

***A PACAP ELŐFORDULÁSA A REPRODUKTÍV
RENDSZERBEN ÉS HATÁSAI TROPHOBLAST SEJTEK
TÚLÉLÉSÉRE ÉS JELÁTVITELI ÚTVONALAIRA***

Doktori (PhD.) értekezés tézisei

Dr. Brubel Réka

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai Intézet

Témavezetők:

Dr. Reglódi Dóra
egyetemi docens

Dr. Lubics Andrea
egyetemi adjunktus

Programvezető:

Dr. Csernus Valér
egyetemi tanár

Bevezetés

Hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet, vagy angol neve alapján mozaikszóval PACAP-ot (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide), 1989-ben izolálták birka hypothalamusból, patkány hypophysisben kifejtett adenilát cikláz aktiváló hatása alapján. A PACAP a szekretin/glukagon/vazoaktív intestinális polipeptid (VIP) peptidsalád tagja, melynek N-terminális szakasza (1-28) 68 %-ban megegyezik a VIP struktúrájával, de adenilát-cikláz aktiváló hatása 1000-10000-szer nagyobb a VIP hatásánál. 1990-ben azonosították 27 aminosavból felépülő, rövidebb fragsmét, a PACAP27-et. A szervezetben két biológiailag aktív amidált forma kb. 90%-át a 38 aminosavból álló PACAP38, a kisebb részét a PACAP27 teszi ki. A peptidet a dipeptidil-peptidáz IV (DPP IV) bontja le, és nagyon rövid felezési ideje van testfolyadékokban. A degradáció során N-terminális rövidebb peptidok keletkeznek, melyek már biológiailag nem aktívak. Az N-terminális vég szükséges a biológiai aktivitáshoz, de a receptorkötéshez nem. Az így keletkezett peptidok, például a DPP IV által előállított PACAP3-38, a legtöbb esetben antagonistaként viselkednek. Ezen rövidebb fragsmek közül a leghatásosabb antagonistá a PACAP6-38.

A PACAP előfordulása a szervezetben

A PACAP a központi idegrendszerben legnagyobb mennyiségben a hypothalamusban mutatható ki. Más struktúrákban, így az agykéregben, a középgagyban, a nyúltvelőben, a basalis ganglionokban, a thalamusban, a hypophysisben, a septumban, a hippocampus CA1-3 zónáiban, az amygdala centrális magjában, a cerebellumban és a retina különböző rétegeiben is vannak PACAP tartalmú sejtek és rostok. A perifériás idegrendszerben a spinális ganglionok kis érzőidegsejtjei, valamint a vegetatív prae- és postganglionáris neuronok tartalmazzák PACAP-ot.

A PACAP nemcsak a központi és perifériás idegrendszerben található meg, hanem más szövetekben is. Többek között az endokrin szervekben és a gastrointestinalis traktus teljes hosszában. A peptidet kimutatták többek között az adenohypophysisben, a

mellékvesében, az endokrin pancreasban és a mellékpajzsmirigyben. Ezen kívül megtalálható a kiválasztó rendszerben és a légzőrendszerben.

PACAP-receptorok

A PACAP hatását a szervezetben G-protein kötött receptorok közvetítik. A PAC1 receptor két-három nagyságrenddel nagyobb affinitással köti a PACAP-ot, mint a VIP-et, míg a VPAC-1 és VPAC-2 receptorok mindkét peptidet egyforma erősséggel kötik. A PACAP-ot nagyobb affinitással kötő PAC1 receptor típusok megtalálhatóak a központi idegrendszerben (a hypothalamus különböző területein, a cortexben, a thalamusban, a mesencephalonban, a ponsban és a kisagyban), az adenohipophysisben, a mellékvesevelőben és a herében.

A PACAP gonadális funkciókra kifejtett hatásai

A PACAP-nak a hypophysis hormonok szekréciójára kifejtett hatását már röviddel a felfedezését követően kimutatták. A peptid a GnRH-val interakcióban a gonadális funkciók központi szabályozásában vesz részt. Későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy a PACAP közvetlenül a gonadális sejtekre kifejtett hatással is rendelkezik, és fontos szerepet tölt be a genitális rendszerben. Immunhisztokémiai módszerekkel kimutatták a PACAP-ot és receptorait az ovariumban, ahol a PACAP fontos szerepet játszik a ovariális szteroidszintézisben, a tüszőérés szabályozásában és a granulosa sejtek proliferációjában. Ezen kívül a PACAP kimutatható a vaginában és az uterusban is. Valószínűleg az uteroplacentáris egység működésének szabályozásában is fontos szerepe van, mivel relaxációt okoz a bolyhok és a myometrium ereiben. A PACAP terhességben betöltött fontos szerepét támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a PACAP-knockout egerek fertilitása csökken. Az endometriumban a PACAP expresszió a decidualizáció és a terhesség során változik.

A PACAP protektív hatásának molekuláris mechanizmusai

A citoprotektív hatásokért csaknem minden esetben a PAC1 receptor felelős. A PACAP a PAC1 receptorokon keresztül aktiválja az adenilát cikláz és a foszfolipáz C-t, melyek hatására cAMP- függő és attól független útvonalak aktiválódnak. A PKA aktiváció

hatására általában a védő hatású MAPK, az ERK foszforiláció megemelkedik, a sejtpusztulást elősegítő JNK és p38MAPK foszforiláció pedig gátlódik.

Célkitűzések

- A PACAP27 és PACAP38 kimutatása illetve koncentrációváltozásának meghatározása az érett, humán placentából (anyai centrális és perifériás, illetve magzati centrális és perifériás placentarészekből), köldökzsinórból illetve 9 hetes abortumokból.
- PACAP38 kimutatása MALDI TOF tömegspektrométer segítségével különböző humán reprodukív rendszerből származó mintákból.

3. PACAP1-38 és PACAP6-38 kezelés hatásának vizsgálata JAR sejtek (choriocarcinomás cytotrophoblast) jelátviteli útvonalaira illetve túlélésére normál körülmények között, H₂O₂ indukálta oxidatív stresszben, CoCl₂, lipopoliszacharid és etanol indukálta *in vitro* hypoxiában és citosztatikus kezelést követően.

Formázott: Felsorolás és számozás

4. PACAP1-38 és PACAP6-38 kezelés hatásának vizsgálata HIPEC sejtek (extravillosus cytotrophoblast) túlélésére normál körülmények között és citosztatikus kezelés hatására, illetve ezen sejtvonal inváziójára és proliferációjára.

