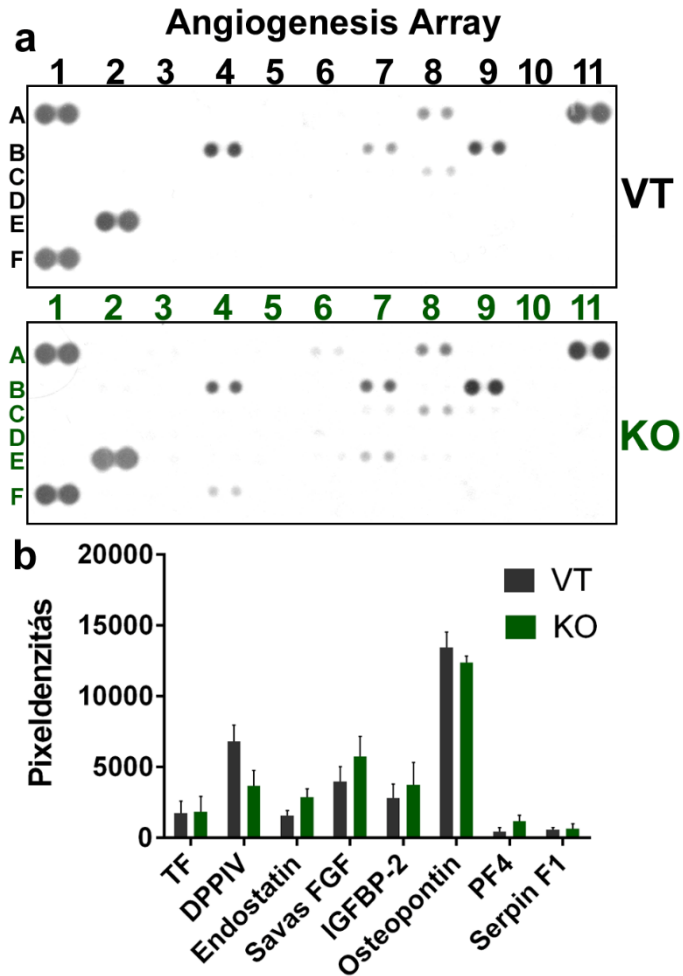
4.5. Fehérjeprofil analízis belső fül ductus cochlearisából

A funkcionális és morfológiai elváltozások molekuláris mechanizmusainak tisztázására vad típusú és KO egerek belső füléből izoláltuk a ductus cochlearist, és ezen ductus cochlearisok lizátumából fehérjeprofil analízist végeztünk az R&D Systems citokin és angiogenesis array kitjeinek felhasználásával (Mouse Cytokine Array Panel A és Mouse Angiogenesis Array Kit). A két kit segítségével 93 fehérje jelenlétét lehet kimutatni a mintákból. Méréseink során ezek közül az endostatin, a savas FGF, az osteopontin, a BLC, a CD54, a PF4, a TF, a DPPIV, az IGFBP-2, a Serpin F1 és a CXCL12 fehérjéket detektáltuk. Az ezen fehérjéknek megfelelő lokalizációban megjelenő pontok intenzitását összehasonlítottuk a vad és KO egerek között, de egyik fehérje esetében sem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között (4.5.1. és 4.5.2. ábra).



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Pos. ctrl											Pos. ctrl
B	BLC	C5a	G-CSF	GM-CSF	CCL1	Eotaxin	CD54	IFN γ	IL-1 α	IL-1 β	IL-1ra	IL-2
C	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-10	IL-12	IL-13	IL-16	IL-17	IL-23	IL-27
D	CXCL10	CXCL11	CXCL1	M-CSF	CCL2	CCL12	CXCL9	CCL3	CCL4	CXCL2	CCL5	CXCL12
E	CCL17	TIMP-1	TNF α	TREM-1								
F	Pos. ctrl											Neg. ctrl

4.5.1. ábra: A vad (VT) és KO egerek ductus cochlearisának lízátumában R&D Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Panel A segítségével detektált citokinek. Reprezentatív képek (a). A detektálható mennyiségű fehérjéknek megfelelő körök pixelenzitása (b). Nem volt szignifikáns különbség egyik mért protein esetében sem. A táblázat a panelen vizsgálható összes fehérjét tartalmazza. Vastaggal emeltük ki azokat a fehérjéket, amiket a mintákban detektáltunk. A táblázatban a gyártó által használt rövidítéseket alkalmaztuk. Átlag \pm SEM. Kétmintás t-próba.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	Pos. ctrl		ADAMTS1	AR	ANG	Ang-1	Ang-3	TF	CXCL16		Pos. ctrl
B		Cyr6	DLL4	DPPIV	EGF	CD105	Endostatin	ET-1	Savas FGF	FGF basic	
C		KGF	CX3CL1	GM-CSF	HB-EGF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IL-1 α	IL-1 β
D		IL-10	IP-10	KC	Leptin	CCL2	CCL3	MMP-3	MMP-8	MMP-9	NOV
E		Osteopontin	PD-ECGF	PDGF-AA	PDGF-AB	PTX3	PF4	PIGF-2	PRL	Proliferin	
F	Pos. ctrl	SDF-1	Serpin E1	Serpin F1	TSP-2	TIMP-1	TIMP-4	VEGF	VEGF-B	Neg. ctrl	

4.5.2. ábra: A vad (VT) és KO egerek ductus cochlearisának lizátumában R&D Proteome Profiler Mouse Angiogenesis Array kit segítségével detektált fehérjék. Reprezentatív képek (a). A detektálható mennyiségű fehérjéknek megfelelő körök pixeldenzitása (b). Nem volt szignifikáns különbség egyik mért protein esetében sem. A táblázat a panelen vizsgálható összes fehérjét tartalmazza. Vastaggal emeltük ki azokat a fehérjéket, amiket a mintákban detektáltunk. A táblázatban a gyártó által használt rövidítéseket alkalmaztuk. Átlag \pm SEM. Kétmintás t-próba.

4.6. A Notch jelátviteli útvonal változásai PACAP KO egerek fogaiban

4.6.1. A Notch receptorok vad, HZ és KO egerek őrlőfogában

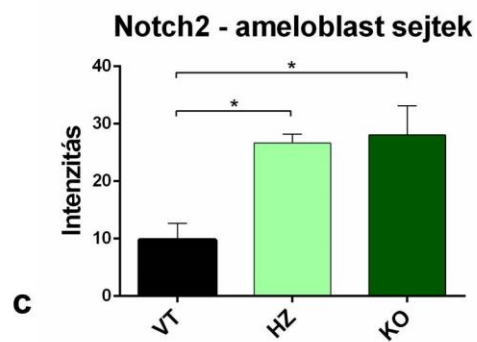
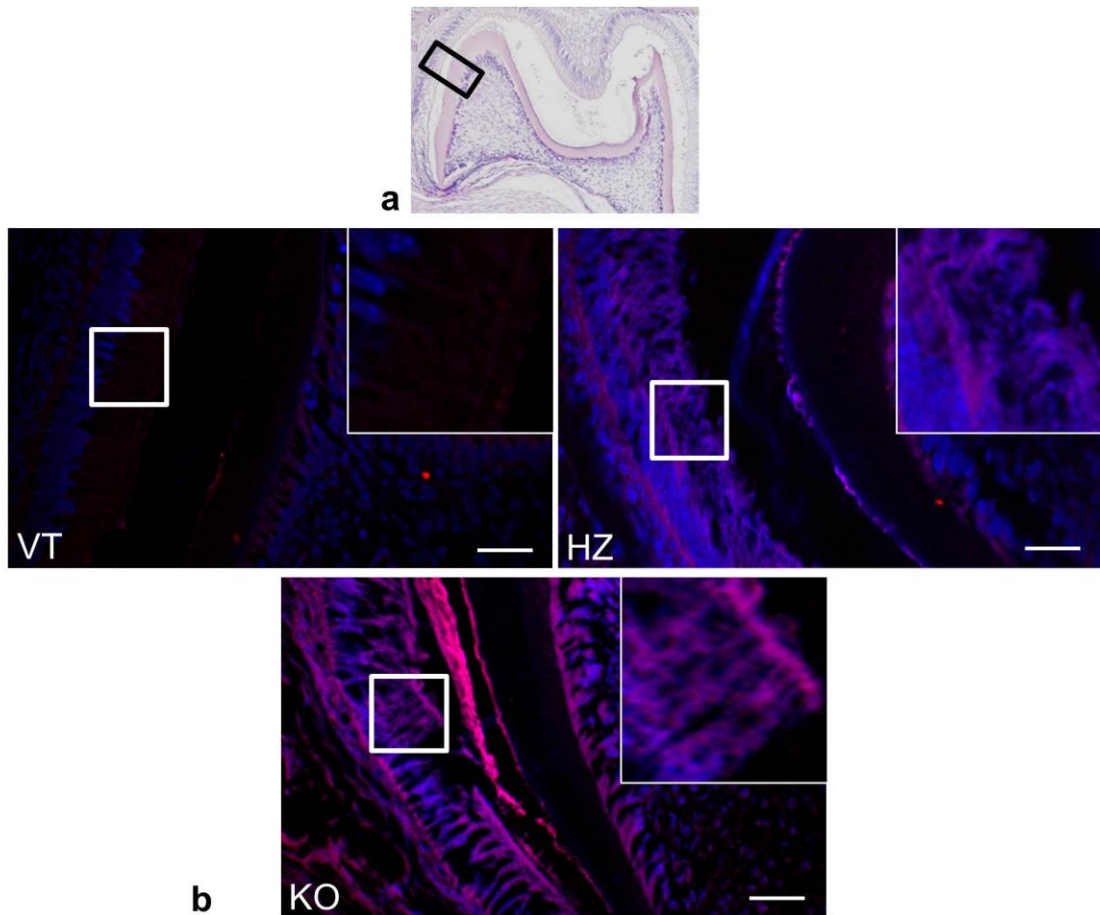
A Notch receptorok közül (Notch1, 2, 3, 4) a Notch2 immunpozitivitása változott szignifikánsan a zománcot termelő ameloblast sejtekben (4.6.1. ábra). Mind a HZ, mind pedig a KO állatokban szignifikánsan emelkedett a Notch2 receptor intenzitása a vad egerekhez képest (HZ vs. VT: $p=0,014$, KO vs. VT: $p=0,01$), míg az odontoblastok területén nem találtunk szignifikáns különbséget. Hasonló tendenciát találtunk ameloblast sejtekben a Notch1 és Notch3 receptor esetében, valamint az odontoblast sejtekben a Notch1 és Notch2 esetében, azonban jelen esetszámnál a különbség nem volt szignifikáns. Nem találtunk különbséget az odontoblast sejtekben a Notch3 esetén, illetve egyik sejtben sem a Notch4 vizsgálata során.

4.6.2. A Notch ligandok vad, HZ és KO egerek őrlőfogában

A Notch ligandok (DLL1, 3, 4 és Jagged1, 2) immunpozitivitása az alábbiak szerint változott PACAP hiányában. Az ameloblastok citoplazmájában a DLL1 szintje HZ állatokban szignifikánsan megemelkedett a vad állatokhoz képest ($p=0,021$), a KO állatokban pedig további jelintenzitás-növekedést találtunk ($p=0,0014$ vs. VT, $p=0,0455$ vs. HZ) (4.6.2.1. ábra). A DLL1 mennyisége az odontoblastokban, illetve a DLL3 és 4 kifejeződése egyik sejtben sem mutatott különbséget a PACAP hiányában a vad állatokhoz képest. A Jagged típusú ligandok közül a Jagged1 jelölődése nőtt meg PACAP KO állatokban az odontoblast sejtekben ($p=0,0129$) (4.6.2.2. ábra). A Jagged1 pozitívítás az ameloblast sejtekben nem változott, amint a Jagged2 intenzitásában sem találtunk különbséget egyik sejt esetében sem.

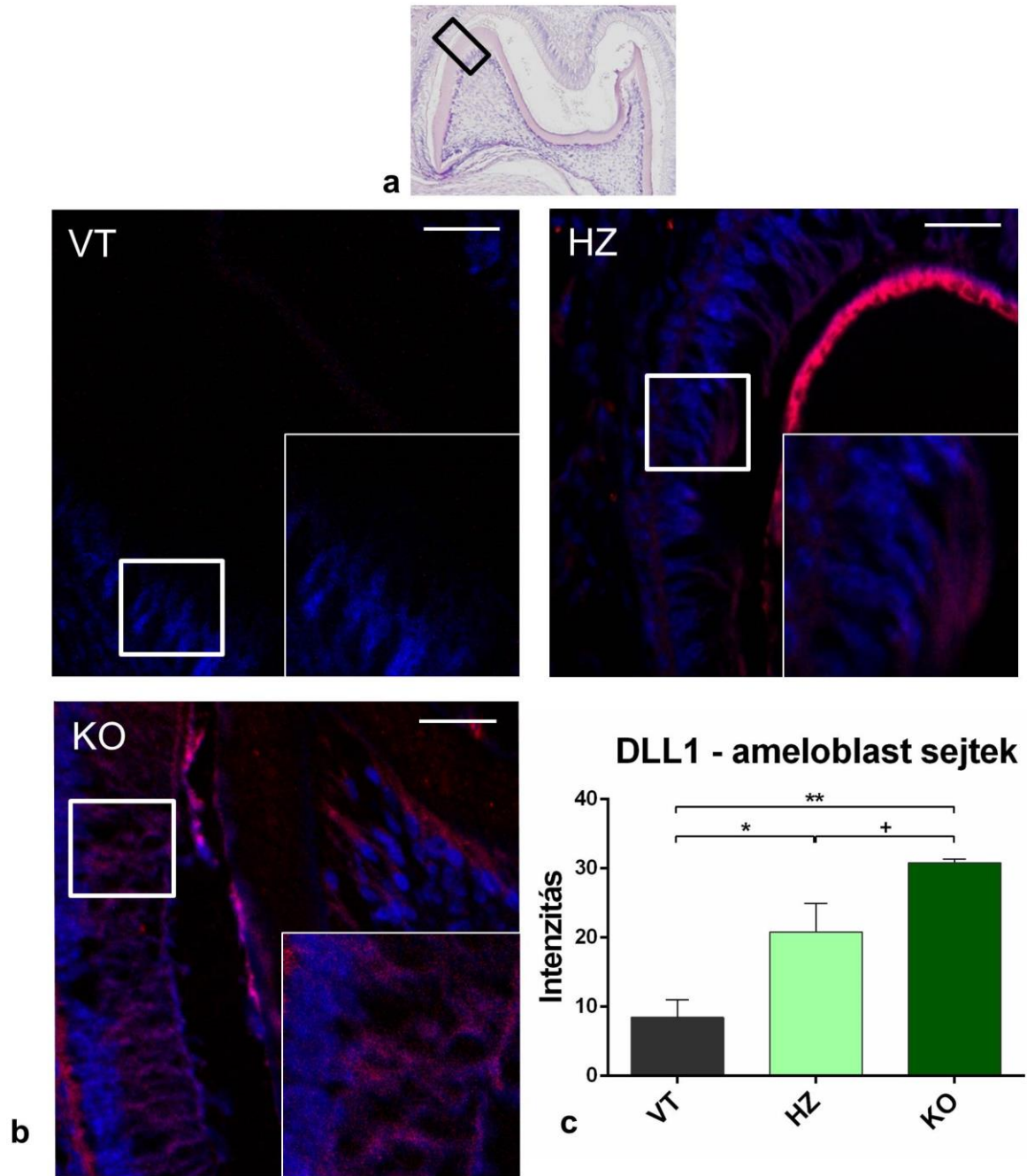
4.6.3. A Notch intracelluláris elemei vad, HZ és KO egerek őrlőfogában

A Notch jelátvitelben részt vevő intracelluláris molekulák közül (CSL, Numb, TACE) a CSL immunjelölődése változott meg PACAP-génkiütött egerekben (4.6.3. ábra). A CSL jelintenzitása szignifikánsan megnőtt HZ és KO állatokban a vad kontrollokhöz képest mind az ameloblast (HZ vs. VT: $p=0,0047$, KO vs. VT: $p=0,0286$), mind az odontoblast sejtek esetében (HZ vs. VT: $p=0,0064$, KO vs. VT: $p=0,0027$). Kísérletünkben a TACE és a Numb fehérjék mennyisége nem mutatott változást PACAP hiányában.