Formázott: Felsorolás és számozás

Anyagok és módszerek

A PACAP előfordulása a placentában

A vizsgálat alapjául szolgáló mintákat 9 hetes humán abortumokból (n=7) és humán érett placentákból (n=6) nyertük. A vizsgálat során különbséget tettünk a magzati oldalon elhelyezkedő chorionboholy, és az anyai oldalt reprezentáló decidua között. Mindkét esetben a placenta perifériás és centrális részéből egyaránt vettünk mintákat. Ezen kívül köldökzsinórból (n=6) is meghatároztuk a PACAP38 és a PACAP27 koncentrációját. Első lépésben megmértük a szövetminták súlyát, majd jéghideg desztillált vízzel

homogenizáltuk azokat. A homogenátumot lecentrifugáltuk (12000 rpm, 4 °C, 30 min), a felülúszót radioimmunoassay (RIA) módszerrel dolgoztuk fel, és meghatároztuk a PACAP38 illetve a PACAP27 koncentrációját.

RIA módszer leírása röviden

Antiszérum: Az általunk használt PACAP38 antiszérumot carbodiimide által konjugált Cys²³-PACAP24-28 és borjú thyreoglobulin antigén ellen termeltetik nyúlban. A PACAP27 esetén a „88123-3” számú antiszérumot használtuk 1:45000 hígításban. *Jelöletlen antigén:* Saját laboratóriumban készült mono-¹²⁵I izotóppal jódozott birka PACAP24-38 és birka PACAP27 (5000 cpm/ tubus). *Standard:* A RIA mérés során birka PACAP27 illetve PACAP38 peptidet (Sigma) használtunk standardként 0-1000 fmol/ml tartományban. *Pufferoldat (assay-puffer):* A RIA tesztekhez 1 ml 0,05 mol/l koncentrációjú (pH 7.4) foszfát pufferben végeztük. Az oldat összetevői: 0,25 % (w/v) BSA, 0,1 mol/l NaCl, 0,05 % (w/v) NaN₃. *Immunoassay eljárás (Radioimmunoassay-k menete):* a polipropilén RIA csövekbe (Merck) duplikátumban az alábbi inkubációs elegyet mértük be: 100 µl PACAP 27 vagy PACAP 38 standard, ill. mérni kívánt/ismeretlen minta, 100 µl antiszérum „88111-3” PACAP38 (1: 10000 hígításban), vagy „88123-3” PACAP27 (1:45000 hígításban), 100 µl (kb. 5000 cpm) ¹²⁵I izotóppal jelölt PACAP24-38 vagy PACAP27, assay-puffer. A mintákat az összekeverést követően 4 °C-on 48-72 óráig inkubáltuk. Ez után az antitesthez kötött jelölt antigén frakciót elválasztottuk a szabad jelölt peptidektől oly módon, hogy csövenként 100 µl szeparáló oldatot mértünk hozzá, melynek összetétele: 10 g mosott szén, 1 g dextrán, 0,5 g zsírmentes tejpor, 100 ml desztillált víz. A csöveket 4 °C-on 15 percig 3000 rpm-en centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük, és itatospapírral leitattuk. A szénhez kötődött szabad peptidfrakció radioaktivitását (gammaszugárzást) NZ310 típusú spektrométeren megmértük. Ebből következtethetünk az ellenanyaghoz kötött radioaktivitás értékére, majd egy kalibrációs görbéről leolvashatjuk az ismeretlen minta PACAP38 vagy PACAP27 koncentrációját.

Tömegspektrometriai vizsgálatok

A tömegspektrometriai kísérletekhez a mintákat (tűszőfolyadék, magzatvíz, hüvelyváladék) rutin nőgyógyászati vizsgálatok alkalmával nyertük. A mintavételek külön beavatkozást nem igényeltek, az Intézmény Etikai Bizottság Kódex szabályainak betartásával történtek. A mintákhoz minden esetben peptidázgátlót (aprotinin) adtunk (30 μ l/ml), kivéve a hüvelyváladékot, orrváladékot és nyálat, amik gyűjtése filter papírra történt. A tűszőfolyadékot önkéntes nőbetegektől nyertük (20-35 év között, n=40), akiknél kontrollált petefészek hyperstimulálás után mesterséges megtermékenyítés miatt tűszőfolyadék punkciót végeztek. A mintához (100 μ l) hozzáadtunk 10 μ l 72%-os triklórecetsavat és 100 μ l desztillált vizet, majd lecentrifugáltunk (13000 rpm, 10 min).

A magzatvizet önkéntes várandósoktól nyertük a 16. terhességi héten végzett amniocentesis során, melynek oka a 35 év feletti anyai életkor volt (n=25). A mintákból 200 μ l mennyiséget lecentrifugáltunk (10000 rpm, 5 min), a felülúszót 100 μ l 1%-os trifluorecetsavval (TFA) savanyítottuk, majd ismét centrifugáltuk (13000 rpm, 10 min).

A további tisztítás céljára C18-as bevonatú Zip-Tip pipettahegyet (Millipore) használtunk. A vizsgálni kívánt polipeptidet a Zip-Tip felszíne megkötötte, majd innen a protokollnak megfelelően leoldva közvetlenül detektáltuk. A Zip-Tip felszínéről történő közvetlen leoldást 50%-os acetonitril és 0,1%-os TFA 1:1 arányú keverékével végeztük.

A hüvelyváladék (n=10) gyűjtéséhez steril filter papírcsíkokat (Schirmer papír, Mediker) használtunk, a mintaadók a ciklusuk progeszteron fázisában voltak. A papírcsíkok hüvelyváladékkal való átítatása minden esetben egy steril csipesszel történt, amivel a filter papírcsíkot a hüvely falához illesztettük 10 másodpercig.

A humán orrváladék (n=10, 20-40 év közöttiek) és nyál (n=10, 20-40 év közöttiek) mintákat önkéntesektől nyertük steril filter papírcsíkok (Schirmer papír Mediker) használatával.

A humán csarnokvizet (n=10, 65-85 év közöttiek) önkéntesektől nyertük szürkehályog miatti műtét alkalmával.