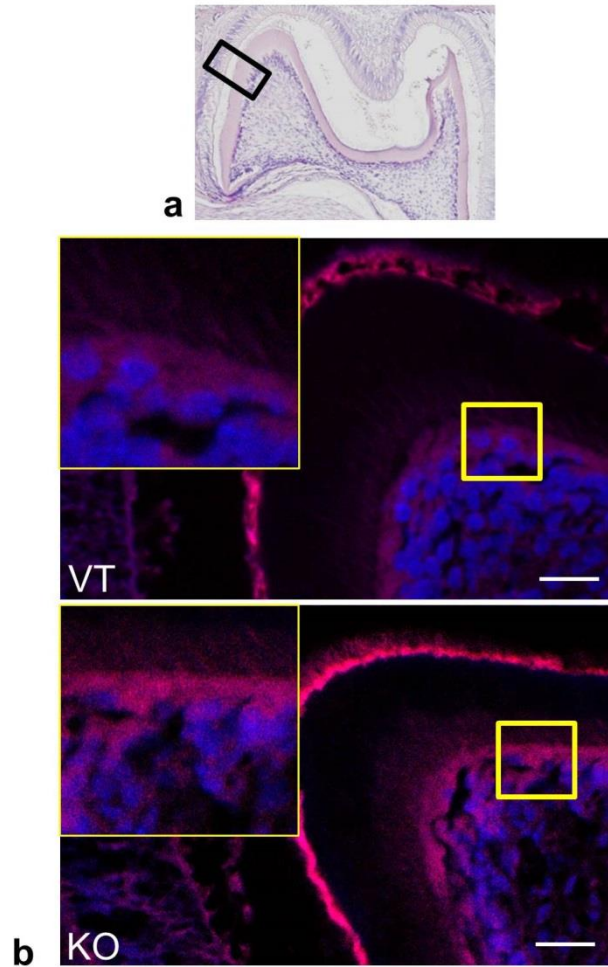
Receptor intenzitás	VT	PACAP HZ	PACAP KO
Notch2	9,78 ± 2,91	26,67 ± 1,52*	28,05 ± 5,07*

4.6.1. ábra: A Notch2 receptor immunhisztokémiai jelölése ameloblast sejteken Alexa Fluor555-el (piros) 5 napos vad (VT), PACAP HZ és PACAP KO egerek molaris fogaiban. A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). a) Kis nagyítású HE festett ábra, a vizsgált területet fekete téglalappal jelöltük. b) Reprezentatív képek. Aránymérték: 50 μ m. c) A Notch2 intenzitása az ameloblast sejtekben. A Notch2 receptor immunpozitivitása a PACAP HZ és KO egerek ameloblast sejtjeiben szignifikánsan emelkedett volt a vad típusú egerekhez képest. Átlag \pm SEM. Egyutas ANOVA, Fisher-féle post-hoc analízissel, * $p < 0,05$ vs. VT.

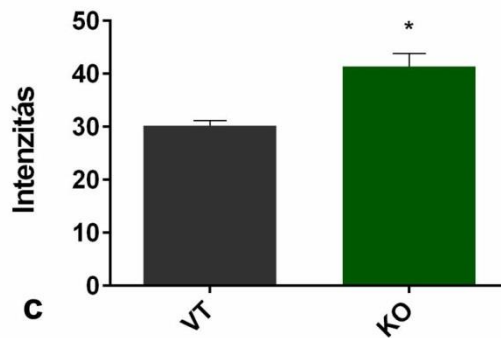


Ligand intenzitás	VT	PACAP HZ	PACAP KO
DLL1 - ameloblast	8,46 ± 2,52	20,81 ± 4,14*	30,81 ± 0,49***+

4.6.2.1. ábra: A DLL1 ligand immunhisztokémiai jelölése ameloblast sejteken Alexa Fluor555-el (piros) 5 napos vad (VT), PACAP HZ és PACAP KO egerek molaris fogaiban. A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). a) Kis nagyítású HE festett ábra, a vizsgált területet fekete téglalappal jelöltük. b) Reprezentatív képek. Aránymérték: 50 μ m. c) A DLL1 intenzitása az ameloblast sejtekben. A DLL ligand mennyisége a PACAP HZ és KO egerek ameloblast sejteiben szignifikánsan emelkedett volt a vad típusú egerekhez képest. Átlag \pm SEM. Egyutas ANOVA, Fisher-féle post-hoc analízissel, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. VT; + $p < 0,05$ vs. HZ.

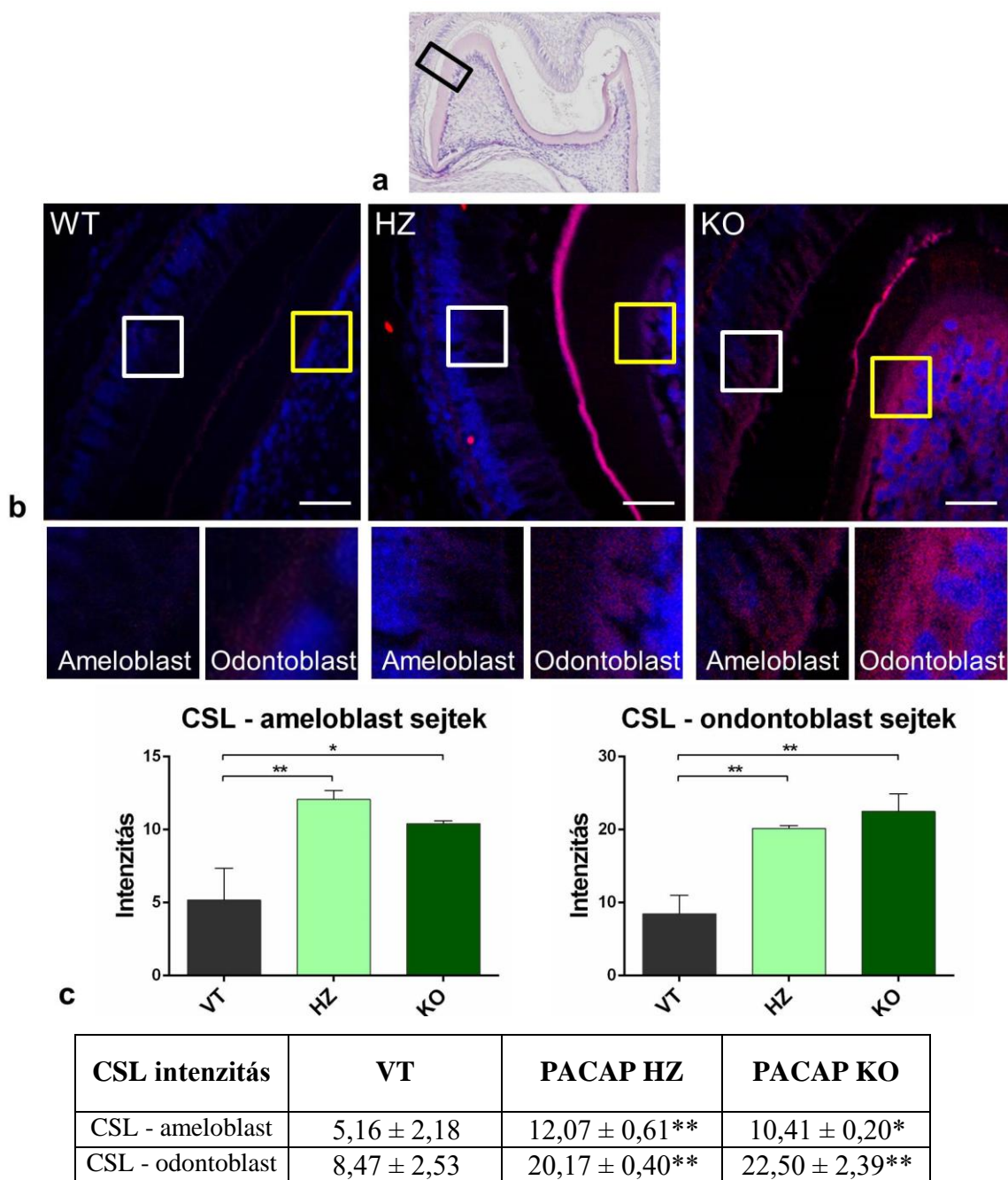


Jagged1 - odontoblast sejtek



Ligand intenzitás	VT	PACAP KO
Jagged1 - odontoblast	30,17 ± 1,01	41,39 ± 2,42*

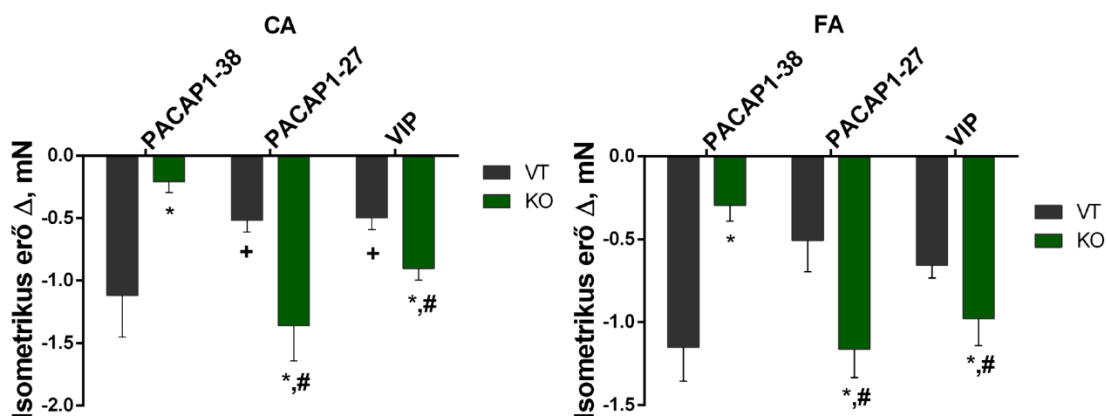
4.6.2.2. ábra: A Jagged1 ligand immunhisztokémiai jelölése odontoblast sejteken Alexa Fluor555-el (piros) 5 napos vad (VT) és PACAP KO egerek molaris fogaiban. A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). a) Kis nagyítású HE festett ábra, a vizsgált területet fekete téglalappal jelöltük. b) Reprezentatív képek. Aránymérték: 50 μ m. c) A Jagged1 intenzitása az odontoblast sejtekben. A Jagged1 ligand mennyisége a PACAP KO egerek odontoblast sejteiben szignifikánsan emelkedett volt a vad típusú egerekhez képest. Átlag \pm SEM. Kétmintás t-próba, * $p < 0,05$ vs. VT.



4.6.3. ábra: A Notch intracelluláris célpontjának, a CSL-nek immunhisztokémiai jelölése ameloblast és odontoblast sejteken Alexa Fluor555-el (piros) 5 napos vad (VT), PACAP HZ és PACAP KO egerek molaris fogaiban. A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). a) Kis nagyítású HE festett ábra, a vizsgált területet fekete téglalappal jelöltük. b) Reprerentatív képek. Az ameloblastokat fehér, az odontoblastokat sárga négyzettel jelöltük. Aránymérték: 50 μ m. c) A CSL intenzitása az ameloblast és odontoblast sejtekben. A CSL jelölődés a PACAP HZ és KO egerek ameloblast és odontoblast sejteiben szignifikánsan emelkedett volt a vad típusú egerekhez képest. Átlag \pm SEM. Egyutas ANOVA, Fisher-féle post-hoc analízissel, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. VT.

4.7. A PACAP1-38, PACAP1-27, VIP vazorelaxációs hatása vad és KO egerekben

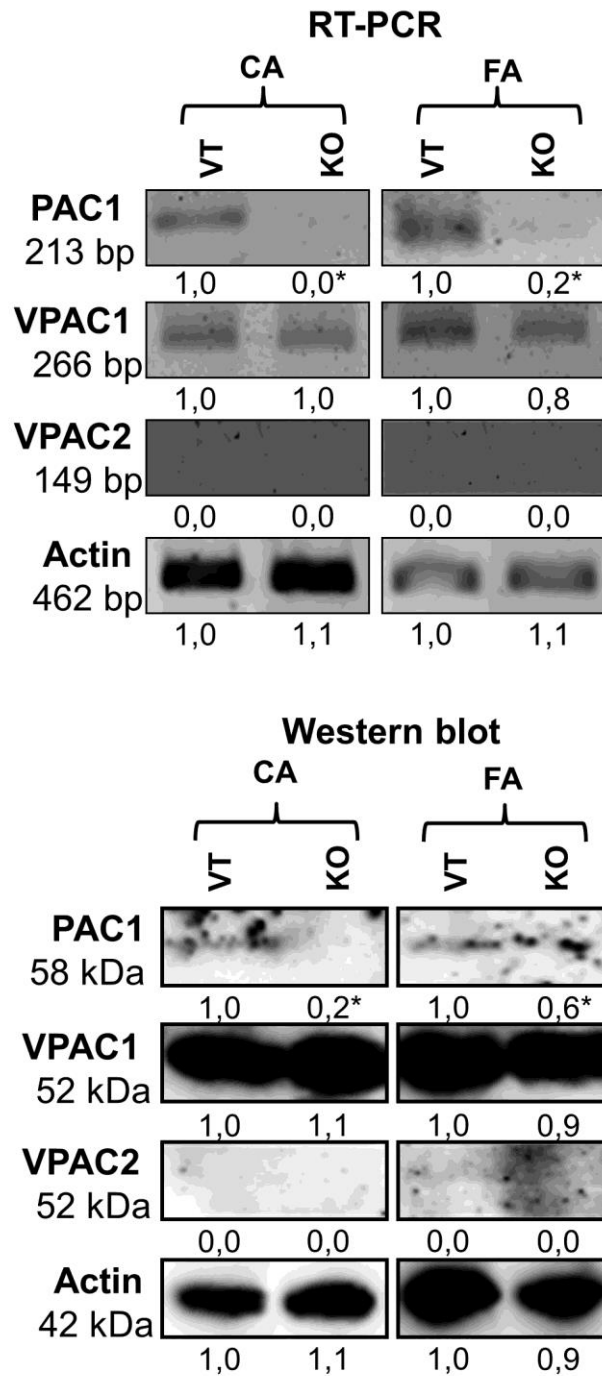
A KCl-dal kiváltott maximális kontrakciót a PACAP1-38, PACAP1-27 és a VIP a vad és KO állatokban eltérő módon befolyásolta. A maximális kontrakció értékét „0”-nak vettük, és ehhez képest negatív értékekkel jelöltük a vizsgált molekulák által elért vazorelaxációs hatást. A vizsgálat folyamán 10^{-9} - 10^{-6} M végkoncentrációban alkalmaztuk a vizsgált molekulákat. A PACAP1-38 a vad egerekben mind az arteria carotis communisban, mind pedig az arteria femoralisban szignifikánsan nagyobb kontrakciót váltott ki, mint a KO állatokban. Ezzel szemben a PACAP1-27 és a VIP a KO állatokban váltott ki a vad egerekénél nagyobb kontrakciót, mindkét érben. Vad egerek esetében a CA területén a PACAP1-38 nagyobb relaxációt okozott, mint a PACAP1-27 és a VIP. Ezzel szemben a KO egerekben pont fordítva, mindkét ér vizsgálatánál azt találtuk, hogy a PACAP1-27 és a VIP a PACAP1-38-nál nagyobb relaxációt eredményezett. KO egerekben a PACAP1-38 csak kis mértékű relaxációt váltott ki, ugyanis a vad egerekben már 10^{-8} M-os koncentrációban, míg a PACAP KO egerekben csak a legnagyobb vizsgált dózis (10^{-6} M) esetében eredményezett relaxációt (4.7. ábra). Az ábrán a legnagyobb, 10^{-6} M-os dózis eredményeit ábrázoltam.



4.7. ábra: 10^{-6} M koncentrációjú PACAP1-38, PACAP1-27 és VIP hatása a KCl-indukálta vazokonstrikcióra arteria carotis communis (CA) és arteria femoralis (FA) esetében vad típusú (VT) és KO állatokban. Az artériák relaxációját az erek izometriás kontrakciójának csökkenése jelzi. Átlag \pm SEM. Kétutas ANOVA, Tukey-féle post-hoc analízissel. * $p < 0,05$ vs. VT, + $p < 0,05$ vs. PACAP1-38 VT, # $p < 0,05$ vs. PACAP1-38 KO.

4.8. PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor mRNS és fehérje az érrendszerben

Vad típusú és KO egerek arteria carotis communis és arteria femoralisból származó mintáiban megmértük a PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptorok mRNS-ét RT-PCR segítségével és fehérje-szintjét Western-blot analízissel. A PAC1 receptor RT-PCR vizsgálata során mindkét érben azt találtuk, hogy a PACAP KO egerekben a vad egerekhez képest szignifikánsan alacsonyabb a PAC1 receptor expressziója: a CA-ban nem volt detektálható mennyiségű PAC1 mRNS a KO mintában, míg az FA-ban a vad típusú egerekben mért RNS mennyiségnek az ötödére csökkent. Ezen vizsgálatokat a Western-blot is megerősítette, a PAC1 receptor fehérje mennyisége is alacsonyabb volt a KO állatok ereiben a vad egerekhez képest. A KO egerek vizsgálatakor az arteria carotis communis esetében a vad típusú egerben mért értéknek a 20%-át, az arteria femoralis esetében a 60%-át detektáltuk. A VPAC1 receptort is mRNS és fehérje szintjén is ki tudtuk mutatni mindkét érben, mindkét genotípus esetében. Ezen receptor expressziójában nem volt szignifikáns különbség a genotípus-csoportok között. Ezzel szemben a VPAC2 vizsgálatakor azt találtuk, hogy egyik genotípus esetében sem volt kimutatható sem a CA sem az FA területén, sem RT-PCR, sem Western-blot vizsgálattal (4.8. ábra).



4.8. ábra: Eredeti gélképek mutatják a PAC1, VPAC1, VPAC2 receptorok mRNS-ének (fent) és fehérjéinek (lent) expresszióját vad (VT) és PACAP KO egerek CA és FA ereiből. Mindkét vizsgálatnál belső kontrollként aktint használtunk. A gélkép alatti számok a KO állatokban mért mRNS/fehérje mennyiségét a vad típushoz képest adják meg az aktinra normalizálva. A vad egerkben mért értéket 1-nek vettük. Kétmintás t-próba. * $p < 0,05$ vs. VT.