A natív mintáinkat, illetve a PACAP-38 vizes oldatú standardjének (Sigma-Aldrich) 1–1 μ l-ét felvittük a Bruker rozsdamentes acél mintatartó tálcára (MTP 384 massive target T, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Vizsgálataink során mátrixként α -ciano-4-

hidroxí-fahéjsav (CHCA) telített 0,1 %-os trifluor-ecetsav (TFA) – acetonitril (2/1 V/V) oldatát alkalmaztuk, melyből mintáinkhoz 1-1 µl-t csepegtettünk. Kalibráló oldatként minden esetben a Bruker Peptidkalibráló Standardot alkalmaztuk (#206195 Peptide Calibration Standard; Bruker Daltonics). A minták beszáradását követően az elemzéseket a már fent említett Bruker Daltonics Autoflex II típusú MALDI TOF/TOF tömegspektrométerrel reflektor detektálási módban végeztük el. Az ionizáláshoz 337 nm-es nitrogén lézert alkalmaztunk (MNL-205MC model; LBT- Lasertechnik Berlin GmbH.; Berlin; Németország), ennek frekvenciája 50 Hz, a gyorsító feszültség 20 kV és a késleltetési idő pedig 120 ns volt. A tömegspektrumokat pozitív ionizációs módban 1000 és 10000 m/z tartomány között regisztráltuk. Minden minta esetében a peptidkeverékre jellemző tömegspektrumokat (1000 lövés/minta) összesítettük. A műszer ellenőrzését Bruker FlexContol 2.4 szoftverrel, az értékelést pedig Bruker FlexAnalysis 2.4 szoftverrel végeztük.

Sejtkultúra

Immortalizált sejtvonalak

Kísérleteink során JAR sejteket illetve HIPEC sejteket használtunk. A JAR sejtek choriocarcinomás cytotrophoblast sejtek, tenyésztésük RPMI-1640 médiumban történik. A HIPEC sejtek extravillosus cytotrophoblast sejtek, ezek tenyésztését DMEM médiumban végeztük.

Sejtek életképességének vizsgálata

A JAR sejtek életképességének vizsgálatához kolorimetrikus MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) tesztet használtunk. A sejteket egy 96-lyukú tenyésztő edénybe választottuk szét, ahol a kezdeti koncentráció 10^4 sejt/200 µl médium/lyuk volt. Ezt követően egy éjszakán át tenyésztettük őket RPMI médiumban.

A; PACAP38 hatása JAR sejtekre különböző toxikus hatások esetében

A sejteket tizenkét különböző csoportra osztottuk: 1.) a.) kezelésben nem részesült csoport b.) 100 nM PACAP 38-al kezelt csoport. 2.) a.) 0,45 mM H₂O₂ -dal kezelt

csoport, b.) 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 0,45 mM H₂O₂-dal kezelt csoport. 3.) a.) 0,9 mM H₂O₂-dal kezelt csoport, b.) 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 0,9 mM H₂O₂-dal kezelt csoport. 4.) a.) 75 μM CoCl₂-dal kezelt csoport, b.) 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 75 μM CoCl₂-dal kezelt csoport. 5.) a.) 1 μg/ml lipopoliszacharid-al (LPS) kezelt csoport, b.) 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 1 μg/ml lipopoliszacharid-al (LPS) kezelt csoport. 6.) a.) 200 mM etanollal kezelt csoport, b.) 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 200 mM etanollal kezelt csoport.

A kontroll sejteket nem kezeltük előzetesen PACAP38-al, azonban azon sejtcsoportok esetében, melyek 9 órán keresztül különböző toxikus hatásoknak voltak kitéve, 1 órával az expozíció előtt 100 nM PACAP38 kezelést is végeztünk.

B; PACAP38 hatása JAR sejtekre citosztatikus kezelés esetében

24.) A sejteket huszonnégy különböző csoportra osztottuk: 1.) kezelésben nem részesült csoport, 2.) 100 nM PACAP1-38-al kezelt csoport, 3.) 1 μM PACAP6-38-al kezelt csoport 4.) 100 nM PACAP1-38-al és 1 μM PACAP6-38-al kezelt csoport, 5.) 10 μM MTX-al kezelt csoport, 6.) 100 nM PACAP1-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport 7.) 1 μM PACAP6-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport, 8.) 100 nM PACAP1-38-al, 1 μM PACAP6-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport 9.) 100 μM MTX-al kezelt csoport, 10.) 100 nM PACAP1-38-al és 100 μM MTX-al kezelt csoport, 11.) 1 μM PACAP6-38-al és 100 μM MTX-al kezelt csoport, 12.) 100 nM PACAP1-38-al, 1 μM PACAP6-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport, 13.) kezelésben nem részesült csoport, 14.) 1 nM PACAP1-38-al kezelt csoport, 15.) 100 nM PACAP6-38-al kezelt csoport, 16.) 1 nM PACAP1-38-al és 100 nM PACAP6-38-al kezelt csoport, 17.) 10 μM MTX-al kezelt csoport, 18.) 1 nM PACAP1-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport, 19.) 100 nM PACAP6-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport, 20.) 1 nM PACAP1-38-al, 100 nM PACAP6-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport, 21.) 100 μM MTX-al kezelt csoport, 22.) 1 nM PACAP1-38-al és 100 μM MTX-al kezelt csoport, 23.) 100 nM PACAP6-38-al és 100 μM MTX-al kezelt csoport, 24.) 1 nM PACAP1-38-al, 100 nM PACAP6-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport

A kontroll sejteket ebben az esetben sem kezeltük előzetesen sem PACAP1-38-al, sem PACAP6-38-al. Azon sejtcsoportok esetében, melyek 48 órán keresztül citosztatikum

Formázott: Felsorolás és számozás

hatásának voltak kitéve, 1 órával az expozíció előtt PACAP1-38 vagy PACAP6-38, vagy együttes kezelést is végeztünk. A kezelést követően a médiumokat lecseréltük egy 0,5%-os MTT tartalmú RPMI médiumra, melyben 4 óráig inkubáltuk a sejteket. A reakciót 10 mM HCl hozzáadásával termináltuk. Ezt követően az abszorbanciát ELISA leolvasó segítségével 570 nm hullámhosszon megmértük, amely arányos volt az élő sejtek számával. Minden kísérletet háromszor ismételtünk.

HIPEC SEJTEK

A HIPEC sejtek életképességének vizsgálatához kolorimetrikus WST-1 tesztet használtunk. A sejteket szintén 96-lyukú tenyésztő edénybe választottuk szét, ahol a kezdeti koncentráció 10^4 sejt/100 μ l médium/lyuk volt. Ezt követően egy éjszakán át tenyésztettük őket DMEM médiumban.