V. Megbeszélés

Kutatásaink során PACAP KO egerekben vizsgáltuk a PACAP hiányának következményeit a hallórendszerben, a fogfejlődés kapcsán és az érrendszerben.

5.1. A PACAP KO egerek hallásvizsgálata

A hallórendszer vizsgálatakor a PACAP KO egerek hallópályájában csökkent neuronaktivitást és a PAC1 receptor megváltozott immunreaktivitását találtuk, a belső fülben pedig a vadhoz képest változatlan fehérjé-profil.

A halláskárosodás mintegy 500 millió embert érint világszerte. A hallásvesztés számos okból létrejöhet: lehet genetikai eredetű, kialakulhat intrauterin hatások következtében, különböző fertőző betegségek eredményeképpen, zajártalom, öregedés vagy más toxikus ágensek hatására (Sheffield és Smith, 2018). Fontos a különböző okból kialakuló halláskárosodások pontos mechanizmusának megismerése, és azon molekulák felderítése, melyek a hallórendszerben lehetséges védő szerepet tölthetnek be. Miután a PACAP-nak általános neuroprotektív és citoprotektív hatásai ismertek, célunk volt a belső fülben és a hallórendszerben kifejtett hatásait vizsgálni.

A PACAP jelenlétét a belső fülben és a hallópálya magjaiban már korábban kimutatták. A cochlearis magokban a PACAP mind a sejttestekben, mind a rostokban jelen van, kifejeződése a VCN területén magasabb (Kausz et al., 1999; Hannibal, 2002). Dzsungáriai törpehörcsögben az SOC területén kimutatták a PACAP jelenlétét annak különböző magjaiban, beleértve az olivocochlearis pálya kiindulási területét is. Feltételezhető, hogy a cochleában talált PACAP pozitív rostok ezen sejteknek az axonjai (Kausz et al., 1999; Reuss et al., 2009). A PACAP-ot kimutatták a tractus olivocochlearis medialis területén, ami a külső szőrsejteken végződik, azonban nem volt megtalálható a tractus olivocochlearis lateralisban, ami a ganglion spirale bipolaris neuronjainak a belső szőrsejteken alatt induló dendritikus nyúlványain végződik. Ez megerősíti azon elméletet, miszerint a PACAP-nak nagyobb szerepe van a cochlea efferens beidegzésében, mint afferenciájában (Abu-Hamdan et al., 2006). A PACAP-ot az IC, CGM területén is kimutatták, mind patkány, mind emberi mintákon (Palkovits et al., 1995; Hannibal, 2002). A PAC1 receptor mRNS-ét patkányban mind a VCN, DCN, SOC, NLL, IC, és CGM területén is detektálták (Hashimoto et al., 1996; Shioda et al., 1997; Joo et al., 2004).

Jelen kísérletünkben kollaborációban elsőként az egerek hallását vizsgáltuk objektív audiometria (ABR) segítségével. Ezen eredmények Humli Viktória Ph.D. értekezéséhez tartoznak, így nem képezik a jelen értekezés alapját, azonban tárgyalásuk a saját eredmények kontextusba helyezéséhez elengedhetetlen. Frekvenciafüggetlen klikk, és alacsony frekvenciájú (4,1-8,2 kHz) burst inger alkalmazása esetében a PACAP KO egerek hallásküszöbe szignifikánsan magasabb volt 1,5 és 4 hónapos egerekben, mint vad társaik esetében. Nyolc hónapos korban a klikk és 4,1 kHz-es burst inger esetében szintén szignifikánsan magasabb volt a hallásküszöb, azonban 8,2 kHz-en a különbség eltűnt. Tendenciájában a kor előrehaladtával mind a vad, mind a KO egerekben a hallás romlását tapasztaltuk. A hallásküszöb vizsgálatok értelmezésénél figyelembe kell venni, hogy a CD1 egértörzsnél ismert az öregkori halláscsökkenés. A vad egerek hallásküszöb-értékeinek eredménye megegyezik a CD1 törzsről korábban leírtakkal, miszerint a kor előrehaladtával ezen állatok hallása fokozatosan romlik (Le Calvez et al., 1998). Ez lehet a magyarázata annak, hogy magas frekvenciákon nem találtunk különbséget a vad és KO egerek között, valamint hogy a 8,2 kHz-nél mért különbség a 8 hónapos egerek esetében eltűnik. Annak ellenére, hogy a PACAP KO egerekben a magasabb frekvenciákat vizsgálva nem találtunk különbséget a hallásküszöb értékekben, amennyiben ezen frekvenciákon (16,4; 32,8 és 65,6 kHz) az ABR vizsgálatokat finomabb elemzéseknek is alávetettük, úgy az amplitúdó és latencia eredményekben találtunk eltérést a két csoport között, ami a KO egerekben megváltozott hallásfunkcióra utal. Az ABR hullámok finomelemzésekor az amplitúdó értékek vizsgálata információt ad a hallópályában található neuronok aktiválódásáról, ahol a PACAP KO egerekben a vad típushoz képest sokkal alacsonyabb értékeket detektáltunk. Ugyanakkor a hullámok latenciájának (a stimulustól való időbeli távolságát) vizsgálata során azt találtuk, hogy KO egerekben a magok korábban aktiválódtak a vad egerekhez képest. A csökkent amplitúdó és latencia értékek feltehetően a KO állatok hallórendszerében a sérüléseknek olyan markerei, amelyek a megőrzött hallásküszöb ellenére is jelzik a halláskárosodást (Tziridis et al., 2017; Muniak et al., 2018).

A funkcionális vizsgálatokkal egy időben morfológiai vizsgálatokat is végeztünk, mely saját munkám volt, ezen eredmények a jelen értekezés alapját képezik. Hanginger adását követően a hallópálya magjaiban a sejtek aktiválódását c-Fos immunhisztokémiával mutattuk ki. A sejtaktivációs markerek közül a c-Fos az

idegsejtek aktivációját követően gyorsan expresszalódik, ellentétben a szintén sejtaktivációs markerként használt Fos-B-vel, amelynek szintje csak krónikus aktiváció eredményeképpen növekszik meg. Esetünkben egyszeri hanginger alkalmaztunk, ezért a c-Fos kimutatását végeztük el (Brown és Liu, 1995; Riera-Sala et al., 2001). Az alkalmazott hanginger frekvencia-tartományában és hosszában, valamint az ingerlés és az állatok feldolgozása közötti időtartam kiválasztásában a kutatócsoportok között igen nagy eltérések mutatkoznak (Takagi et al., 2004; Lu et al., 2014). Kutatócsoportunk a sejtek aktiválásához 4-20 kHz közötti fehér zajt alkalmazott, 100 dB-es hangnyomással fél óra időtartamban. Ez követően 1 órát vártunk a c-Fos transzlációjára, majd magba történő transzlokációjára. A VCN és DCN területén a csendben tartott állatok esetében mindkét csoportban csak kis számú c-Fos pozitív sejtet találtunk. A hangingernek kitett csoportokban mindkét genotípus esetén emelkedett az aktiválódott sejtek száma, de ez az emelkedés a KO egerekben szignifikánsan kisebb volt. Ezen eredmények egybevágóak a funkcionális ABR vizsgálatok eredményeivel: a KO állatok halláskárosodása nemcsak a hallásküszöb emelkedésében, hanem a hallópályában aktiválódó kevesebb számú neuronban is kimutatható. Annak vizsgálatára, hogy miért csökkent az aktiválódott sejtek száma, Nissl-festést végeztünk. Ennek eredményeképpen elmondhatjuk, hogy a VCN-DCN területén az idegsejtek számában a KO állatokban nem tapasztaltunk csökkenést. Tehát a csökkent számú c-Fos pozitív sejt oka nem a sejtek csökkent számában, hanem csökkent aktivációjában keresendő. A cochlearis magokban a PAC1 receptor immunpozitivitását is megvizsgáltuk. A korábbi irodalommal megegyezően kísérletünk folyamán a PAC1 receptor jelenlétét vad egerekben a cochlearis magokban kimutattuk, ehhez képest a KO egerekben ezen magok stratum granulosumának területén kevesebb sejtben találtunk PAC1 receptort. Ezen eredmények összevágóak azzal, hogy kutatócsoportunk korábban a KO egerekben belső fülében, és jelen kísérleteinkben az ereken szintén a PAC1 receptor csökkenését mutatta ki a vad egerekhez képest.

A hallópálya centrálisabb magjaiban azt találtuk, hogy az összes többi vizsgált területen (SOC, NLL, IC, AU1) már a csendben tartott állatok esetében is van egy alapszintű sejtaktiváció. Hanginger adására az SOC, NLL, IC területén szignifikánsan emelkedett az aktiválódott sejtek száma mindkét genotípusban. Az AU1 esetében is megnövekedett c-Fos immunpozitivitás láttunk, de a különbség nem volt szignifikáns. A két genotípus között azonban ezen magok vizsgálatakor nem találtunk különbséget.

Úgy véljük, hogy a hangingerre adott emelkedés bizonyítja, hogy mérésünk valid, és a genotípusok között nem technikai/mérési hiba miatt nem találtunk különbséget. Ezen központokban feltételezhetően azért találunk már csendben tartott állatokban is emelkedett c-Fos pozitív sejtszámot, mert ezek a központok nemcsak a hallópálya egyszerű átkapcsoló állomásai, hanem komplex szerepet töltenek be az információ feldolgozásában, és összeköttetési rendszerük is szerteágazó. Ezek a központok az agy számos más területéről is kapnak beidegzést. Az SOC afferens rostokat kap az IC, thalamus, AU1 területéről, de ezen felül szerotoninerg és noradrenerg központokból is. A NLL az IC-tól, az IC pedig az AU1 és a primér szomatoszenzoros központból, valamint az agytörzsi szomatoszenzoros agyidegmagvakból is (Thompson és Thompson, 1993; Thompson és Schofield, 2000; Bajo és King, 2013). Az AU1-nek fontos szerepe van a beérkező multimodális információk összehangolásában (Budinger et al., 2008). A felsorolt összeköttetések következtében ezekben a központokban számos idegsejt-típus különböző neurotranszmitterei választódnak ki. Feltételezzük, hogy a komplexebb afferenciációval járó összetettebb rendszerekben nagyobb lehetőség van a PACAP hiányának kompenzálására, ami így nemcsak a csendben tartott állatokban tapasztalt emelkedett c-Fos szintet magyarázza meg, hanem azt is, hogy ezen területeken miért tűnt el a vad és PACAP KO egerek közötti különbség. Az, hogy pontosan melyik jelátviteli utak pótolhatják a PACAP szerepét, egyelőre nem ismert, de úgy tűnik, hogy nem egyetlen rendszer veszi át a PACAP hiányának pótlását. A lehetséges útvonalak a fogfejlődéses és érrendszeri vizsgálatoknál részletesen bemutatásra kerülnek.

A halláskárosodás okának pontosabb felderítése érdekében tovább folytattuk vizsgálatainkat a belső fül területén is, ahol vad és PACAP KO egerek belső fülének a ductus cochlearisából készült lizátumából végeztünk fehérjeprofil analízist. A belső fülben a PACAP és a PAC1 receptor lokalizációja jól ismert. A stria vascularis területén feltételezhetően az endolympha megfelelő elválasztásához elengedhetetlen tight junction integritásában és a K^+ -csatornák befolyásolásában játszik szerepet (Drescher et al., 2000). A belső és külső szőrsejtek körül a vékony idegrostokban és az idegvégződésekben volt PACAP immunpozitivitás, továbbá a támasztósejtek és a habenula perforata területén. Ezen területeken PAC1 receptor immunpozitivitást is találtak (Drescher et al., 2006). A szőrsejtek körül a PACAP kolokalizációt mutatott a cochlea efferens beidegzésében részt vevő ChAT-el és DBH-val. Ezen eredmények arra

utalnak, hogy a PACAP a belső fül efferens beidegzésében vesz részt, és befolyásolja annak kolinerg és adrenerg beidegzését. Ismert, hogy az oliva superiorból induló olivocochlearis pálya többek között cholinerg és dopaminerg rostokat tartalmaz (Eybalin, 1993; Morley et al., 1998). Szintén kimutatták, hogy a PACAP képes a dopamin elválasztás serkentésére (Anderson et al., 2005), és hogy a dopaminerg rostok védik az I-es típusú afferens sejteket excitotoxicitás ellen (d'Aldin et al., 1995; Pujol és Puel, 1999). Az afferens GluR2/3-al a PACAP nem, de a PAC1 receptor mutatott kolokalizációt. Ismert, hogy a PACAP-nak védő hatása van glutamát indukálta kóros Ca^{2+} -koncentráció emelkedés ellen a hippocampus idegsejtjeiben (Dong et al., 2000), így feltételezhető, hogy itt a PACAP-nak a túlzott glutamát excitotoxicitás elleni védelemben lehet szerepe.

Az endolympha és a szőrsejtek Ca^{2+} szintje megemelkedik a belső fület ért különböző károsító hatásokra, legyen szó akusztikus túlingerlésről, gyógyszer indukálta ototoxicitásról, a labyrinthus membranaceus vestibuláris részének megsértéséről vagy sebészeti úton létrehozott endolymphatikus hydropról (Ikeda et al., 1988, 2010; Salt és DeMott, 1994). A megemelkedett Ca^{2+} -koncentráció káros a szőrsejtekre, az apoptózis végrehajtásához is elengedhetetlenül szükséges (Orrenius et al., 1992; Tombal et al., 2002). A különböző Ca^{2+} -kötő fehérjék fontos szerepet játszanak a nagy mennyiségű Ca^{2+} -ionok megkötésében, ezzel védve őket a magas Ca^{2+} szint okozta károsodásoktól, azonban Ca^{2+} -kötő képességük véges (Hackney et al., 2005; Idrizbegovic et al., 2006). A belső fülben kutatócsoportunk korábban a Ca^{2+} -kötő fehérjék immunpozitivitását vizsgálta, amely szintén a szőrsejtek védelmének fontos mechanizmusa lehet. Vizsgálatainkban az találtuk, hogy vad egerekben kezelés nélkül alacsony ezen fehérjék mennyisége, azonban ototoxikus kanamycin-kezelés hatására emelkedett immunpozitivitást találtunk. A PACAP KO egerekben már kezelés nélkül is magas volt a Ca^{2+} -kötő fehérjék jelölődése, ez azonban kanamycin-kezelés hatására nem emelkedett tovább (Tamás et al., 2012; Németh et al., 2014). Az endolympha és a szőrsejtek intracelluláris ionkoncentrációja, beleértve a Ca^{2+} -koncentrációt is, szigorúan szabályozott, mely elengedhetetlen a szőrsejtek megfelelő működéséhez. Ismert, hogy míg az idegsejtek, izomsejtek, receptorsejtek aktivációja általában Na^+ -csatornák megnyílásának köszönhetően az intracelluláris Na^+ -koncentráció megnövekedésével jár együtt, ezzel szemben a szőrsejtek aktivációjának első lépése K^+ -ionok beáramlása az endolymphából. A PACAP a PLC-PIP₂-DAG/IP₃ útvonalon keresztül szintén

befolyásolja a K^+ -csatornák működését, így ezen ionkoncentrációk fenntartásában is fontos szerepe lehet. A K^+ -csatornák megnyílása jórészt a szőrsejtnyúlványok területén történik, amelyeknek a citoplazmája nagymértékben izolált a szőrsejt többi területétől. Ennek köszönhetően nincsen szükség a szőrsejtek nyúlványaiban tömegesen rá, sem pedig az ezen csatornák fenntartásához szükséges nagy mennyiségű mitochondriumra a nyúlványok területén. A Na^+/K^+ -ATPáz igen nagy energiaigényű, egyéb sejteken a test teljes energiafelhasználásának mintegy harmadáért felel, a mitochondriumok pedig méreteik miatt nagyban akadályozná a nyúlványok mechano-szenzitivitását. A mechanoszenzitív csatornák megnyílásával a K^+ -ionok mellett a szőrsejtekbe jutó Ca^{2+} mennyisége elegendő a sejtek depolarizálásához a nyúlványokban jelen lévő nagy mennyiségű Ca^{2+} -kötő fehérje ellenére is (Gagov et al., 2018). Feltételezzük, hogy a PACAP-génkiütött egerekben a PACAP védőhatásai, melyek a reaktív oxigén gyökök, apoptózis, túlzott emelkedett Ca^{2+} -koncentráció ellen védenének, hiányoznak, és így azon belső fület érő hatások, melyek vad egerekben nem okoznak sejtkárosodást, a KO egerek esetében apoptotikus útvonalak aktiválódásához, az intracelluláris Ca^{2+} emelkedéshez, és ennek kivédésére emelkedett Ca^{2+} -kötő fehérje szinthez vezetnek. A Ca^{2+} -kötő fehérjék védő hatása azonban véges mértékben tud védő hatást biztosítani, erre utal, hogy a KO egerekben kanamycin-kezelés hatására sem növekszik tovább ezen fehérjék mennyisége (Németh et al., 2014).

Különböző gyulladással járó elváltozások és az érrendszer elváltozásai fontos szerepet játszanak az idegi típusú (sensorineuralis, a cochleából vagy attól centrálisabban létrejövő) halláskárosodás különböző fajtáiban (London és Gurgel, 2014; Kalinec et al., 2017; Köles et al., 2019). Jelen kutatásunkban ezért a gyulladással elváltozások markereiként szolgáló citokinek, és az érrendszeri elváltozásokkal kapcsolatban kifejeződő angiogenetikus fehérjéket vizsgáltuk vad és PACAP KO egerek ductus cochlearisában, mellyel célunk volt megvizsgálni, hogy ezen fehérjék szintje hogyan változik a PACAP KO egerekben található halláscsökkenéssel. A ductus cochlearis általunk alkalmazott eltávolításának előnye, hogy minimálisra csökkentette a minta szennyezettségét a cochleát körülvevő csontos képletekből. A fehérjeprofíliánál számos olyan molekulát azonosítottunk mind a vad, mind a PACAP KO egerekben, amelyek részt vesznek angiogenetikus folyamatokban [savas-fibroblaszt növekedési faktor (FGF), C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12)], antiangiogenetikus folyamatokban (endostatin, Serpin F1), kemotaktikus hatással bírnak [B-lymphocyt

kemoattraktáns (BLC), thrombocyt faktor 4 (PF4), CXCL12)] vagy a koagulációban vesznek részt [PF4, szöveti faktor (TF)]. Kimutattuk továbbá az ubikviter sejtfelszíni dipeptidyl-peptidáz-4-et (DPPIV), az antiapoptotikus osteopontint és a sejtközötti adhéziós molekula CD54-et is. A vad és PACAP KO egerek között azonban nem volt szignifikáns különbség ezen fehérjék tekintetében. Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a PACAP KO egerekben található halláscsökkenés feltételezhetően nem a belső fül gyulladással, vagy angiogenetikus eredetű elváltozásaiból ered, mivel ezen fehérjék mennyisége a vizsgált körülmények között nem változott meg számottevően a PACAP KO állatok esetében.

Eddigi kísérleteink alapján egyelőre nem állapítható meg egyértelműen, hogy a hallásbeli funkcióvesztést a belső fül, vagy pedig a hallópálya károsodása, esetlegesen a kettő együtt okozza-e. Ismert, hogy a belső fül izolált léziója önmagában is a hallópálya komplex változásaihoz vezethet. A hallópálya magjaiban a sejtek aktivációjának elmaradásán túl befolyásolhatja többek között a Ca^{2+} -kötő fehérjék és a tirozin-hidroxiláz mennyiségét is (Idrizbegovic et al., 1998; Tong et al., 2005). Ezek alapján elképzelhető, hogy az általunk talált elváltozások a belső fül károsodása miatt jelentkeznek, amit szintén megerősítenek a Nissl-festéses vizsgálataink, miszerint a cochlearis magokban a neuronok száma nem, csak az aktivációjuk változott meg a PACAP KO állatokban.

A PACAP KO egerek halláscsökkenésének általunk feltételezett mechanizmusa a következő. Kimutatták, hogy a vad CD1 egerekben a kor előrehaladtával halláscsökkenés következik be. Ez a folyamat a külső és belső szőrsejtek pusztulásával jár (Le Calvez et al., 1998). Ismert, hogy a PACAP KO állatok szervezetében az öregedési folyamatok felgyorsulnak, ami a különböző érzékszerveket is érinti (Maász et al., 2014; Kovács-Valasek et al., 2017; Reglődi et al., 2018c, 2018a; Váczy et al., 2018). Feltételezzük, hogy ugyanez a folyamat játszódik le a PACAP KO egerek hallórendszerében is – a normálisan is végbemenő öregedési folyamatok a KO egerekben korábban következnek be. A PACAP neuroprotektív és általános citoprotektív hatásainak hiányában a szőrsejtek pusztulása felgyorsul, és a hallás a vadnál gyorsabb ütemben romlik. Ezen elméletet alátámasztják a funkcionális vizsgálataink eredményei. A CD1-es típusú vad állatokban a kor előrehaladtával történő szőrsejtpusztulást kimutatták már (Le Calvez et al., 1998), jelen pillanatban folynak azon kísérleteink, melyek a KO állatokban történő szőrsejtpusztulás mértékét hivatottak

meghatározni. Mivel a KO és vad állatokban hasonló folyamatok zajlanak csak eltérő mértékben, feltételezzük, hogy emiatt nem találtunk különbséget a két csoport fehérjeprofili analízise során.

Kísérleteinkből megállapíthatjuk, hogy az endogén PACAP elengedhetetlen a hallórendszer normális működéséhez. A vad egerek normális öregedési folyamatai, és az ezzel járó hallásvesztés a PACAP KO egerekben felgyorsult, de ennek a folyamatnak a pontos mechanizmusai még nem ismertek. Kísérleteink hosszú távú célja megvizsgálni, hogy az exogén PACAP-nak, vagy valamely PACAP-agonistának lehet-e hallásvédő szerepe a különböző, öregedés okozta, vagy más ototoxikus hang/gyógyszer indukálta hallásvesztésben, mint ahogyan már sikerült az exogén PACAP védő szerepét in vivo vizsgálatokban kimutatni más érzékszervek esetén (Endo et al., 2011; Atlasz et al., 2016). Ennek feltérképezésére következő lépésként tervezzük felnőttkorú PACAP KO és vad állatok halláskárosítását, és célunk megvizsgálni, hogy ezen károsító hatások exogén bejuttatott PACAP, vagy PACAP-agonista segítségével kivédhetőek-e.

5.2. A PACAP KO egerek fogfejlődése

Az egerek hallásának vizsgálata mellett kutatócsoportunk a PACAP fogfejlődésben betöltött szerepét is kutatta. A fogfejlődés során PACAP KO állatokban a Notch2 receptor, a DLL1 és Jagged1 ligandok és a CSL intracelluláris jelátviteli molekula fokozott immunpozitivitását mutattuk ki ameloblast és odontoblast sejtekben.

Korábbi kísérleteink számos morfológiai eltérést mutattak ki a PACAP KO egerek fogaiban a vad egerekhez képest. Az 5 napos egerekből származó, még fejlődésben lévő, fog dentin rétege vékonyabb a vad egerekénél (Sándor et al., 2014). Felnőtt egerekben a metszőfogak kisebbek, és szűkebb pulpakamrával rendelkeznek, mint a vad egerekben, és a dentin kalcium-hidroxilapatit sűrűsége is elmarad a vad egerekétől. A zománc és a dentin rétegvastagsága nem mutatott eltérést a vad típushoz képest sem 7 napos, sem felnőtt egerek esetében (Sándor et al., 2016; Farkas et al., 2017). A PACAP KO egerekben a dentin területén a hidroxilapatit kristályok nagyobb rendezetlenségűek mind a molaris, mind a metszőfogakban, ami a dentin mineralizációjának zavarára utal. A morfológiai eltéréseken túl azt is kimutattuk, hogy a metszőfogak átlagosan 2 nappal korábban törnek elő a KO egerekben. Ezen folyamatok molekuláris hátterének feltérképezésére kutatócsoportunk először az SHH jelátviteli útvonal molekuláinak

vizsgálatát végezte el. A 7 napos egerekből származó molaris fogakon végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a PACAP KO egerekben az SHH immunpozitivitása emelkedett a dentin és a szekretoros ameloblastok területén, valamint az ameloblastok alatt elhelyezkedő stratum intermediumban (5.2.2. ábra). Az SHH útvonal receptora, a PTCH1 szintén emelkedett szintet mutatott az ameloblastokban és az odontoblast sejtnyúlványok területén. Ezen felül az SHH útvonal intracelluláris célpontja, a GLI1 is magasabb pozitívítást mutatott a szekretoros ameloblastokban, főleg azok apikális területein (Sándor et al., 2014).

Korábbi kísérleteink alapján célunk volt a Notch jelátviteli út molekuláinak változásait feltérképezni a PACAP-génkiütött egerekben, a PACAP pontos hatásának megismerése céljából. A Notch jelátviteli útvonal elemei a fejlődő fog esetében jól körülhatárolt területeken jelennek meg, mely az idő előrehaladtával folyamatosan változik (1.5. ábra). Általánosságban elmondható, hogy a Notch receptorokat expresszáló sejtek a sejtosztódás fázisában maradnak, míg annak gátlása (például a Numb fehérje által), vagy a receptorok downregulációja a sejteket a differenciáció irányába mozdítja el (Harada et al., 1999; Katoh és Katoh, 2006a; Cai et al., 2011). Kísérletünkhöz 5 napos vad, PACAP HZ és PACAP KO egerek molaris fogaiból készült metszeteken vizsgáltuk a Notch jelátviteli útvonal molekuláinak kifejeződését az ameloblast és odontoblast sejtekben. A receptorok közül a Notch2 immunpozitivitása változott meg szignifikáns mértékben, az ameloblast sejtekben mind a HZ, mind a KO állatokban emelkedett volt a vad típushoz képest. A ligandok közül a DLL1 szintén magasabb jelölődést mutatott mind a heterozigóta, mind a homozigóta PACAP-génkiütött csoportokban az ameloblastok területén a vad típushoz képest, míg a Jagged1 ligand immunpozitivitása az odontoblast sejtekben volt magasabb a homozigóta PACAP KO állatokban a vad típushoz képest. Az intracelluláris molekulák közül a CSL mind az ameloblastok, mind az odontoblastok területén magasabb immunpozitivitást mutatott a PACAP KO egerekben a vad típushoz képest.

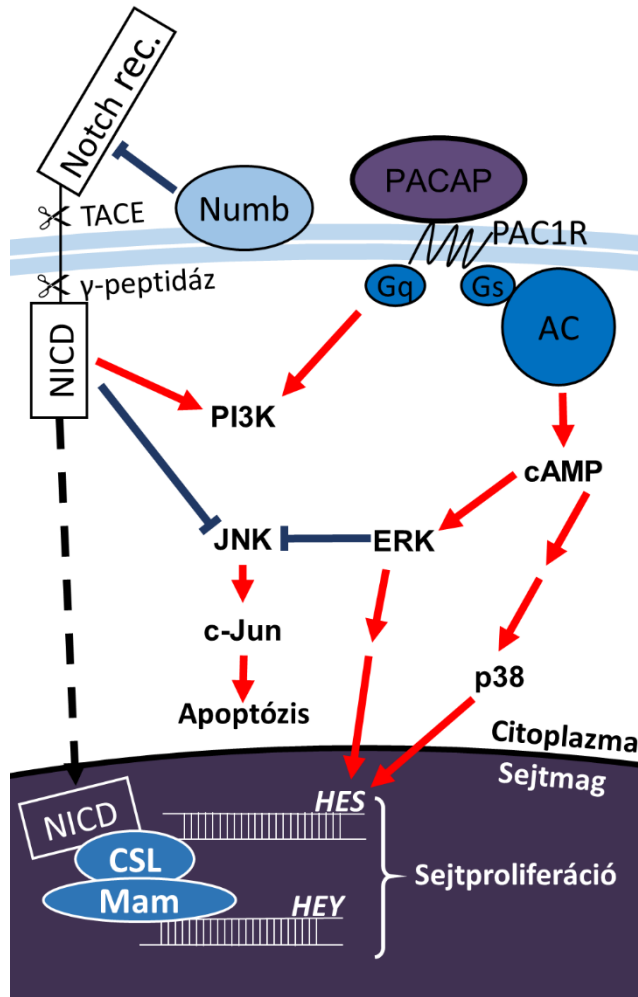
A Notch jelátviteli útvonal vizsgálatakor figyelembe kell venni annak időbeni lefolyását a fogfejlődés során. Korábbi kísérletekben a Notch receptorok közül a sapka stádiumtól (16-19. embrionalis nap) a késői harang stádiumig (5-8. postnatalis nap) a Notch1 és 3 receptorokat mutatták ki a stratum intermedium területén, míg a zománcszerv reticulum stellatumában és a fogpapilla területén a Notch2-t. Ebben a stádiumban a Notch receptorok sem az ameloblastok, sem az odontoblastok területén

nem expresszáldottak. Az ameloblastok és odontoblastok a sapka stádiumban DLL1-t, késői harang stádiumban pedig Jagged2-t expresszáltak, valamint az ameloblastok késői harang stádiumban Jagged1-re is immunpozitivitást mutattak (Mitsiadis et al., 1995, 1997, 1998; Harada et al., 1999, 2006; Borkosky et al., 2008). A Notch jelátviteli útvonal fontosságát mutatja a fogfejlődésben, hogy önmagában a Jagged2 mutációja a maxilla és mandibula összenövését eredményezi, irreguláris, megvastagodott fogakkal (Mitsiadis et al., 2005). Mindezen eredmények azt mutatják, hogy a Notch elengedhetetlen a szájüregi ektoderma és az ektomesenchyma közötti megfelelő kommunikációhoz, amely a normális fogfejlődés feltétele. Saját eredményeink a vad egerek vizsgálatával egybevágtak az irodalmi adatokkal. Az odontoblastok és ameloblastok vizsgálata során azt találtuk, hogy a Notch receptorok immunpozitivitása alacsony. Ehhez képest PACAP KO egerekben a Notch2 receptor mennyisége szignifikánsan megnőtt az ameloblast sejtekben. A további Notch receptorok vizsgálatával azt találtuk, hogy mindegyik receptor az ameloblast sejtekben, és a Notch1 és 2 az odontoblast sejtekben is tendenciózusan magasabb volt a PACAP KO egerekben.

A Notch receptorok magas szintű kifejeződésének köszönhetően a stratum intermedium és a subodontoblastikus réteg sejtjei a proliferatív fázisban maradnak. Ezzel szemben a receptorok downregulációja az ameloblast és odontoblast sejtekben ezen sejteket a differenciáció irányába tolja el, és hozzájárul, hogy dentint és zománcot termelő sejtekké alakuljanak át (Harada et al., 1999). Ezen finom egyensúlyhoz járul hozzá, hogy az ameloblastokban és odontoblastokban Notch ligandok expresszáldnak (DLL1, Jagged1, 2), amelyek a szomszédos stratum intermedium és subodontoblastikus réteg sejtjeire laterális gátlást fejtenek ki, és a Notch receptoraikon keresztül ezeket a sejteket a proliferációs fázisban tartják (Mitsiadis et al., 1998; Harada et al., 2006; Borkosky et al., 2008). Ezek a regulációs mechanizmusok felelősek azért, hogy meghatározzák azon sejtek számát, amelyek a proliferatív fázisból kilépve szekretoros sejtekké differenciálódnak (Mitsiadis et al., 1998). A Notch ligandok lokalizációja az embrionális fázisban jól ismert, azonban kevés adat áll rendelkezésre a postnatalis kifejeződésükről. Kutatásunkban a vad egerekben magas Jagged1 ligand szintet detektáltunk az odontoblast sejtekben, míg alacsony DLL1 pozitívitást az ameloblast sejtekben, ami szintén új eredménynek tekinthető. Mindkét ligandot a PACAP KO egerekben is megvizsgáltuk, ahol a vad típushoz képest magasabb szintet detektáltunk.

A DLL1 szintje az ameloblast sejtekben PACAP HZ egerekben emelkedett volt, és tovább emelkedett a PACAP KO állatokban. A Jagged1 vizsgálatokor a homozigóta PACAP KO egerekben a vad típusban detektált értékhez képest magasabb immunpozitivitást találtunk.

A kísérlet folyamán a Notch jelátviteli útvonal intracelluláris elemeit is megvizsgáltuk (5.2.1. ábra). A Notch-receptorokról ligandkötés hatására a TACE és egy γ -peptidáz hatására a NICD disszociál, a sejtmagba diszlokálódik és a CSL-hez, a Notch kanonikus intracelluláris útvonalának fő eleméhez kötődik (1.5. és 5.2.1. ábra) (Miele, 2006; Katoh és Katoh, 2007). A CSL a Notch útvonal inaktivitása esetén gátló faktorokhoz kötődik, azonban NICD jelenlétében a DNS-hez való kötődésének dinamikája megváltozik, több időt tölt a DNS-kötő helyen, és nagyobb mértékben biztosít lehetőséget az aktiváló faktorok (például Mastermind) bekötéséhez (5.2.1. ábra) (Gomez-Lamarca et al., 2018). Ennek hatására a Notch jelátviteli útvonal célgénjei, a *Hes* és *Hey* géncsalád (*Hes*: hairy and enhancer of split; *Hey*: Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif) tagjainak átírása történik, melyeknek a sejtproliferációban van szerepük – a Numb pedig ezeknek gátlásával irányítja a sejteket a proliferáció helyett a sejt differenciáció irányába (Jarriault et al., 1995; Maier és Gessler, 2000; Dahlqvist et al., 2003). Kísérletünkben a TACE és Numb fehérjék esetében nem találtunk különbséget a vad és PACAP KO egerek között, azonban a CSL mind az ameloblast, mind pedig az odontoblast sejtekben emelkedett volt a PACAP HZ és KO egerekben a vad társaikhoz képest. Feltételezzük, hogy a CSL mennyisége a Notch receptorok növekedésének köszönhetően emelkedett. Ezt támasztják alá azon eredményeink is, melyek szerint a Notch2 receptor mennyisége az ameloblast sejtekben szignifikánsan emelkedett volt, és a többi Notch receptor is tendenciájában emelkedést mutatott a PACAP KO egerekben a vad állatokhoz képest. Ezen emelkedés ugyan nem volt szignifikáns (a Notch2 kivételével), azonban úgy tűnik, hogy a CSL immunpozitivitását olyan mértékben emelte meg a Notch receptorok mennyiségének növekedése, ami már szignifikáns különbséget adott mind az ameloblastok, mind pedig az odontoblastok területén.