A sejteket hat különböző csoportra osztottuk: 1.) kezelésben nem részesült csoport, 2.) 100 nM PACAP1-38-al kezelt csoport, 3.) 1 μ M PACAP6-38-al kezelt csoport, 4.) 10 μ M MTX-al kezelt csoport, 5.) 100 nM PACAP1-38-al és 10 μ M MTX-al kezelt csoport 6.) 1 μ M PACAP6-38-al és 10 μ M MTX-al kezelt csoport. A kontroll sejteket ebben az esetben sem kezeltük előzetesen sem PACAP1-38-al, sem PACAP6-38-al. Azon sejtcsoportok, melyek 48 órán keresztül citosztatikum hatásának voltak kitéve, 1 órával az expozíció előtt PACAP1-38 vagy PACAP6-38 kezelésben is részesültek. Az inkubációs idő lejártakor a 100 μ l médiumokhoz 10 μ l WST-1 reagenst adtunk. Ezt követően 2-3 órán keresztül inkubáltuk a sejteket. Az abszorbanciát ELISA leolvasó segítségével 420-480 nm hullámhosszon megmértük, amely arányos volt az élő sejtek számával. Minden kísérletet háromszor ismételtünk.

Inváziós készség és proliferáció vizsgálata

A HIPEC sejtek inváziós készségének vizsgálatát inváziós kamrákban végeztük a Boyden kamra protokoll alapján. Minden kamrában található egy beillesztés amelyben van egy 8 μ m pórus nagyságú polikarbonát membrán. Ezen kívül a membránokon található egy patkány farokból származó I. típusú kollagén bevonat ($5\mu\text{g}/\text{cm}^2$). A beillesztéseket először DMEM médiummal mostuk majd 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

Ezután minden beillesztésbe 5×10^5 sejtet helyezünk 100 μ l FCS mentes médiummal, a kamrákba szintén 5×10^5 sejt kerül 400 μ l FCS mentes médiummal. A sejteket 72 órán át tenyésztjük inkubátorban (37°C, 5% CO₂). Az inkubáció lejárta után a felülúszót eltávolítottuk és a kollagénbe betört életképes sejteket jelöltük 400 μ l crystal violet sejtfestékkel 20 percig szobahőmérsékleten. Majd leöblítettük a sejteket néhányszor vízzel és a kollegénbe nem betörő sejteket vattával eltávolítottuk. Ezek után a beillesztést egy teljesen új kamrába helyeztük és 200 μ l H₂O:etanol:aceticétsav (49:50:1) keveréket adtunk hozzá. Ezekből az oldatokból 100 μ l-eket 96-lyukú tenyésztő edényekbe pipettáztunk ahol kolorimetrikus WST-1 teszttel 560 nm-en meghatároztuk a abszorbanciát, ami arányos a sejtkoncentrációval. A proliferációs vizsgálatot a kamrákban található sejteken végeztük paralell az inváziós készség meghatározásával. A médium eltávolítása után 400 μ l FCS mentes 20% 96 Aqueous One solution tartalmú reagenst adtunk a sejtekhez. Majd inkubáltuk 3 órán át inkubátorban (37°C, 5% CO₂). Ezekből az oldatokból szintén 100 μ l-eket pipettáztunk 96-lyukú tenyésztő edényekbe majd kolorimetrikus WST-1 teszttel 560 nm-en meghatároztuk a abszorbanciát, ami arányos a sejtkoncentrációval.

Western blot analízis

A JAR sejteket 6 lyukú tenyésztő edénybe szeparáltuk szét, ahol a kezdeti koncentráció 5×10^5 sejt/ml/lyuk volt.

A.) PACAP1-38 és PACAP6-38 hatása JAR sejtekre

JAR sejteket négy különböző csoportra osztottuk: 1.) kontroll csoport, 2.) 1 órás 100 nM PACAP38-al kezelt csoport, 3.) 1 órás 1 μ M PACAP6-38-al kezelt csoport, 4.) 1 órás 100 nM PACAP38-al és 1 μ M PACAP6-38-al együttesen kezelt csoport.

B.) PACAP1-38 hatása JAR sejtekre H₂O₂ kezelés esetében

A JAR sejteket négy különböző csoportra osztottuk: 1.) kontroll csoport, 2.) 9 órán keresztül 0,6 mM H₂O₂-dal kezelt csoport, 3.) 1 órás 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 9 órás 0,6 mM H₂O₂-dal kezelt csoport, 4.) 1 órás 100 nM PACAP38-al kezelt csoport.

A sejteket a kezelést követően összegyűjtöttük, majd jéghideg Tris pufferben (50 mM, pH: 8,0) homogenizáltuk. A puffer összetevői: Foszfátáz inhibitor Na_3VO_4 (0,5 mM), proteáz inhibitor, PBS. A sejtmembránokat ultrahanggal roncsoltuk, majd 10000 x g sebességgel centrifugáltuk 15 percen keresztül. A felülúszó protein koncentrációját BioRad assay módszer segítségével meghatároztuk, a minták protein tartalmát egyenlő koncentrációkra állítottuk be. Azonos mennyiségű fehérjét (10 μg) 8, 12 és 15 %-os poliakrilamid gélben futtattunk. A blottolást követően, a nitrocellulóz membránt 3%-os zsírmentes tejben a következő polyclonalis nyúl vagy monoclonalis egér IgG ellen termeltetett antitesteket tartalmazó oldatban egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk: Phospho-protein kinase B (p-Akt), Phospho-p44/42 mitogen activated protein kinase (p-ERK1/2 Thr 202/Tyr204), Phospho-p38 mitogen activated protein kinase (p-p38 MAPK Thr180/Tyr 182). A második antitest peroxidáz-konjugált anti-nyúl, valamint anti-egér IgG volt, a vizualizálást ECL Western blot meghatározó rendszer kemilumineszcens szubsztrát (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) használatával végeztük el. Az előhívott filmeket NIH's Image J szoftver segítségével értékeltük. Minden kísérletet legalább három alkalommal végeztünk el.

Apoptózis és nekrozis detektálása annexin V/propidium jodid festéssel

A JAR sejteket 6 lyukú tenyésztő edénybe szeparáltuk szét, ahol a kezdeti koncentráció 10^5 sejt/2ml/lyuk volt.

JAR sejteket hat különböző csoportra osztottuk: 1.) kontroll csoport, 2.) 100 nM PACAP1-38-al kezelt csoport, 3.) 10 μM MTX-al kezelt csoport, 4.) 100 μM MTX-al kezelt csoport, 5.) 100 nM PACAP1-38-al és 10 μM MTX-al kezelt csoport, 6.) 100 nM PACAP1-38-al és 100 μM MTX-al kezelt csoport.

A HIPEC sejteket szintén 6 lyukú tenyésztő edénybe szeparáltuk szét, ahol a kezdeti koncentráció 10^5 sejt/2ml/lyuk volt.