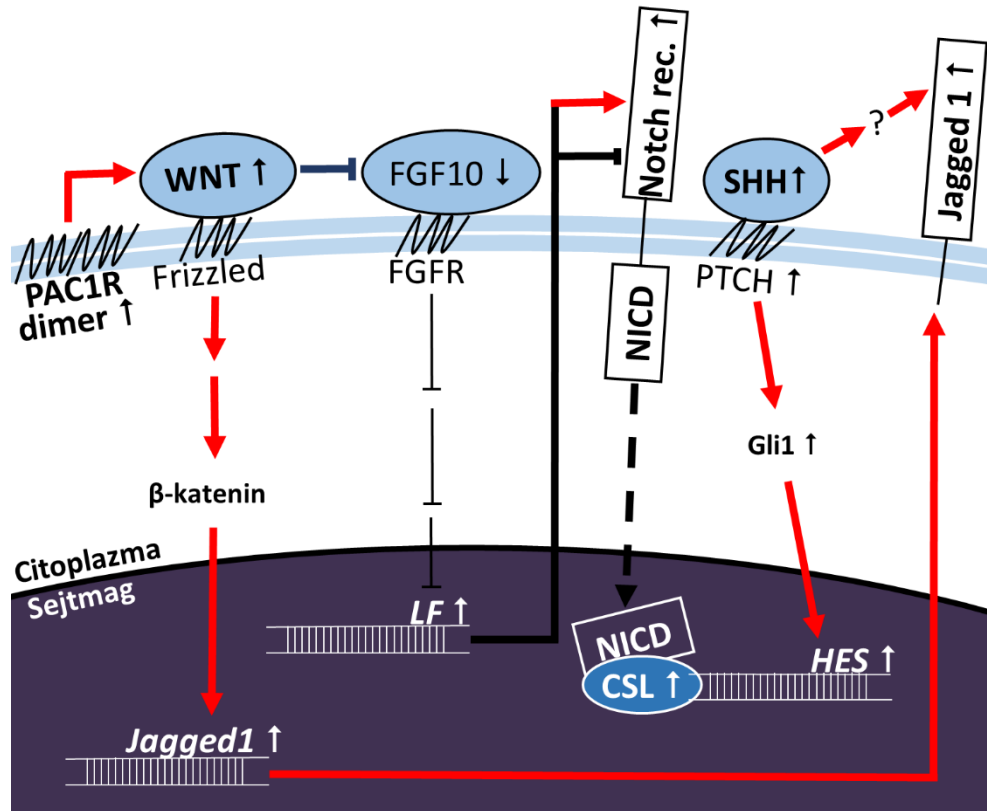


5.2.1. ábra: A PACAP és a Notch útvonalak közös célpontjai. Piros nyíl: aktiváció. Fekete tompa nyíl: gátlás. AC: adenilát-cikláz; cAMP: ciklikus adenozin-monofoszfát; CSL: CSL transzkripciósfaktor; ERK: extracelluláris szignál regulált kináz; G_s és G_q: G_s és G_q protein; JNK: c-Jun N-terminális kináz; Mam: Mastermind; NICD: Notch intracelluláris domén; Numb: Numb fehérje; p38MAPK: p38 mitogén-aktivált proteinkináz; PAC1R: PACAP receptor 1-es típus; PI3K: foszfatidil-inozitol 3-kináz; TACE: TNF-α konvertáló enzim.

A PACAP-génkiütött egerek a PACAP funkcióinak hiányában is életképesek, amiből arra következtethetünk, hogy lennie kell olyan kompenzációs jelátviteli útvonalaknak, amelyek PACAP hiányában annak funkcióit legalább részben átveszik (Farkas et al., 2017). Számos elmélet felmerült, miszerint a VIP vagy monoaminerg jelátviteli útvonalak pótolhatják a PACAP hiányát, azonban egyik sem igazolódott be teljes mértékben (Ogawa et al., 2005; Girard et al., 2006). Kísérletünkben kimutattuk,

hogy a Notch jelátviteli útvonal elemei a PACAP-génkiütött egerekben upregulálódnak, ami egy lehetséges alternatíva lehet a PACAP hatásainak pótlására. Ugyanakkor a PACAP és Notch jelátviteli útvonalak direkt összeköttetése nem ismert. Mindkét jelátviteli útvonalnak antiapoptotikus és sejtproliferációs hatásai vannak, és közösek a célpontjaik (5.2.1. ábra). A Notch célpontját képező egyik fő géncsalád, a *Hes* tekintetében kimutatták, hogy PC12 sejt kultúrában az ERK és p38MAPK útvonalakon keresztül a PACAP is indukálja a *Hes1* gén átírását (Jarriault et al., 1995; Yamada et al., 2010). Szintén ismert, hogy a PI3K/Akt útvonalat mind a Notch aktiválja T-sejtekben és emberi epitheliális sejt vonalban, mind pedig a PACAP patkány idegsejtjentyészetben (Rangarajan et al., 2001; Sade et al., 2004; May et al., 2010). A JNK, és ezen keresztül a c-Jun mindkét molekula által gátlásra kerül, melyet PACAP esetében patkány hippocampusban, Notch esetében pedig HEK293 sejtekben mutattak ki (Dohi et al., 2002; Kim et al., 2005; Miele, 2006). Ezen közös célpontok adhatják meg a lehetőségét annak, hogy a Notch jelátviteli útvonal átvegye a PACAP szerepét a PACAP KO egerekben.

Ugyanakkor a Notch jelátviteli útvonal upregulációjának pontos mechanizmusa a PACAP KO egerekben nem ismert. Feltételezésünk szerint egy komplex regulációs folyamat áll a változások hátterében (5.2.2. ábra). Kutatócsoportunk már korábban leírta, hogy PACAP KO egerekben az SHH jelátviteli útvonal elemei emelkedést mutatnak, ami közvetetten a Jagged1 emelkedéséhez vezet. Ez magyarázhatja az általunk leírt emelkedett Jagged1 fehérje mennyiséget az odontoblast sejtekben (McGlenn et al., 2005; Sándor et al., 2014). A PACAP-génkiütött állatokban a PAC1 receptor PACAP-tól független dimerizációja figyelhető meg, ami a WNT/ β -katenin útvonal aktivációjához vezet (Yu et al., 2014), ami egyrészt közvetlenül emeli a *Jagged1* gén transzkripcióját (Katoh és Katoh, 2006b), valamint a FGF10 gátlásában vesz részt. Ez a lunatic fringe (LF) emelkedéséhez vezet, ami emeli a Notch receptor mennyiségét a sejtek Golgi apparátusában, és befolyásolja annak ligandaffinitását a receptor extracelluláris doménjének megváltoztatásával a sejtek felszínén (Harada et al., 1999; Mustonen et al., 2002; Yang et al., 2015). Ez magyarázhatja az ameloblast sejtekben talált emelkedett Notch2 receptor szintet.



5.2.2. ábra: A PACAP KO egerekben a Notch útvonal upregulációjáért felelős lehetséges jelátviteli útvonalak. Piros nyíl: aktiváció. Fekete tompa nyíl: gátlás. Vastag nyíl és félkövér betű: PACAP KO egerekben fokozott aktivitás. Vékony nyíl és normál betű: PACAP KO egerekben csökkent aktivitás. **CSL**: CSL transzkripciós faktor; **FGF**: fibroblaszt növekedési faktor; **FGFR**: fibroblaszt növekedési faktor receptor; **Gli1**: glioma-asszociált onkogén 1; **LF**: lunatic fringe; **NICD**: Notch intracelluláris domén; **PAC1R**: PAC1 receptor; **PTCH1**: Protein patched homológ 1 fehérje; **SHH**: Sonic Hedgehog; **WNT**: wingless-related integration site.

Összességében elmondhatjuk, hogy kísérleteinkben a PACAP KO egerekben a Notch jelátviteli útvonal különböző elemeinek az immunreaktivitása növekedett, és diszkutáltuk azokat a lehetséges molekuláris jelátviteli útvonalakat, ami ennek a változásnak a hátterében állhat. Feltételezzük, hogy az emelkedett Notch aktivitás a finoman szabályozott fogfejlődés esetén zavart okoz, de egyelőre nem ismert, hogy ezek a változások pontosan hogyan járulnak hozzá azokhoz a morfológiai különbségekhez, amiket a PACAP KO egerek fogaiban korábban találtunk (Sándor et al., 2014; Yu et al., 2014; Yang et al., 2015). Ezen folyamatok megértéséhez szükséges a fogfejlődés

további jelátviteli útvonalainak (BMP, FGF) vizsgálata, amely kutatásaink jelenleg is folynak. A Notch jelátviteli útvonal számos elemének változása vagy a PACAP hiányának kiváltására hivatott, vagy pedig a normálisan PACAP reguláció alatt álló Notch útvonal felszabadulásának köszönhető. A két útvonal közötti kapcsolat pontos felderítése a fogfejlődésben, és más szervek fejlődésében még további kutatásokat igényel.

5.3. A PACAP KO egerek érrendszere

Az erek vizsgálatakor PACAP KO állatokban a PACAP1-27-re és a VIP-re adott fokozott, PACAP1-38-ra adott csökkent vazorelaxációs készséget, a receptorok közül pedig a PAC1 receptor downregulációját találtuk.

A PACAP-nak számos cardiovascularis hatása ismert (Vaudry et al., 2009), beleértve az erek működésére kifejtett hatásait is (Nandha et al., 1991; Ross-Ascutto et al., 1993). Vazodilatációt és ennek megfelelően szisztémás vérnyomáscsökkenést okoz, valamint angiogenetikus hatásai is ismertek (Cardell et al., 1991; Nandha et al., 1991; Ishizuka et al., 1992). Kutatócsoportunk korábban öreg patkányokból izolált endothel sejtenyészetet, ahol a PACAP szintje nagymértékben csökkent. Ezekben a sejtenyészetekben csökkent kapillárisformáló képességet és megnövekedett apoptózist találtunk. Az öreg sejtekbe bejuttatott exogén PACAP a sejtek kapillárisformáló képességét szignifikánsan javította és az apoptózis mértékét csökkentette. Ezzel szemben fiatal állatokban a PACAP-gén shRNS-el történő géncsendesítése az öreg egerekéhez hasonló képet adott, a kapillárisformáló képesség nagymértékben csökkent (Bánki et al., 2015). Exogén PACAP adása endothel és cardiomyocita sejtenyészetben is véd az oxidatív stressz ellen (Gasz et al., 2006; Rácz et al., 2007). A szívre kifejtett pozitív trop-hatásai ismertek (Farnham et al., 2011). Kutatócsoportunk a PACAP-ot emberi vérmintákon is vizsgálja, mint a szívelégtelenség lehetséges biomarkerét (Sárszegi et al., 2019).

A PACAP1-38, PACAP1-27 és a VIP vazorelaxációs hatásait már számos érben kimutatták, többek között patkány arteria carotis communisban, macska *in vivo* izolált tüdőlebenyen, patkány arteria mesenterica superiorban, sertés koszorúsereken (ramus circumflexus, ramus interventricularis anterior), kutya circulus arteriosusban és patkány arteria cerebri mediában is (Cheng et al., 1993; Anzai et al., 1995; Baun et al., 2011; Markovics et al., 2012; Erdling et al., 2013; Vámos et al., 2014; Huang et al., 2017).

Ismert, hogy a PACAP hatása nagyban faj és régió specifikus, például Huang és munkatársai leírták, hogy patkány *arteria mesenterica superior*-jában a PACAP1-38 váltotta ki a legnagyobb relaxációt, míg a sertés koszorúereken a PACAP1-27 és a VIP váltott ki nagyobb mértékű relaxációt (Erdling et al., 2013; Vámos et al., 2014; Huang et al., 2017). Ezen eredményekből látható, hogy egy szerven belül is eltérő a PACAP relaxációs hatása. Az agy területén eltérő hatást fejt ki a makroszkópos és mikroszkópos méretű erekre (Anzai et al., 1995; Baun et al., 2011). Számos kutatás vizsgálja a PACAP migrénben betöltött szerepét, amiben többek között a PACAP vazodilatációs hatása is szerepet játszhat (Ashina et al., 2017). Az eltérő hatás oka lehet a különböző régiókban az eltérő receptor splice variánsok jelenléte, melynek hátterében állhat, hogy azonos stimulusokra a különböző szerveknek eltérő vazomotoros választ kell adniuk (Syed et al., 2012). Ezen ismeretek birtokában a vad állatokban leírt hatásokat is új eredményeknek definiálhatjuk, mert a PACAP hatásait egér *arteria carotis communis* és *arteria femoralis* erekben korábban nem vizsgálták.

Kutatócsoportunk vazorelaxációt detektált mindegyik molekula jelenlétében. A CA területén vad állatokban a PACAP1-38 szignifikánsan nagyobb relaxációt váltott ki, mint a PACAP1-27 vagy a VIP. Ez egybevág Huang és munkatársainak a patkányban leírt eredményeivel (Huang et al., 2017). A KO egerekben azt találtuk, hogy szintén mindhárom molekula vazorelaxációt vált ki, azonban a relaxáció mértéke eltért a vad állatokhoz képest. A vad típusú állatokkal szemben a KO állatokban a PACAP1-27 és a VIP váltott ki a PACAP1-38-nál nagyobb mértékű vazorelaxációt. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a PACAP KO egerekben megváltozik a válaszkészség a szekretin/glükagon/VIP peptidcsalád tagjaira, és a PACAP helyett a VIP vált ki nagyobb mértékű vazorelaxációt. Feltételezzük, hogy ezzel a váltással a VIP-re való érzékenység megnövekszik a PACAP KO állatok ereiben, feltételezhetően a PACAP kiesett funkcióinak pótlására.

A PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptorok nagy mértékben kifejeződnek az erekben, amit patkány és emberi mintákban kimutattak, azonban eloszlásuk a vazodilatációs hatásokkal egybevágóan nagy mértékben szervfüggő. Számos kutatás bizonyította, hogy az erek fala nagy mennyiségben tartalmaz PACAP-tartalmú rostokat (Martin et al., 2004), azonban a vad és PACAP KO egerek ereiben a PACAP receptorok eloszlása nem ismert. Ezért kutatócsoportunk megvizsgálta ezen receptorok mRNS és fehérje mennyiségét a CA és FA területén. A KO állatokban a PAC1 receptor szintje mind

mRNS, mind fehérje szinten szignifikánsan csökkent, ami egybevág korábbi eredményeinkkel a belső fül területén, ahol KO állatokban szintén a PAC1 receptor csökkenését mutattuk ki a szőr- és támasztősejteken. A megváltozott receptor-mennyiség magyarázhatja azon eredményeinket is, hogy a KO állatokban a PACAP1-27 és a VIP nagyobb választ váltott ki, mint a vad állatokban.

5.4. Konklúzió

A PACAP hiánya az öregedési folyamatok felgyorsulásával jár, amelyet kutatócsoportunk többek között izolált endothel sejttenyészetben és a PACAP KO állatok szervrendszereiben is kimutatott (Bánki et al., 2015; Reglődi et al., 2018a). A hallórendszer vizsgálata folyamán is azt feltételezzük, hogy a PACAP KO egerekben az öregedés folyamatok felgyorsulnak, korábban és nagyobb mértékben alakul ki a kor előrehaladtával járó halláscsökkenés, mint vad egerekben. Vizsgálataink megerősítik a korábban leírtakat, miszerint a PACAP KO állatok a korai öregedés modelljeként szolgálhatnak (Reglődi et al., 2018a), valamint értekezésemben a lehetséges kompenzációs mechanizmusokat is tárgyaltuk. A PACAP KO egerek fogfejlődésének vizsgálatakor a Notch jelátviteli útvonal elemei, melyeknek target génjei a PACAP-pal részlegesen átfednek, megnövekedett immunpozitivitást mutattak. Az érrendszer vizsgálatakor kimutattuk, hogy PACAP KO egerekben a PAC1 receptor expressziója az erek falában lecsökken. Az erek PACAP1-38-ra adott relaxációs válaszkészsége csökkent, a PACAP 1-27-re és a VIP-re adott válaszkészség nőtt. Ezen változások feltételezhetően a PACAP hiányát ellensúlyozva részben a felgyorsult öregedési folyamatokat próbálják gátolni, azonban nem képesek azt teljes mértékben kompenzálni. A PACAP öregedési folyamatokban betöltött pontos szerepének vizsgálatát a jövőben is folytatni kívánjuk különböző fiziológiás és patológiás folyamatok modellezésével.

VI. Új eredmények összefoglalása

Kísérleteink során a PACAP-génkiütött és vad egerek különböző szervrendszereinek összehasonlításával számos eltérést detektáltunk.

I. A hallórendszer vizsgálata során elért új eredményeink:

1. A hallópályában hangingeret követően a cochlearis magok (VCN, DCN) területén c-Fos immunfestéssel az idegsejtek csökkent aktivációját mutattuk ki KO egerekben a vad típushoz képest. A hallópálya centrálisabb magjaiban sejtaktivációban nem volt különbség a két genotípus között.
2. A cochlearis magokban Nissl-festéssel a vad típus és a PACAP KO egerek esetében azonos neuronszámot találtunk. Az alacsonyabb c-Fos jelölődés az idegsejtek csökkent aktivációjából, és nem a csökkent sejtszámból ered.
3. A cochlearis magokban PAC1 receptor immunfestést végeztünk. A VCN és DCN közötti stratum granulosum területén a PACAP KO egerekben kevesebb sejt jelölődött, mint vad társaikban.
4. A belső fül ductus cochlearisából fehérjeprofil analízist végeztünk, ami során számos fehérjét kimutattunk vad és KO egerekben. A két genotípus között nem találtunk különbséget.