HIPEC sejteket hat különböző csoportra osztottuk: 1.) kontroll csoport, 2.) 100 nM PACAP1-38-al kezelt csoport, 3.) 1 μM PACAP6-38-al kezelt csoport, 4.) 10 μM MTX-

al kezelt csoport, 5.) 100 nM PACAP1-38-al és 10 μ M MTX-al kezelt csoport, 6.) 1 μ M PACAP6-38-al és 10 μ M MTX-al kezelt csoport.

Az eljárás a sejthalál típusainak elkülönítésére alkalmas. Az apoptózis korai szakaszában változások figyelhetők meg a plazmamembránban. Az apoptotikus sejtek membránjában a foszfolipid-foszfátidilszerin a belső felszínről a külső felszínre transzlokálódik. Az annexinV igen nagy affinitást mutat a foszfolipid-foszfátidilszerinhez. A fluoreszcens festékkel (FITC) jelzett annexinV alkalmas az apoptotikus sejtek áramlási citometriás kimutatására. Az annexinV-t propidium jodid festéssel együtt alkalmaztuk és így az annexinV pozitív apoptotikus sejtek elkülöníthetővé váltak a propidium jodid pozitív nekrotikus sejtektől (Vermees et al., 2000). A mintákat BD FACS Calibur flow citométerrel vizsgáltuk, az analízishez Cellquest software-t használtunk. Kvadráns dot plot segítségével meghatározható az élő, a nekrotikus (propidium jodid pozitív), a korai apoptotikus (annexin-V pozitív), valamint a késői apoptotikus (annexin-V és propidium jodid pozitív) sejtek százalékos aránya.

Statisztika

Eredményeinket átlag \pm S.E.M. formában adtuk meg. Az eredmények adatait ANOVA teszttel hasonlítottuk össze, melyet Neuman–Keul's *post hoc* analízis követett. A $P < 0.05$ eredmények esetén az eltérést szignifikánsnak tekintettük.

Eredmények

A PACAP előfordulása a placentában

A RIA eljárás segítségével sikerült a PACAP38 és PACAP27 immunreaktivitást kimutatnunk humán placentából. A PACAP38 szignifikánsan magasabb koncentrációban fordult elő a humán placenta anyai centrális és perifériás illetve a magzati centrális és perifériás részében mint a PACAP27. A peptid mindkét formája alacsony koncentrációban volt jelen a köldökszínórnban, de a PACAP38 szintje itt is szignifikánsan magasabb volt a PACAP27 szintjénél. A PACAP mindkét formája detektálható volt a 9 hetes abortumok anyai és magzati oldalából vett mintákból egyaránt. A PACAP27 szintje

csak a magzati oldalon mutatott szignifikáns emelkedést a terhesség előrehaladtával, ezzel szemben a PACAP38 koncentrációja mind a magzati, mind az anyai oldalon szignifikánsan emelkedett a terminushoz közeledve.

Tömegspektrometriai vizsgálatok

Kísérleteink során humán tüszőfolyadék, magzatvíz, hüvelyváladék, nyál, orrváladék és csarnokvíz mintákat a PACAP standarddal együtt MALDI TOF tömegspektrométer segítségével vizsgáltuk. A PACAP-38 kvázi-molekula ionját (MW: 4534.6 Da) a standardban és mind a 40 tüszőfolyadékban detektáltuk. A humán magzatvíz, hüvelyváladék, nyál, orrváladék és csarnokvíz esetében nem tudtuk kimutatni a PACAP38-ra jellemző csúcsot. Ezt követően a tüszőfolyadékban elvégeztük a PACAP38 csúcs fragmentációját MALDI TOF/TOF alkalmazásával. A kísérlet eredményeként kapott y fragmensek egyezést mutattak a korábbi vizsgálatok alapján rendelkezésre álló a PACAP38 szülő ion y fragmenseivel és aminosav szekvenciáival. Így kapott eredményeink egyértelműen bizonyítják a PACAP-38 jelenlétét humán tüszőfolyadékban.

PACAP hatása choriocarcinoma sejtek túlélésére

A. PACAP38 hatása JAR sejtekre különböző toxikus hatások esetében

A PACAP38 kezelés önmagában nem befolyásolta a JAR sejtek túlélését. Meglepő módon nem találtunk protektív hatást azon sejteknél sem, melyek eltérő koncentrációjú H₂O₂-dal és PACAP38-al lettek kezelve. Sőt, ezen sejtek túlélési arányát az oxidatív stressz és a PACAP38 együttes alkalmazása csökkentette, ez a hatás erőteljesebben mutatkozott azonban a magasabb H₂O₂ koncentráció esetén. Hasonló eredményt láttunk azon csoportnál, amely CoCl₂ okozta kémiai hypoxiában szenvedett, itt is csökkentette a sejtek túlélési arányát a kettős kezelés. Nem figyelhető meg szignifikáns változás a túlélési arányban LPS vagy etanol hatására sem.

B. PACAP38 hatása JAR sejtekre citosztatikus kezelés esetében

A JAR sejtek túlélését sem a PACAP1-38, sem a PACAP6-38 kezelés önmagában, sem együttes alkalmazásuk nem befolyásolta. A citosztatikus kezelés hatására a sejttúlélés szignifikáns mértékben lecsökkent. Meglepő módon abban az esetben sem találtunk sem

protektív, sem toxikus hatást azon sejteknél, melyek eltérő koncentrációjú MTX–al és PACAP1-38-al vagy PACAP6-38-al vagy ezek kombinációjával lettek kezelve.

PACAP hatása extravillosus cytotrophoblast sejtek túlélésére

A HIPEC sejtek túlélését sem a PACAP1-38, sem a PACAP6-38 kezelés önmagában nem befolyásolta. Ezen sejtvonal esetében sem találtunk védő, vagy toxikus hatást azoknál a sejtcsoportoknál, melyek MTX–al és PACAP1-38-al vagy PACAP6-38-al lettek kezelve.

PACAP hatása extravillosus cytotrophoblast sejtek inváziójára és proliferációjára

A HIPEC sejtek inváziós készségét a PACAP1-38 gátolta, viszont proliferációját elősegítette. A PACAP6-38 az invázióra semmilyen hatást nem gyakorolt, viszont a proliferációt szignifikáns mértékben fokozta.