II. Fogfejlődés vizsgálata során a KO egerekben a Notch útvonal molekulái közül emelkedett Notch2, Jagged1, DLL1 és CSL immunpozitivitást találtunk a vad típushoz képest. Azt feltételezzük, hogy a Notch a PACAP hiányának kompenzációjában vehet részt, vagy pedig a normálisan PACAP reguláció alatt álló Notch útvonal felszabadulhat a PACAP gátlása alól. Vad egerekben a Notch ligandjai közül alacsony DLL1 és magas Jagged1 immunreaktivitást írtunk le, amire vonatkozóan az 5. postnatalis napon korábbi irodalmi adat nem állt rendelkezésre.

III. Az érrendszer vizsgálatakor (CA és FA ereken) PACAP KO egerekben a PAC1 receptor csökkent expresszióját találtuk mind mRNS, mind fehérje szinten a vad egerekhez képest. A VPAC1 receptort mindkét genotípusban, a VPAC2 receptort egyikben sem tudtuk kimutatni. A vad egerekben a PACAP1-38 váltott ki a KO-nál nagyobb mértékű relaxációt, míg a PACAP1-27 és a VIP a KO állatokban okozott nagyobb vazorelaxációt a vad egerekhez képest. Ezen eredmények az érrendszerben a PACAP hiányából eredő receptorprofil változásra, és a KO egerekben eltérő vazorelaxációs mechanizmusokra utalnak.

VII. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek dr. Tamás Andrea egyetemi docensnek és prof. dr. Reglődi Dórának, a PTE ÁOK Anatómiai Intézet vezetőjének. Ők nemcsak a kutatás terén voltak oktatóim, mentoraim, hanem útmutatást kaptam tőlük az egyetemi hallgatók oktatásában, és az élet minden egyéb területén is. Köszönettel tartozom dr. Gaszner Balázs egyetemi docensnek, akitől az immunhisztokémia technikájának kifinomult alkalmazását tanulhattam meg, és akinek mindig számíthattam élettapasztalatára és jó tanácsaira. Eredményeim nem jöhettek volna létre kutatótársam dr. Németh Adrienn egyetemi adjunktus nélkül. Szeretettel emlékezem a tragikus hirtelenséggel elhunyt dr. Szabadfi Krisztinára, aki hallgató koromban szintén témavezetőm volt. A hallásvizsgálatokat a Semmelweis Egyetemmel kollaborációban végeztük, itt dr. Zelles Tibor egyetemi docensnek, Humli Viktória és Szepesy Judit Ph.D. hallgatóknak szeretném megköszönni a közös munkát. A fogfejlődés témában dr. Juhász Tamással, a Debreceni Egyetem egyetemi adjunktusával dolgoztunk kollaborációban – a közös eredményekért mind neki, mind pedig az ottani kutatócsoportnak köszönettel tartozom. A fogfejlődéses munkacsoportnak dr. Sándor Balázs, a Fogászati és Szájsebészeti Klinika egyetemi adjunktusa is aktív tagja, akinek a közösen jegyzett publikációkban elért eredményekért szintén köszönettel tartozom. Az érrendszerben kapott eredmények dr. Ivan Ivič tudományos munkatárssal közösen végzett munkából származnak, amelyet ezúton is köszönök neki, és prof. dr. Koller Ákosnak, a vaszkuláris munkacsoport vezetőjének. A laboratóriumi vizsgálatok tekintetében intézetünkben elsősorban Kiss Anikónak, Mercz Tündének és Godáné Brumán Beatrixnek tartozom hálával, ugyanakkor meg szeretném köszönni az intézet minden munkatársának és valamennyi szerzőtársamnak az évek során nyújtott segítségüket. A dolgozat megszületéséhez elengedhetetlen volt a családom türelme és feleségem aktív támogatása, amiért nagyon hálás vagyok.

VIII. Irodalomjegyzék

- Abu-Hamdan MD, Drescher MJ, Ramakrishnan NA, Khan KM, Toma VS, Hatfield JS, Drescher DG (2006) Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC1-R) in the cochlea: Evidence for specific transcript expression of PAC1-R splice variants in rat microdissected cochlear subfractions. *Neuroscience* 140:147–161.
- 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 adenylyl cyclase-activating polypeptide. *Eur J Neurosci* 25:2604–2618.
- Anderson ST, Kusters DHL, Clarke IJ, Pow D V, Curlew JD (2005) Expression of pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide type 1 receptor (PAC1R) in the ewe hypothalamus: distribution and colocalization with tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurones. *J Neuroendocrinol* 17:298–305.
- Anzai M, Suzuki Y, Takayasu M, Kajita Y, Mori Y, Seki Y, Saito K, Shibuya M (1995) Vasorelaxant effect of PACAP-27 on canine cerebral arteries and rat intracerebral arterioles. *Eur J Pharmacol* 285:173–179.
- Ashina H, Guo S, Vollesen ALH, Ashina M (2017) PACAP38 in human models of primary headaches. *J Headache Pain* 18:110.
- Atlasz T, Váczy A, Werling D, Kiss P, Tamás A, Kovács K, Fábíán E, Kvárik T, Mammel B, Dányádi B, Lökös E, Reglódi D (2016) Protective effects of PACAP in the retina. In: *Pituitary Adenylyl Cyclase Activating Polypeptide – PACAP* (Reglódi D, Tamás A, eds), pp 501–529. New York: Springer, Cham.
- Aubert N, Vaudry D, Falluel-Morel A, Desfeux A, Fisch C, Ancian P, de Jouffrey S, Le Bigot J-F, Couvineau A, Laburthe M, Fournier A, Laudenbach V, Vaudry H, Gonzalez BJ (2008) PACAP prevents toxicity induced by cisplatin in rat and primate neurons but not in proliferating ovary cells: Involvement of the mitochondrial apoptotic pathway. *Neurobiol Dis* 32:66–80.
- Bajo VM, King AJ (2013) Cortical modulation of auditory processing in the midbrain. *Front Neural Circuits* 6:114.
- Bánki E, Sosnowska D, Tücsék Z, Gautam T, Tóth P, Tarantini S, Tamás A, Helyes Z, Reglódi D, Sonntag WE, Csiszár A, Ungvári Z (2015) Age-related decline of autocrine pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide impairs angiogenic capacity of rat cerebrovascular endothelial cells. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci* 70:665–674.
- Baun M, Hay-Schmidt A, Edvinsson L, Olesen J, Jansen-Olesen I (2011) Pharmacological characterization and expression of VIP and PACAP receptors in isolated cranial arteries of the rat. *Eur J Pharmacol* 670:186–194.
- Berekméri E, Deák O, Téglás T, Sággy E, Horváth T, Aller M, Fekete A, Köles L, Zelles T (2019) Targeted single-cell electroporation loading of Ca²⁺ indicators in the mature hemicochlea preparation. *Hear Res* 371:75–86.
- Blokzijl A, Dahlqvist C, Reissmann E, Falk A, Moliner A, Lendahl U, Ibáñez CF (2003) Cross-talk between the Notch and TGF-beta signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3. *J Cell Biol* 163:723–728.
- Borkosky SS, Nagatsuka H, Orita Y, Tsujigiwa H, Yoshinobu J, Gunduz M, Rodriguez AP, Missana LR, Nishizaki K, Nagai N (2008) Sequential expressions of Notch1, Jagged2 and Math1 in molar tooth germ of mouse. *Biocell* 32:251–258.
- 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.

- Botz B, Bölcskei K, Kereskai L, Kovács M, Németh T, Szigeti K, Horváth I, Máthé D, Kovács N, Hashimoto H, Reglődi D, Szolcsányi J, Pintér E, Mőcsai A, Helyes Z (2014) Differential regulatory role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the serum-transfer arthritis model. *Arthritis Rheumatol* 66:2739–2750.
- Brown MC, Liu TS (1995) Fos-like immunoreactivity in central auditory neurons of the mouse. *J Comp Neurol* 357:85–97.
- Budinger E, Laszcz A, Lison H, Scheich H, Ohl FW (2008) Non-sensory cortical and subcortical connections of the primary auditory cortex in Mongolian gerbils: Bottom-up and top-down processing of neuronal information via field AI. *Brain Res* 1220:2–32.
- Cai X, Gong P, Huang Y, Lin Y (2011) Notch signalling pathway in tooth development and adult dental cells. *Cell Prolif* 44:495–507.
- Cardell LO, Uddman R, Luts A, Sundler F (1991) Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in guinea-pig lung: distribution and dilatory effects. *Regul Pept* 36:379–390.
- Chatterjee TK, Sharma R V, Fisher RA (1996) Molecular cloning of a novel variant of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium influx by activation of L-type calcium channels. *J Biol Chem* 271:32226–32232.
- Cheng DY, McMahan TJ, Dewitt BJ, Carroll GC, Lee SS, Murphy WA, Bitar KG, Coy DH, Kadowitz PJ (1993) Comparison of responses to pituitary adenylate cyclase activating peptides 38 and 27 in the pulmonary vascular bed of the cat. *Eur J Pharmacol* 243:79–82.
- d'Aldin C, Puel JL, Leducq R, Crambes O, Eybalin M, Pujol R (1995) Effects of a dopaminergic agonist in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 90:202–211.
- Dahlqvist C, Blokzijl A, Chapman G, Falk A, Dannaeus K, Ibáñez CF, Lendahl U (2003) Functional Notch signaling is required for BMP4-induced inhibition of myogenic differentiation. *Development* 130:6089–6099.
- Dohi K, Mizushima H, Nakajo S, Ohtaki H, Matsunaga S, Aruga T, Shioda S (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevents hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *Regul Pept* 109:83–88.
- Dong Y, Tang TS, Lu CL, He C, Dong JB, Huang XY, Sun FZ, Bao X (2000) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide ameliorates the damage and inhibits the increase of intracellular calcium concentration in cultured hippocampal neurons induced by glutamate. *Acta Physiol Sin* 52:402–406.
- Drescher MJ, Drescher DG, Khan KM, Hatfield JS, Ramakrishnan NA, Abu-Hamdan MD, Lemonnier LA (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC1-R) are positioned to modulate afferent signaling in the cochlea. *Neuroscience* 142:139–164.
- Drescher MJ, Khan KM, Hatfield JS, Shakir AH, Drescher DG (2000) Immunohistochemical localization of adenylate cyclase isoforms in the lateral wall of the rat cochlea. *Brain Res Mol Brain Res* 76:289–298.
- Endo K, Nakamachi T, Seki T, Kagami N, Wada Y, Nakamura K, Kishimoto K, Hori M, Tsuchikawa D, Shinntani N, Hashimoto H, Baba A, Koide R, Shioda S (2011) Neuroprotective effect of PACAP against NMDA-induced retinal damage in the mouse. *J Mol Neurosci* 43:22–29.
- Erdling A, Sheykhzade M, Maddahi A, Bari F, Edvinsson L (2013) VIP/PACAP receptors in cerebral arteries of rat: Characterization, localization and relation to intracellular calcium. *Neuropeptides* 47:85–92.
- Eybalin M (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 73:309–374.
- Farkas J, Sándor B, Tamás A, Kiss P, Hashimoto H, Nagy AD, Fülöp BD, Juhász T, Manavalan S, Reglődi D (2017) Early neurobehavioral development of mice lacking endogenous PACAP. *J Mol Neurosci* 61:468–478.

- Farnham MMJ, Inglott MA, Pilowsky PM (2011) Intrathecal PACAP-38 causes increases in sympathetic nerve activity and heart rate but not blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 300:H214–222.
- Ferrary E, Sterkers O (1998) Mechanisms of endolymph secretion. *Kidney Int Suppl* 65:S98-103.
- Florian P, Amasheh S, Lessidrensky M, Todt I, Bloedow A, Ernst A, Fromm M, Gitter AH (2003) Claudins in the tight junctions of stria vascularis marginal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 304:5–10.
- Fukushima K, Takeda T, Kakigi A, Takeda S, Sawada S, Nishioka R, Azuma H, Taguchi T (2005) Effects of lithium on endolymph homeostasis and experimentally induced endolymphatic hydrops. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 67:282–288.
- Gaál V, Márk L, Kiss P, Kustos I, Tamás A, Kocsis B, Lubics A, Németh V, Németh A, Lujber L, Pytel J, Tóth G, Reglődi D (2008) Investigation of the effects of PACAP on the composition of tear and endolymph proteins. *J Mol Neurosci* 36:321–329.
- Gagov H, Chichova M, Mladenov M (2018) Endolymph composition: Paradigm or inevitability? *Physiol Res* 67:175–179.
- Gasz B, Rácz B, Roth E, Borsiczky B, Ferencz A, Tamás A, Cserepes B, Lubics A, Gallyas F, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D (2006) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides* 27:87–94.
- Gaszner B, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglődi D, Helyes Z (2012) The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus. *Neuroscience* 202:283–299.
- Girard BA, Lelievre V, Braas KM, Razinia T, Vizzard MA, Ioffe Y, El Meskini R, Ronnett G V, Waschek JA, May V (2006) Noncompensation in peptide/receptor gene expression and distinct behavioral phenotypes in VIP- and PACAP-deficient mice. *J Neurochem* 99:499–513.
- Giunta S, Castorina A, Marzagalli R, Szychlinska M, Pichler K, Mobasher A, Musumeci G (2015) Ameliorative effects of PACAP against cartilage degeneration. Morphological, immunohistochemical and biochemical evidence from in vivo and in vitro models of rat osteoarthritis. *Int J Mol Sci* 16:5922–5944.
- Gomez-Lamarca MJ, Falo-Sanjuan J, Stojnic R, Abdul Rehman S, Muresan L, Jones ML, Pillidge Z, Cerda-Moya G, Yuan Z, Baloul S, Valenti P, Bystricky K, Payre F, O'Holleran K, Kovall R, Bray SJ (2018) Activation of the Notch signaling pathway in vivo elicits changes in CSL nuclear dynamics. *Dev Cell* 44:611–623.
- Guo M, Jan LY, Jan YN (1996) Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. *Neuron* 17:27–41.
- Hackney CM, Mahendrasingam S, Penn A, Fettiplace R (2005) The concentrations of calcium buffering proteins in mammalian cochlear hair cells. *J Neurosci* 25:7867–7875.
- Hanner P, Jennische E, Lange S, Lönnroth I, Wahlström B (2004) Increased antiseecretory factor reduces vertigo in patients with Ménière's disease: a pilot study. *Hear Res* 190:31–36.
- Hannibal J (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 453:389–417.
- Hansel D, May V, Eipper B, Ronnett G (2001) Pituitary adenylyl cyclase-activating peptides and alpha-amidation in olfactory neurogenesis and neuronal survival in vitro. *J Neurosci* 21:4625–4636.
- Harada H, Ichimori Y, Yokohama-Tamaki T, Ohshima H, Kawano S, Katsube KI, Wakisaka S (2006) Stratum intermedium lineage diverges from ameloblast lineage via Notch signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 340:611–616.

- Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I (1999) Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol* 147:105–120.
- Harmar AJ, Sheward WJ, Morrison CF, Waser B, Gugger M, Reubi JC (2004) Distribution of the VPAC2 receptor in peripheral tissues of the mouse. *Endocrinology* 145:1203–1210.
- Hashimoto H, Nogi H, Mori K, Ohishi H, Shigemoto R, Yamamoto K, Matsuda T, Mizuno N, Nagata S, Baba A (1996) Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in the rat brain: An in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 371:567–577.
- Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tomimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A (2001) Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13355–13360.
- Hashimoto H, Shintani N, Tanida M, Hayata A, Hashimoto R, Baba A (2011) PACAP is implicated in the stress axes. *Curr Pharm Des* 17:985–989.
- Hirabayashi T, Nakamachi T, Shioda S (2018) Discovery of PACAP and its receptors in the brain. *J Headache Pain* 19.
- Horváth G, Illés A, Heimesaat MM, Bárdosi A, Bárdosi S, Tamás A, Fülöp BD, Opper B, Németh J, Ferencz A, Reglődi D (2016) Protective intestinal effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. In: *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide – PACAP* (Reglődi D, Tamás A, eds), pp 271–288. New York: Springer, Cham.
- Horváth G, Rácz B, Reglődi D, Kovács K, Kiss P, Gallyas F, Bognár Z, Szabó A, Magyarlaki T, László E, Lubics A, Tamás A, Tóth G, Szakály P (2010) Effects of PACAP on mitochondrial apoptotic pathways and cytokine expression in rats subjected to renal ischemia/reperfusion. *J Mol Neurosci* 42:411–418.
- Huang J, Waters KA, Machaalani R (2017) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor 1 (PAC1) in the human infant brain and changes in the Sudden Infant Death Syndrome (SIDS). *Neurobiol Dis* 103:70–77.
- Huang T, Cheng AG, Stupak H, Liu W, Kim A, Staecker H, Lefebvre PP, Malgrange B, Kopke R, Moonen G, Van De Water TR (2000) Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: Otoprotective strategies. In: *Int J Dev Neurosci*, pp 259–270.
- Ichikawa H, Sugimoto T (2003) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-immunoreactive nerve fibers in rat and human tooth pulps. *Brain Res* 980:288–292.
- Idrizbegovic E, Bogdanovic N, Canlon B (1998) Modulating calbindin and parvalbumin immunoreactivity in the cochlear nucleus by moderate noise exposure in mice. A quantitative study on the dorsal and posteroventral cochlear nucleus. *Brain Res* 800:86–96.
- Idrizbegovic E, Salman H, Niu X, Canlon B (2006) Presbycusis and calcium-binding protein immunoreactivity in the cochlear nucleus of BALB/c mice. *Hear Res* 216–217:198–206.
- Ikeda K, Kusakari J, Takasaka T (1988) Ionic changes in cochlear endolymph of the guinea pig induced by acoustic injury. *Hear Res* 32:103–110.
- Ikeda R, Nakaya K, Oshima T, Kawase T, Kobayashi T (2010) Calcium concentration in cochlear endolymph after vestibular labyrinth injury. *Neuroreport* 21:651–655.
- Ishizuka Y, Kashimoto K, Mochizuki T, Sato K, Ohshima K, Yanaihara N (1992) Cardiovascular and respiratory actions of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides. *Regul Pept* 40:29–39.
- Ivic I, Vámos Z, Cséplő P, Koller Á (2017) From newborn to senescence morphological and functional remodeling leads to increased contractile capacity of arteries. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 72:481–488.
- Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A (1995) Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377:355–358.

- Joo KM, Chung YH, Kim MK, Nam RH, Lee BL, Lee KH, Cha CI (2004) Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J Comp Neurol* 476:388–413.
- 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.
- Juhász T, Matta C, Katona E, Somogyi C, Takács R, Gergely P, Csernoch L, Panyi G, Tóth G, Reglődi D, Tamás A, Zákány R (2014a) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) signalling exerts chondrogenesis promoting and protecting effects: Implication of calcineurin as a downstream target. *PLoS One* 9:e91541.
- Juhász T, Matta C, Katona E, Somogyi C, Takács R, Hajdú T, Helgadottir SL, Fodor J, Csernoch L, Tóth G, Bakó E, Reglődi D, Tamás A, Zákány R (2014b) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) signalling enhances osteogenesis in UMR-106 cell line. *J Mol Neurosci* 54:555–573.
- Juhász T, Helgadottir SL, Tamás A, Reglődi D, Zákány R (2015) PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis. *Peptides* 66:51–57.
- Kalinec GM, Lomberk G, Urrutia RA, Kalinec F (2017) Resolution of cochlear inflammation: Novel target for preventing or ameliorating drug-, noise- and age-related hearing loss. *Front Cell Neurosci* 11:192.
- Katoh M, Katoh M (2006a) NUMB is a break of WNT-Notch signaling cycle. *Int J Mol Med* 18:517–521.
- Katoh M, Katoh M (2006b) Notch ligand, JAG1, is evolutionarily conserved target of canonical WNT signaling pathway in progenitor cells. *Int J Mol Med* 17:681–685.
- Katoh M, Katoh M (2007) Notch signaling in gastrointestinal tract (review). *Int J Oncol* 30:247–251.
- Kausz M, Murai Z, Arimura A, Köves K (1999) Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) immunoreactive elements in the brain stem of rats studied by immunohistochemistry. *Neurobiology* 7:19–31.
- Kawano H, Shimozono M, Tono T, Miyata A, Komune S (2001) Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide mRNA in the cochlea of rats. *Brain Res Mol Brain Res* 94:200–203.
- Kienlen Campard P, Crochemore C, Rene F, Monnier D, Koch B, Loeffler JP (1997) PACAP type I receptor activation promotes cerebellar neuron survival through the cAMP/PKA signaling pathway. *DNA Cell Biol* 16:323–333.
- Kim JW, Kim MJ, Kim KJ, Yun HJ, Chae JS, Hwang SG, Chang T-S, Park H-S, Lee K-W, Han P-L, Cho S-G, Kim T-W, Choi E-J (2005) Notch interferes with the scaffold function of JNK-interacting protein 1 to inhibit the JNK signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14308–14313.
- Kitajiri SI, Furuse M, Morita K, Saishin-Kiuchi Y, Kido H, Ito J, Tsukita S (2004) Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules, in the inner ear. *Hear Res* 187:25–34.
- Kitano H, Suzuki M, Kitanishi T, Yazawa Y, Kitajima K, Isono T, Takeda T, Kimura H, Tooyama I (1999) Regulation of inner ear fluid in the rat by vasopressin. *Neuroreport* 10:1205–1207.
- Köles L, Szepesy J, Berekméri E, Zelles T (2019) Purinergic signaling and cochlear injury-Targeting the immune system? *Int J Mol Sci* 20:2979.
- Kopke RD, Liu W, Gabaizadeh R, Jacono A, Feghali J, Spray D, Garcia P, Steinman H, Malgrange B, Ruben RJ, Rybak L, Van De Water TR (1997) Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells. *Am J Otol* 18:559–571.
- Kovács-Valasek A, Szabadfi K, Dénes V, Szalontai B, Tamás A, Kiss P, Szabó A, Sétáló G, Reglődi D, Gábor R (2017) Accelerated retinal aging in PACAP knock-out mice. *Neuroscience* 348:1–10.

- Lakk M, Dénes V, Gábrriel R (2015) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors signal via phospholipase C pathway to block apoptosis in newborn rat retina. *Neurochem Res* 40:1402–1409.
- Le Calvez S, Avan P, Gilain L, Romand R (1998) CD1 hearing-impaired mice. I: Distortion product otoacoustic emission levels, cochlear function and morphology. *Hear Res* 120:37–50.
- Li H, Steyger P (2009) Synergistic ototoxicity due to noise exposure and aminoglycoside antibiotics. *Noise Heal* 11:26–32.
- Lindsell CE, Shawber CJ, Boulter J, Weinmaster G (1995) Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* 80:909–917.
- London NR, Gurgel RK (2014) The role of vascular endothelial growth factor and vascular stability in diseases of the ear. *Laryngoscope* 124:E340–346.
- Lu J, Li W, Du X, Ewert DL, West MB, Stewart C, Floyd RA, Kopke RD (2014) Antioxidants reduce cellular and functional changes induced by intense noise in the inner ear and cochlear nucleus. *J Assoc Res Otolaryngol* 15:353–372.
- Lucero MT (2016) Sniffing out a role for PACAP in the olfactory system. In: *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide – PACAP* (Reglődi D, Tamás A, eds), pp 483–499. New York: Springer, Cham.
- Luo B, Aster JC, Hasserjian RP, Kuo F, Sklar J (1997) Isolation and functional analysis of a cDNA for human Jagged2, a gene encoding a ligand for the Notch1 receptor. *Mol Cell Biol* 17:6057–6067.
- Maász G, Pirger Z, Reglődi D, Petrovics D, Schmidt J, Kiss P, Rivnyák A, Hashimoto H, Avar P, Jám bor E, Tamás A, Gaszner B, Márk L (2014) Comparative protein composition of the brains of PACAP-deficient mice using mass spectrometry-based proteomic analysis. *J Mol Neurosci* 54:310–319.
- Maier MM, Gessler M (2000) Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. *Biochem Biophys Res Commun* 275:652–660.
- Manecka DL, Boukhzar L, Falluel-Morel A, Lihmann I, Anouar Y (2016) PACAP signaling in neuroprotection. In: *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP* (Reglődi D, Tamás A, eds), pp 549–561. New York: Springer, Cham.
- Markovics A, Kormos V, Gaszner B, Lashgarara A, Szőke E, Sándor K, Szabadfi K, Tuka B, Tajti J, Szolcsányi J, Pintér E, Hashimoto H, Kun J, Reglődi D, Helyes Z (2012) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol Dis* 45:633–644.
- Martin F, Baeres M, Møller M (2004) Origin of PACAP-immunoreactive nerve fibers innervating the subarachnoidal blood vessels of the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:628–635.
- Matsubara A, Laake JH, Davanger S, Usami SI, Ottersen OP (1996) Organization of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: A quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of corti. *J Neurosci* 16:4457–4467.
- May V, Lutz E, MacKenzie C, Schutz KC, Dozark K, Braas KM (2010) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/PAC1HOP1 receptor activation coordinates multiple neurotrophic signaling pathways: Akt activation through phosphatidylinositol 3-kinase gamma and vesicle endocytosis for neuronal survival. *J Biol Chem* 285:9749–9761.
- McGill MA, McGlade CJ (2003) Mammalian Numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem* 278:23196–23203.
- McGlenn E, van Bueren KL, Fiorenza S, Mo R, Poh AM, Forrest A, Soares MB, Bonaldo M de F, Grimmond S, Hui C-C, Wainwright B, Wicking C (2005) Pax9 and Jagged1 act downstream of Gli3 in vertebrate limb development. *Mech Dev* 122:1218–1233.
- Meggyes M, Lajko A, Fulop BD, Reglodi D, Szereday L (2020) Phenotypic characterization of testicular immune cells expressing immune checkpoint molecules in wild-type and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-deficient mice. *Am J Reprod Immunol* 83:e13212.

- Miele L (2006) Notch signaling. *Clin Cancer Res* 12:1074–1079.
- Minkes RK, McMahon TJ, Higuera TR, Murphy WA, Coy DH, Kadowitz PJ (1992) Analysis of systemic and pulmonary vascular responses to PACAP and VIP: Role of adrenal catecholamines. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 263:H1659–1669.
- Mitsiadis TA, Henrique D, Thesleff I, Lendahl U (1997) Mouse Serrate-1 (Jagged-1): expression in the developing tooth is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and fibroblast growth factor-4. *Development* 124:1473–1483.
- Mitsiadis TA, Hirsinger E, Lendahl U, Goridis C (1998) Delta-Notch signaling in odontogenesis: Correlation with cytodifferentiation and evidence for feedback regulation. *Dev Biol* 204:420–431.
- Mitsiadis TA, Lardelli M, Lendahl U, Thesleff I (1995) Expression of Notch 1, 2 and 3 is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and retinoic acid in the developing mouse tooth and associated with determination of ameloblast cell fate. *J Cell Biol* 130:407–418.
- Mitsiadis TA, Regaudiat L, Gridley T (2005) Role of the Notch signalling pathway in tooth morphogenesis. *Arch Oral Biol* 50:137–140.
- 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.
- Miyata A, Sato K, Hino J, Tamakawa H, Matsuo H, Kangawa K (1998) Rat aortic smooth-muscle cell proliferation is bidirectionally regulated in a cell cycle-dependent manner via PACAP/VIP type 2 receptor. *Ann N Y Acad Sci* 865:73–81.
- Moller K, Sundler F (1996) Expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) and PACAP type I receptors in the rat adrenal medulla. *Regul Pept* 63:129–139.
- Mori H, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofuchekentity 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.
- Morio H, Tatsuno I, Hirai A, Tamura Y, Saito Y (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat-cultured cortical neurons from glutamate-induced cytotoxicity. *Brain Res* 741:82–88.
- Morley BJ, Li HS, Hiel H, Drescher DG, Elgoyhen AB (1998) Identification of the subunits of the nicotinic cholinergic receptors in the rat cochlea using RT-PCR and in situ hybridization. *Mol Brain Res* 53:78–87.
- Mulvany MJ, Halpern W (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41:19–26.
- Muniak MA, Ayeni FE, Ryugo DK (2018) Hidden hearing loss and endbulbs of Held: Evidence for central pathology before detection of ABR threshold increases. *Hear Res* 364:104–117.
- Mustonen T, Tümmers M, Mikami T, Itoh N, Zhang N, Gridley T, Thesleff I (2002) Lunatic fringe, FGF, and BMP regulate the Notch pathway during epithelial morphogenesis of teeth. *Dev Biol* 248:281–293.
- Nagata A, Tanaka T, Minezawa A, Poyurovsky M, Mayama T, Suzuki S, Hashimoto N, Yoshida T, Suyama K, Miyata A, Hosokawa H, Nakayama T, Tatsuno I (2009) cAMP activation by PACAP/VIP stimulates IL-6 release and inhibits osteoblastic differentiation through VPAC2 receptor in osteoblastic MC3T3 cells. *J Cell Physiol* 221:75–83.

- Nakamachi T, Ohtaki H, Seki T, Yofu S, Kagami N, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Mark L, Lanekoff I, Kiss P, Farkas J, Reglodi D, Shioda S (2016) PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion. *Nat Commun* 7:12034.
- Nandha KA, Benito-Orfila MA, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR (1991) Action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on the rat vascular system: Effects on blood pressure and receptor binding. *J Endocrinol* 129:69–73.
- Németh A, Szabadfi K, Fülöp B, Reglodi D, Kiss P, Farkas J, Szalontai B, Gábel R, Hashimoto H, Tamás 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.
- 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.
- Ogawa T, Nakamachi T, Ohtaki H, Hashimoto H, N S, Baba A, Watanabe J, Kikuyama S, Shioda S (2005) Monoaminergic neuronal development is not affected in PACAP-gene-deficient mice. *Regul Pept* 126:103–108.
- 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 U S A* 103:7488–7493.
- Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Shioda S (2008) Role of PACAP in ischemic neural death. *J Mol Neurosci* 36:16–25.
- Orrenius S, McCabe MJ, Nicotera P (1992) Ca(2+)-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol Lett* 64-65 Spec No:357–364.
- Palkovits M, Somogyvári-Vigh A, Arimura A (1995) Concentrations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in human brain nuclei. *Brain Res* 699:116–120.
- Puel JL (1995) Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Prog Neurobiol* 47:449–476.
- Pujol R, Puel JL (1999) Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: A review of recent findings. In: *Ann N Y Acad Sci*, pp 249–254.
- Pujol R, Puel JL, D'aldin CG, Eybalin M (1993) Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea. *Acta Otolaryngol* 113:330–334.
- Rác B, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F, Tamás A, Józsa R, Lubics A, Kiss P, Róth E, Ferencz A, Tóth G, Hegyi O, Wittmann I, Lengvári I, Somogyvári-Vigh A, Reglodi D (2007) Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol* 153:115–123.
- Rác B, Gasz B, Gallyas F, Kiss P, Tamás A, Szántó Z, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Hegyi O, Róth E, Reglodi D (2008) PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regul Pept* 145:105–115.
- Rác B, Horváth G, Reglodi D, Gasz B, Kiss P, Gallyas F, Sümegi B, Tóth G, Németh A, Lubics A, Tamás A (2010a) PACAP ameliorates oxidative stress in the chicken inner ear: An in vitro study. *Regul Pept* 160:91–98.
- Rác B, Reglodi D, Horváth G, Szigeti A, Balatonyi B, Róth E, Wéber G, Alotti N, Tóth G, Gasz B (2010b) Protective effect of PACAP against doxorubicin-induced cell death in cardiomyocyte culture. *J Mol Neurosci* 42:419–427.

- Rangarajan A, Syal R, Selvarajah S, Chakrabarti O, Sarin A, Krishna S (2001) Activated Notch1 signaling cooperates with papillomavirus oncogenes in transformation and generates resistance to apoptosis on matrix withdrawal through PKB/Akt. *Virology* 286:23–30.
- Reglődi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gábel R, Horváth G, Szakály P, Sándor B, Lubics A, László E, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, Helyes Z, Welke L, Lakatos A, Tamás A (2012) PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. *J Mol Neurosci* 48:482–492.
- Reglődi D, Atlasz T, Szabó E, Jüngling A, Tamás A, Juhász T, Fülöp BD, Bárdosi A (2018a) PACAP deficiency as a model of aging. *GeroScience* 40:437–452.
- Reglődi D, Cseh S, Somoskői B, Fülöp BD, Szentlélek E, Szegezki V, Kovács A, Varga A, Kiss P, Hashimoto H, Tamás A, Bárdosi A, Manavalan S, Bakó E, Zákány R, Juhász T (2018b) Disturbed spermatogenic signaling in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-deficient mice. *Reproduction* 155:129–139.
- Reglődi D, Jüngling A, Longuespée R, Kriegsmann J, Casadonte R, Kriegsmann M, Juhász T, Bárdosi S, Tamás A, Fülöp BD, Kovács K, Nagy Z, Sparks J, Miseta A, Mazzucchelli G, Hashimoto H, Bárdosi A (2018c) Accelerated pre-senile systemic amyloidosis in PACAP knockout mice - a protective role of PACAP in age-related degenerative processes. *J Pathol* 245:478–490.
- Reglődi D, Kiss P, Lubics A, Tamás A (2011) Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des* 17:962–972.
- Reglődi D, Tamás A eds. (2016) Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP. New York: Springer, Cham.
- Reglődi D, Váczy A, Rubio-Beltran E, MaassenVanDenBrink A (2018d) Protective effects of PACAP in ischemia. *J Headache Pain* 19:19.
- Reuss S, Disque-Kaiser U, Antoniou-Lipfert P, Gholi MN, Riemann E, Riemann R (2009) Neurochemistry of olivocochlear neurons in the hamster. *Anat Rec* 292:461–471.
- Riera-Sala C, Molina-Mira A, Marco-Algarra J, Martínez-Soriano F, Olucha FE (2001) Inner ear lesion alters acoustically induced c-Fos expression in the rat auditory rhombencephalic brainstem. *Hear Res* 162:53–66.
- Ross-Ascuitto NT, Ascuitto RJ, Ramage D, Kydon DW, Coy DH, Kadowitz PJ (1993) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a neuropeptide with potent inotropic and coronary vasodilatory effects in neonatal pig hearts. *Pediatr Res* 34:323–328.
- Sade H, Krishna S, Sarin A (2004) The anti-apoptotic effect of Notch-1 requires p56lck-dependent, Akt/PKB-mediated signaling in T cells. *J Biol Chem* 279:2937–2944.
- Saetrum Opgaard O, Knutsson M, De Vries R, Tom B, Saxena PR, Edvinsson L (2001) Vasoactive intestinal peptide has a direct positive inotropic effect on isolated human myocardial trabeculae. *Clin Sci* 101:637–643.
- Salt AN, DeMott J (1994) Endolymph calcium increases with time after surgical induction of hydrops in guinea-pigs. *Hear Res* 74:115–121.
- Sándor B, Fintor K, Felszeghy S, Juhász T, Reglődi D, Márk L, Kiss P, Jüngling A, Fülöp BD, Nagy AD, Hashimoto H, Zákány R, Nagy A, Tamás 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.
- Sándor B, Fintor K, Reglődi D, Fülöp DB, Helyes Z, Szántó I, Nagy P, Hashimoto H, Tamás A (2016) Structural and morphometric comparison of lower incisors in PACAP-deficient and wild-type mice. *J Mol Neurosci* 59:300–308.