PACAP hatásai choriocarcinoma sejtek jelátviteli útvonalaira

A.) PACAP1-38 és PACAP6-38 hatása JAR sejtekre

ERK1/2

Az ERK1/2 aktív, foszforilált formáját kimutattuk a kontroll sejteknél, expressziója azonban PACAP1-38 kezelést követően nem változott. Ezen jelátviteli útvonal aktivációja szignifikáns emelkedést mutatott PACAP6-38 alkalmazása esetén, hasonló emelkedés volt megfigyelhető PACAP1-38 és PACAP6-38 kombinált kezelése esetében.

p38 MAPK

A p38 MAPK aktivációja esetében az ERK1/2-el ellentétes eredményeket kaptunk. A p38 MAPK foszforilációja kis mértékben csökkent PACAP1-38 hatására, majd szignifikáns csökkenést mutatott PACAP6-38 kezelés hatására. PACAP1-38 és PACAP6-38 együttes

alkalmazás esetén ez a szignifikáns aktiváció csökkenés még nagyobb mértékben volt megfigyelhető.

JNK/SAPK

A JNK/SAPK aktivációja csak kis mértékben volt kimutatható a kontroll sejtek esetében. Foszforilációja már szignifikáns mértékben emelkedett csak PACAP1-38 kezelés hatására is, még nagyobb emelkedést mutatott PACAP6-38 esetében. Kombinált alkalmazásuk esetében ez az aktiváció még jobban megemelkedett.

B.) PACAP1-38 hatása JAR sejtekre H₂O₂ kezelés esetében

Akt

Az Akt aktív formáját kimutattuk a kontroll sejteknél, expressziója azonban PACAP1-38 kezelést követően jelentős mértékben csökkent. Hasonló hatást figyelhettünk meg azoknál a sejteknél, melyek csak oxidatív stressznek voltak kitéve. Abban az esetben, amikor a sejteket PACAP1-38 előkezelést követően H₂O₂-dal kezeltük, ezen protektív jelátviteli útvonal aktivációja még szignifikánsabb mértékben lecsökkent.

ERK1/2

Kísérletünk során nem volt kimutatható aktivitásváltozás annál a sejtcsoportnál, mely csak PACAP38 kezelésben részesült a kontroll sejtekhez viszonyítva. A ERK1/2 foszforilációja szignifikánsan lecsökkent azoknál a sejteknél, melyek csak oxidatív stresszben részesültek, illetve további szignifikáns csökkenést mutat abban az esetben, amikor a sejtek mindkét hatásnak ki voltak téve.

p38 MAPK

A p38 MAPK foszforilációja nem változott abban az esetben, amikor a sejtek csak PACAP kezelésben részesültek, illetve akkor sem, mikor a H₂O₂ által kifejtett oxidatív stresszben szenvedtek. A PACAP és a H₂O₂ egyidejű alkalmazása esetén viszont ezen protektív jelátviteli útvonal aktivációja szignifikáns csökkenést mutat.

Apoptózis és nekrozis detektálása annexin V/propidium jodid festéssel JAR sejtekenél

A flow citométerrel kapott eredményeink azt mutatják, hogy a MTX-kezelt csoportban az élő sejtek száma szignifikánsan csökkent mind 10 μM , mind pedig 100 μM alkalmazott koncentráció esetén. A PACAP1-38-kezelés önmagában nem okozott eltérést a kontroll sejtcsoporthoz képest, ezen kívül sem védő sem toxikus hatást nem fejtett ki egyik MTX koncentrációval szemben sem.

Apoptózis és nekrozis detektálása annexin V/propidium jodid festéssel HIPEC sejtekenél

A flow citométerrel kapott eredményeink ebben az esetben is azt mutatják, hogy a MTX-al (10 μM) kezelt csoportban az élő sejtek száma szignifikánsan csökkent. A PACAP1-38 illetve a PACAP6-38 kezelés önmagában nem okozott eltérést a kontroll sejtcsoporthoz viszonyítva, ezen kívül ebben az esetben sem mutattak sem védő, sem toxikus hatást a MTX kezeléssel szemben.

Megbeszélés

A PACAP előfordulása a placentában

Kísérleteink során mind a PACAP38-at, mind a PACAP27-et kimutattuk a humán érett placenta minden részében, a PACAP38 magasabb, a PACAP27 alacsonyabb koncentrációban fordult elő. A PACAP placentában mért koncentrációtartománya közel azonos az agyban mért koncentrációtartománnyal, ahol a legmagasabb a peptid szintje az egész szervezetben. Eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP szintje emelkedik a terhesség előrehaladtával, mind az anyai, mind a magzati oldalon. Ez jól korrelál korábbi kísérleti eredményekkel, melyek szerint a PACAP mRNS és a PAC1 receptor mRNS szintje emelkedik a terminushoz közeledve. A PACAP magas koncentrációjából arra következtethetünk, hogy a peptid fontos szerepet tölthet be a placentában. Ezt a feltételezést támasztja alá PACAP knockout egerek csökkent fertilitása és implantációs képessége.

A PACAP előfordulása a reprodukzív rendszer egyéb részeiben

Vizsgálataink alapján kimutattuk, hogy a PACAP38 megtalálható az általunk vizsgált összes humán tüszőfolyadékban. A tüszőfolyadék médiumként szolgál a fejlődő petesejt számára, illetve fontos szerepet tölt be a germinális sejtek morfológiai és funkcionális fejlődésében. A PACAP kimutatható fejlődési stádiumtól függően a nagy érett tüszők granulosa sejtjeiben peteérés előtt. Kisebb mennyiségben azonban éretlen antrális és preantrális tüszőkben is expresszálódik. Ezen kívül kimutatták a PACAP receptort is a fejlődő tüszőkben. A sárgatestben mind a PACAP-ot, mind a PAC1 receptort kimutatták. Valószínű, hogy a peptid szerepet játszik a primordiális csírasejtek proliferációjában, az éretlen tüszők ciklikus kiválasztódásában és a fejlődés elindításában, a petesejtek meiotikus fejlődésében és a petefészek hormon- illetve enzim termelésében. Eredményünk, hogy a PACAP kimutatható az általunk vizsgált összes tüszőfolyadékból, alátámasztja a feltételezést, hogy a PACAP fontos biológiai szerepet tölt be a tenyésztő folyadékként funkcionáló tüszőfolyadékban a fejlődő petesejtek számára. Ennek tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Humán magzatvízben, hüvelyváladékban, orrváladékban, nyálban és csarnokvízben nem tudtuk kimutatni a PACAP-ot tömegspektrométer segítségével. Ennek oka lehet a PACAP teljes hiánya ezen mintákban, vagy a peptid szintje annyira alacsony, hogy nem éri el a detektálási limitet. A peptid hiánya ebben az esetben nem feltétlenül zárja ki azt a lehetőséget, hogy a PACAP megtalálható kóros elváltozások esetében, mivel az általunk vizsgált minták olyan önkéntes nőbetegtől vagy egészséges önkéntesektől származtak, akik anamnézisében nem volt ismert betegség. A gyors lebomlás kizárható, mivel a mintákhoz megfelelő mennyiségű peptidáz-gátlót adtunk. Ezen kívül előfordulhat, hogy a peptid egy módosult formában van jelen az általunk vizsgált mintákban, melynek kiderítése még további vizsgálatokat igényel.

PACAP hatásai choriocarcinoma sejtek túlélésére és jelátviteli útvonalaira

PACAP38 hatása JAR sejtekre különböző toxikus hatások esetében

Vizsgálatainkban a PACAP kezelés számos hatását leírtuk JAR sejtek túlélését és jelátviteli útvonalait illetően. Arra az eredményre jutottunk, hogy egy óras PACAP1-38 előkezelés nem változtatta meg szignifikánsan a trophoblast sejtek túlélési arányát, viszont azoknál a sejteknél, melyek oxidatív stressznek és hypoxiának is ki voltak téve, a PACAP1-38 előkezelés szignifikánsan csökkentette a túlélést. Ebből arra következtethetünk, hogy a PACAP38 potenciózza ezen toxikus hatásokat. Ezt nem figyelhetjük meg azoknál a csoportoknál, amelyek LPS, etanol vagy MTX kezelést kaptak.

PACAP1-38 és PACAP6-38 hatása JAR sejtekre

Eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP1-38 kezelés önmagában nem változtatta meg az ERK1/2 és a p38MAPK foszforilációját. Az ERK1/2 esetében a PACAP6-38 szignifikánsan emelte ezen jelátviteli útvonal aktivációját, ugyanezt a hatást figyelhetjük meg kombinált alkalmazásukat követően. A p38MAPK esetében pont ellenkező hatást figyelhettünk meg, a PACAP6-38 és a PACAP1-38 való együttes alkalmazása esetén ezen jelátviteli útvonal foszforilációja szignifikáns mértékben lecsökkent. A JNK/SAPK jelátviteli útvonal esetében a PACAP1-38 kezelés szignifikáns aktivációemelkedést hozott létre, amely ugyan fokozódott PACAP6-38 kezelést követően is, de sokkal szignifikánsabb foszforilálódás volt megfigyelhető kombinált alkalmazásuk esetén.

PACAP hatásai choriocarcinoma sejtek túlélésére methotrexate kezelés hatására

Vizsgálatainkban arra az eredményre jutottunk, hogy a PACAP1-38 vagy a PACAP6-38 kezelés önmagában nem változtatott a vizsgált sejtvonal túlélésén, MTX egyedüli alkalmazása esetén a túlélés körülbelül a felére csökkent le. A citosztatikum és PACAP1-38 vagy PACAP6-38 kombinált alkalmazása esetén ugyanezt a hatást kaptuk, tehát a peptid és az antagonista sem mutatott védő vagy toxikus hatást.

PACAP hatásai choriocarcinoma sejtek jelátviteli útvonalaira toxikus körülmények között

Eredményeink azt mutatják, hogy önmagában a PACAP38 kezelés nem változtat az ERK1/2 és a p38 MAPK foszforilációján, de csökkenti az Akt aktivációját. A PACAP-al

és H₂O₂-dal történő együttes kezelést követően csökken a fenti jelátviteli útvonalak foszforilációja. Az Akt esetében a PACAP38 önmagában is csökkentette az aktivációt, így az együttes kezelést követően kialakuló csökkenés additív hatásnak minősül. Az ERK1/2 és a p38 MAPK esetében a PACAP38 önmagában nem csökkentette az aktivációt, így az együttes kezelés következtében kialakuló csökkenés ezekben az esetekben potenciózó hatásnak tudható be.

PACAP hatásai extravillosus cytotrophoblast (HIPEC) sejtekre

Az immortalizált extravillosus cytotrophoblast sejtek esetében, azonos körülmények között ugyanúgy viselkedett a PACAP1-38 és a PACAP6-38, mint a tumoros choriocarcinoma sejtek esetében. A HIPEC sejtek túlélésén sem változtatott a PACAP1-38 és PACAP6-38 kezelés önmagában, viszont a MTX szignifikánsan csökkentette a túlélést. A MTX ezen toxikus hatását ennél a sejtvonalnál sem tudta a PACAP1-38 kivédeni, vagy a PACAP6-38 erősíteni. A HIPEC sejtek invázióját és proliferációját ezidáig PPAR γ hozzáadásával vizsgálták. A PACAP1-38-al és PACAP6-38-al ellentétben a PPAR γ nem fokozta a proliferációt, viszont a PPAR γ és a PACAP1-38 csökkentette az inváziós készséget, ebből arra következtethetünk, hogy ezen anyagok modulálják a cytotrophoblastok invázióját a placentában. Továbbra is érdekes kérdés marad azonban, hogy a PACAP6-38 a cytotrophoblastok esetében nem antagonistá hatású. Ezen eredmények tisztázására PCR kísérleteket végzünk egy esetleges új receptor feltérképezésére a placentában.

A PACAP általános sejtvédő hatásától eltérő hatásai egyes sejtekben

A PACAP-ot legtöbb esetben cytoprotektív hatása alapján jegyzik az irodalomban, ezt a tulajdonságát először neuronális sejtvonalon mutatták ki, ahol protektív hatást fejtett ki többféle toxikus stresszorral szemben. A PACAP38 többek között védő hatást fejt ki glutamát, etanol, ceramid, 6-hidroxidopamin, HIV burokfehérje, rotenon és hypoxia okozta károsodással szemben. A PACAP védő hatását cerebelláris szemcsesejtek esetében is kimutatták oxidatív stresszel szemben. Hasonló mértékű protektív hatást mutatott ki munkacsoportunk oxidatív stresszel szemben az endotél sejtek vagy szívizomsejtek esetében is. Jelen eredményeink ezzel teljesen ellentétben azt mutatják, hogy a PACAP nem segíti a trophoblast sejtek túlélését. A PACAP kezelés önmagában

nem változtatott a túlélési arányon, de fokozta az oxidatív stressz és *in vitro* hypoxia által okozott toxikus hatást. Ennek a potencírozó hatásnak az oka még ismeretlen.