- Sárszegi Z, Szabó D, Gaszner B, Kónyi A, Reglődi D, Németh J, Lelesz B, Polgár B, Jüngling A, Tamás A (2019) Examination of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a potential biomarker in heart failure patients. *J Mol Neurosci* 68:368–376.
- Schwartz I (1992) The superior olivary complex and lateral lemniscal nuclei. In: *The mammalian auditory pathway: neuroanatomy*. (Webster D, Popper A, Fay R, eds), pp 117–167. New York: Springer.
- Seidman MD, Vivek P (2004) Intratympanic treatment of hearing loss with novel and traditional agents. *Otolaryngol Clin North Am* 37:973–990.
- Sheffield AM, Smith RJH (2018) The epidemiology of deafness. *Cold Spring Harb Perspect Med*:a033258.
- Shintani N, Suetake S, Hashimoto H, Koga K, Kasai A, Kawaguchi C, Morita Y, Hirose M, Sakai Y, Tomimoto S, Matsuda T, Baba A (2005) Neuroprotective action of endogenous PACAP in cultured rat cortical neurons. *Regul Pept* 126:123–128.
- Shioda S, Shuto Y, Somogyvari-Vigh A, Legradi G, Onda H, Coy DH, Nakajo S, Arimura A (1997) Localization and gene expression of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the rat brain. *Neurosci Res* 28:345–354.
- 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.
- Sterkers O, Ferrary E, Amiel C (1984) Inter- and intracompartmental osmotic gradients within the rat cochlea. *Am J Physiol* 247:F602–606.
- Strange-Vognsen HH, Arnbjerg J, Hannibal J (1997) Immunocytochemical demonstration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the porcine epiphyseal cartilage canals. *Neuropeptides* 31:137–141.
- Syed AU, Koide M, Braas KM, May V, Wellman GC (2012) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) potently dilates middle meningeal arteries: Implications for migraine. *J Mol Neurosci* 48:574–583.
- Szakály P, László E, Kovács K, Rác B, Horváth G, Ferencz A, Lubics A, Kiss P, Tamás A, Brubel R, Opper B, Baba A, Hashimoto H, Farkas J, Matkovits A, Magyarlaci T, Helyes Z, Reglődi D (2011) Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) show increased susceptibility to in vivo renal ischemia/reperfusion injury. *Neuropeptides* 45:113–121.
- Szántó Z, Sárszegi Z, Reglődi D, Németh J, Szabadfi K, Kiss P, Varga A, Bánki E, Csanaky K, Gaszner B, Pintér O, Szalai Z, Tamás A (2012) Pacap immunoreactivity in human malignant tumor samples and cardiac diseases. *J Mol Neurosci* 48:667–673.
- Takagi H, Saito H, Nagase S, Suzuki M (2004) Distribution of fos-like immunoreactivity in the auditory pathway evoked by bipolar electrical brainstem stimulation. *Acta Otolaryngol* 124:907–913.
- Tamás A, Szabadfi K, Németh A, Fülöp B, Kiss P, Atlasz T, Gábrriel R, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Helyes Z, Reglődi D (2012) Comparative examination of inner ear in wild type and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. *Neurotox Res* 21:435–444.
- Thesleff I (2006) The genetic basis of tooth development and dental defects. *Am J Med Genet A* 140:2530–2535.
- Thompson AM, Schofield BR (2000) Afferent projections of the superior olivary complex. *Microsc Res Tech* 51:330–354.
- Thompson AM, Thompson GC (1993) Relationship of descending inferior colliculus projections to olivocochlear neurons. *J Comp Neurol* 335:402–412.
- Tombal B, Denmeade SR, Gillis J-M, Isaacs JT (2002) A supramicromolar elevation of intracellular free calcium ([Ca²⁺]_i) is consistently required to induce the execution phase of apoptosis. *Cell Death Differ* 9:561–573.

- Tomimoto S, Ojika T, Shintani N, Hashimoto H, Hamagami KI, Ikeda K, Nakata M, Yada T, Sakurai Y, Shimada T, Morita Y, Ishida C, Baba A (2008) Markedly reduced white adipose tissue and increased insulin sensitivity in Adcyap1-deficient mice. *J Pharmacol Sci* 107:41–48.
- Tong L, Altschuler RA, Genene Holt A (2005) Tyrosine hydroxylase in rat auditory midbrain: Distribution and changes following deafness. *Hear Res* 206:28–41.
- Tsuchikawa D, Nakamachi T, Tsuchida M, Wada Y, Hori M, Farkas J, Yoshikawa A, Kagami N, Imai N, Shintani N, Hashimoto H, Atsumi T, Shioda S (2012) Neuroprotective effect of endogenous pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide on spinal cord injury. *J Mol Neurosci* 48:508–517.
- Tucker A, Sharpe P (2004) The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet* 5:499–508.
- Tziridis K, Buerbank S, Eulenburg V, Długaiczek J, Schulze H (2017) Deficit in acoustic signal-in-noise detection in glycine receptor $\alpha 3$ subunit knockout mice. *Eur J Neurosci* 45:581–586.
- Váczy A, Kóvári P, Kovács K, Farkas K, Szabó E, Kvárik T, Kocsis B, Fülöp B, Atlasz T, Reglődi D (2018) Protective role of endogenous PACAP in inflammation-induced retinal degeneration. *Curr Pharm Des* 24:3534–3542.
- Vámos Z, Ivic I, Cséplő P, Tóth G, Tamás A, Reglődi D, Koller Á (2014) Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) induces relaxations of peripheral and cerebral arteries, which are differentially impaired by aging. *J Mol Neurosci* 54:535–542.
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BKC, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H (2009) Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 61:283–357.
- Villalba M, Bockaert J, Journot L (1997) Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *J Neurosci* 17:83–90.
- Wallengren J (1997) Vasoactive peptides in the skin. In: *J Investig Dermatol Symp Proc*, pp 49–55.
- Wang X-P, 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.
- Waschek JA (2002) Multiple actions of pituitary adenylyl cyclase activating peptide in nervous system development and regeneration. *Dev Neurosci* 24:14–23.
- Watanabe J, Seki T, Shioda S (2016) PACAP and neural development. In: *Pituitary Adenylyl Cyclase Activating Polypeptide – PACAP* (Reglődi D, Tamás A, eds), pp 65–82. New York: Springer, Cham.
- White SL, May V, Braas KM (2000) Organization of the rat PACAP gene. *Ann N Y Acad Sci* 921:370–372.
- Wojcieszak J, Zawilska JB (2014) PACAP38 and PACAP6-38 exert cytotoxic activity against human retinoblastoma Y79 cells. *J Mol Neurosci* 54:463–468.
- Yamada K, Matsuzaki S, Hattori T, Kuwahara R, Taniguchi M, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kumamoto N, Yamada K, Yoshikawa T, Katayama T, Tohyama M (2010) Increased stathmin1 expression in the dentate gyrus of mice causes abnormal axonal arborizations. *PLoS One* 5:e8596.
- 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.
- 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.

IX. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények és a szerző további publikációi

9.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Fülöp DB**, Humli V, Szepesy J, Ott V, Reglődi D, Gaszner B, Németh A, Szirmai A, Tamás L, Hashimoto H, Zelles T, Tamás A (2019) Hearing impairment and associated morphological changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. *Sci Rep* 9:14598. (megosztott elsőszerzős cikk. IF: 4,116/2=2,058; Q1 in Multidisciplinary)
2. **Fülöp BD**, Sándor B, Szentlélek E, Karanyicz E, Reglődi D, Gaszner B, Zákány R, Hashimoto H, Juhász T, Tamás A (2019) Altered Notch signaling in developing molar teeth of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. *J Mol Neurosci* 68(3):377-388 (IF: 2,544; Q1 in Medicine miscellaneous)
3. Ivic I, **Fülöp BD**, Juhász T, Reglődi D, Tóth G, Hashimoto H, Tamás A, Koller Á (2017) Backup mechanisms maintain PACAP/VIP-induced arterial relaxations in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-deficient mice. *J Vasc Res* 54(3):180-192. (IF: 2,404; Q1 in Cardiology and Cardiovascular Medicine)
4. **Fülöp BD**, Reglődi D, Németh A, Tamás A (2016) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the auditory system. In: *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide – PACAP* (Reglődi D, Tamás A, eds), pp 529–549. New York: Springer, Cham. (könyvfejezet)

*Ezen közlemények összesített impakt faktora 9,064,
a társ-elsőszerzős közlemény megosztása után: 7,006.*

9.2. A szerző további társszerzős közleményei

1. Tamás A, Szabadfi K, Németh A, **Fülöp B**, Kiss P, Atlasz T, Gábrriel R, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Helyes Z, Reglődi D (2012) Comparative examination of inner ear in wild type and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. *Neurotox Res* 21:435–444. (IF: 3,251)
2. Németh A, Szabadfi K, **Fülöp B**, Reglődi D, Kiss P, Farkas J, Szalontai B, Gábrriel R, Hashimoto H, Tamás 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(1):57–67. (IF: 4,181)
3. Sándor B, Fintor K, Felszeghy S, Juhász T, Reglődi D, Márk L, Kiss P, Jüngling A, **Fülöp BD**, Nagy AD, Hashimoto H, Zákány R, Nagy A, Tamás 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(3):331–341. (IF: 2,531)
4. László E, Varga A, Kovács K, Jancsó G, Kiss P, Tamás A, Szakály P, **Fülöp B**, Reglődi D (2015) Ischemia/reperfusion-induced kidney injury in heterozygous PACAP-deficient mice. *Transplant Proc.* 47(7):2210–2215. (IF: 1,036)

5. Tamás A, Jávornágy A, Reglődi D, Sarlós DP, Bányai D, Semjén D, Németh J, Lelesz B, **Fülöp DB**, Szántó Z (2016) Examination of PACAP-like immunoreactivity in urogenital tumor samples. *J Mol Neurosci* 59(2):177–183. (IF: 2,281)
6. Sándor B, Fintor K, Reglődi D, **Fülöp DB**, Helyes Z, Szántó I, Nagy P, Hashimoto H, Tamás A (2016) Structural and morphometric comparison of lower incisors in PACAP-deficient and wild-type mice. *J Mol Neurosci* 59(2):300–308. (IF: 2,281)
7. Egri P, Fekete C, Dénes A, Reglődi D, Hashimoto H, **Fülöp BD**, Gereben B (2016) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) regulates the hypothalamo-pituitary-thyroid (HPT) axis via type 2 deiodinase in male mice. *Endocrinology* 157(6):2356–2366. (IF: 4,286)
8. Farkas J, Sándor B, Tamás A, Kiss P, Hashimoto H, Nagy AD, **Fülöp BD**, Juhász T, Manavalan S, Reglődi D (2017) Early neurobehavioral development of mice lacking endogenous PACAP. *J Mol Neurosci* 61(4):468–478. (IF: 2,637)
9. Ivic I, Solymár M, **Fülöp BD**, Hashimoto H, Tóth G, Tamás A, Juhász T, Koller Á, Reglődi D (2017) Aging-induced modulation of pituitary adenylate cyclase-activating peptide- and vasoactive intestinal peptide-induced vasomotor responses in the arteries of mice. *J Vasc Res* 54(6):359–366. (IF: 2,404)
10. Heimesaat MM, Reifenger G, Vicena V, Illés A, Horváth G, Tamás A, **Fülöp BD**, Bereswill S, Reglődi D (2017) Intestinal microbiota changes in mice lacking pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) - bifidobacteria make the difference. *Eur J Microbiol Immunol* 7(3):187–199.
11. Váczy A, Kóvári P, Kovács K, Farkas K, Szabó E, Kvárik T, Kocsis B, **Fülöp B**, Atlasz T, Reglődi D (2018) Protective role of endogenous PACAP in inflammation-induced retinal degeneration. *Curr Pharm Des* 24(30):3534–3542. (IF: 2,425)
12. Török D, Somoskői B, Reglődi D, Tamás A, **Fülöp B**, Cseh S (2018) Hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid hatása nőstény egerek ciklusára és az embriófejlődésre - Előzetes eredmények *Magyar Állatorvosok Lapja* 140:(3):181–187. (IF: 0,143)
13. Solymár M, Ivic I, Balaskó M, **Fülöp BD**, Tóth G, Tamás A, Reman G, Koller Á, Reglődi D (2018) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ameliorates vascular dysfunction induced by hyperglycaemia. *Diab Vasc Dis Res* 15:(4):277–285. (IF: 2,252)
14. Reglődi D, Cseh S, Somoskői B, **Fülöp B**, Szentlélek E, Szegeczki V, Kovács A, Varga A, Kiss P, Hashimoto H, Tamás A, Bárdosi A, Manavalan S, Bakó E, Zákány R, Juhász T (2018) Disturbed spermatogenic signaling in PACAP deficient mice. *Reproduction* 155:(2):127–137. (IF: 3,151)
15. Reglődi D, Tamás A, Jüngling A, Váczy A, Rivnyák A, **Fülöp BD**, Szabó E, Lubics A, Atlasz T (2018) Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide against neurotoxic agents. *Neurotoxicology* 66:185–194. (IF: 3,203)
16. Reglődi D, Jüngling A, Longuespee R, Kriegsmann J, Casadonte R, Kriegsmann M, Juhász T, Bárdosi S, Tamás A, **Fülöp BD**, Kovács K, Nagy Z, Sparks J, Miseta A, Mazzucchelli G, Hashimoto H, Bárdosi A (2018) Accelerated pre-senile systemic amyloidosis in PACAP knockout mice - a protective role of PACAP in age-related degenerative processes. *J Pathol* 245:(4) pp. 478–490. (IF: 5,781)
17. Lajkó A, Meggyes M, **Fülöp BD**, Gede N, Reglődi D, Szereday L (2018) Comparative analysis of decidual and peripheral immune cells and immune-checkpoint molecules during pregnancy in wild-type and PACAP-deficient mice. *Am J Reprod Immunol* 80:(4):e13035. (IF: 3,172)
18. Józsa G, Szegeczki V, Pálfi A, Kiss T, Helyes Zs, **Fülöp B**, Cserhádi Cs, Daróczi L, Tamás A, Zákány R, Reglődi D, Juhász T (2018) Signalling alterations in bones of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene deficient mice. *Int J Mol Sci* 19:(9):e2538. (IF: 4,207)
19. Reglődi D, Atlasz T, Szabó E, Jüngling A, Tamás A, Juhász T, **Fülöp BD**, Bárdosi A (2018) PACAP deficiency as a model of aging. *Geroscience* 40(5-6):437–452. Review.

20. Szegezcki V, Bauer B, Jüngling A, **Fülöp BD**, Vágó J, Perényi H, Tarantini S, Tamás A, Zákány R, Reglődi D, Juhász T (2019) Age-related alterations of articular cartilage in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene-deficient mice *Geroscience* 41:6:775–793. (IF: 4,361)
21. Ivic I, Balaskó M, **Fülöp BD**, Hashimoto H, Tóth G, Tamás A, Juhász T, Koller Á, Reglődi D, Solymár M (2019) VPAC1 receptors play a dominant role in PACAP-induced vasorelaxation in female mice *PLoS One* 14(1):e0211433. (IF: 2,875)
22. Meggyes M, Lajkó A, **Fülöp BD**, Reglődi D, Szereday L (2019) Phenotypic characterization of testicular immune cells expressing immune checkpoint molecules in wild-type and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-deficient mice. *Am J Reprod Immunol.* 22:e13212. (IF: 3,172)
23. Józsa G, **Fülöp B**, Kovács L, Czibere B, Szegezcki V, Kiss T, Hajdú T, Tamás A, Helyes Zs, Zákány R, Reglődi D, Juhász T (2020) Lack of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) disturbs callus formation. *J Mol Neurosci* doi: 10.1007/s12031-019-01448-z. [Epub ahead of print] (IF: 2,544)

A szerző kumulatív impakt faktora: 71,24

9.3. A szerző társszerzős könyvfejezete

1. Horváth G, Illés A, Heimesaat M, Bárdosi A, Bárdosi S, Tamás A, **Fülöp BD**, Opper B, Nemeth J, Ferencz A, Reglődi D (2016) Protective intestinal effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. In: *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, Springer International Publishing, pp. 271–288. ISBN: 978-3-319-35133-9.