Az irodalmi adatok azonban nem minden sejt esetében mutatnak sejttúlélést elősegítő hatást. Egyes esetekben a PACAP38 pont ellentétes hatást fejt ki, mégpedig gátolja a sejtek túlélését, mint pl. myeloma és humán leukémia sejtekben. Továbbá kimutatták, hogy a PACAP KO egerekben gyakrabban fejlődik ki colorectalis tumor. Kardiális fibrocitákban a PACAP gátolja a proliferációt és a fehérjeszintézist. Más esetekben pedig azt találták, hogy a PACAP, ellentétben a VIP-vel, nem befolyásolja a sejtek túlélését, mint pl. myentericus neuronkultúrában. Ennek háttérében az állhat, hogy a PACAP receptorok közül az adott sejtekben más splice variáns expresszálódik. További tényező lehet az az ismert tény, hogy különböző sejtípusokban egy ligand pleiotrop biológiai választ idézhet elő a szövet/sejtspecifikus szignáltranszdukciós útvonalak miatt. Különösen tumorsejtekben fordulhat elő, hogy a PACAP-nak egy másik receptortípusa jelenik meg, mely eltérő hatást közvetít, vagy a tumorsejtekben eltérő jelátviteli utak aktiválódnak. Ezen, a PACAP általános hatásaitól eltérő hatások lehetnek trophoblast specifikusak, vagy csak a tumoros trophoblast sejtekre jellemzőek. Ennek a kérdésnek a tisztázására kezdtünk kísérleteket immortalizált cytotrophoblastokkal illetve primer cytotrophoblast sejtvonallal. Ennek érdekében részt vettem egy külföldi kollaborációban (Laboratoire d'Horonologie, Maternité, Hopitaux de Universitaire de Genève, Genf, Svájc), ahol placentából izoláltuk a primer cytotrophoblast sejteket. Ezen kísérletek még jelenleg is folynak.

PACAP által aktivált jelátviteli útvonalak

A PACAP-al kapcsolatban kimutatták már, hogy többféle jelátviteli útvonalat aktivál. Számos eredmény született arról, hogy a PACAP sejttúlélést elősegítő hatását több, a MAPK családba tartozó jelátviteli útvonal segítségével fejt ki. A PACAP stimulálja az általában antiapoptotikus hatással rendelkező ERK1/2 és gátolja a nagyrészt proapoptotikus JNK1/2 illetve p38 MAPK útvonalak aktivitását. Továbbá, a PACAP ellensúlyozza az ischemia-, oxidatív stressz-, vagy glutamát-indukálta változásokat ezeknél a szignáltranszdukciós molekuláknál. Kísérletünkben PACAP előkezelést követő oxidatív stressz és hypoxia hatására csökkent túlélési arányt találtunk. Western-

blot analízisünk során a PACAP sokféle hatását mutattuk ki. Egyértelmű volt, hogy egyes védő útvonalak (ERK1/2, Akt) aktivitása csökken, de a PACAP egyes proapoptotikus útvonalakat is visszaszorított. A p38 MAPK útvonal esetében, ami körülményektől függően lehet pro- illetve antiapoptotikus hatású is, hasonló aktivitáscsökkenést figyelhettünk meg mint a protektív faktorok esetében. Azt találtuk, hogy a PACAP potenciózó és additív hatással rendelkezik az általunk vizsgált jelátviteli útvonalak esetében, ha a sejtek oxidatív stressznek is ki voltak téve, amit a PACAP sejthalált elősegítő hatása is alátámaszt. Eredményeink értelmezéséhez a trophoblast sejtek további vizsgálata szükséges, melyek megmagyarázhatják az előbb említett mechanizmust és a lehetséges fiziológiás, illetve patofiziológiás folyamatokat, melyek felelőssé tehetőek a PACAP mediálta jelátviteli útvonalakért.

Kísérleteink további, általánostól eltérő eredménye, hogy a PACAP6-38 agonistaként viselkedett, mely nem csak ezen sejtvonalra érvényes, mivel munkacsoportunk kimutatta, hogy a PACAP6-38 a tracheában a felszabaduló gyulladáshoz kapcsolódó neuropeptidekre is a PACAP1-38-al agonista módon hat, és nem antagonistaként. Ezek a megfigyelések felvetik annak a lehetőségét, hogy ezekben a sejtekben/szövetekben a PACAP receptornak egy eddig ismeretlen splice variánsa található, melyen keresztül a PACAP6-38 ugyanolyan jelátviteli útvonalakat aktivál, mint a PACAP1-38. Ennek tisztázására további kísérletekre van szükség.

Új eredmények összefoglalása:

- Kimutattuk a PACAP38-at és PACAP27-et humán, érett placentából és 9 hetes abortumokból, ezen kívül, hogy a PACAP szintje emelkedik a terhesség előrehaladtával
- Kimutattuk a PACAP38-at humán tüszőfolyadékban.
- PACAP1-38 előkezelés szignifikánsan csökkentette a túlélést azon JAR sejteknél melyek oxidatív stressznek vagy hipoxiának ki voltak téve.

- Az ERK1/2 és JNK/SAPK jelátviteli útvonalak esetében a PACAP1-38 és PACAP6-38 kombinált kezelés növelte ezen útvonalak aktivációját, de csökkentette a p38MAPK foszforilációját.
- Sem a PACAP1-38, sem a PACAP6-38, sem kombinált alkalmazásuk nem fejtett ki antiapoptotikus hatást JAR sejteknel MTX kezelés következtében.
- A PACAP1-38-al és H₂O₂-dal történő együttes kezelést követően csökken a JAR sejtekben az ERK1/2 és a p38MAPK foszforilációja.
- A HIPEC sejtek túlélésén sem változtatott a PACAP1-38 és PACAP6-38 kezelés sem, illetve a MTX toxikus hatását sem volt képes kivédeni.
- PACAP1-38 a HIPEC sejtek inváziós készségét gátolta, proliferációját elősegítette. A PACAP6-38 a proliferációt szignifikáns mértékben fokozta.

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

Brubel R, Reglődi D, Jámbor É, Koppán M, Várnagy Á, Bíró Zs, Kiss P, Gaál V, Matkovits A, Farkas J, Lubics A, Bódis J, Bay Cs, Veszprémi B, Tamás A, Németh J, Márk L. Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. *J Mass Spectr* 2011;46: 189-94 (IF: 3.411)

Brubel R, Boronkai Á, Reglődi D, Rácz B, Németh J, Kiss P, Lubics A, Tóth G, Horváth G, Varga T, Szógyi D, Fónagy E, Farkas J, Barakonyi A, Bellyei Sz, Szereday L, Koppán M, Tamás A. Changes in the expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the human placenta during pregnancy and its effects on the survival of JAR choriocarcinoma cells. *J Mol Neurosci* 2010;42: 450-458. (IF: 2.72)

Boronkai Á, **Brubel R**, Rácz B, Tamás A, Kiss P, Horváth G, Lubics A, Szigeti A, Bellyei Sz, Tóth G, Lakatos A, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on the survival and signal transduction pathways in human choriocarcinoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1163: 353-357 (IF: 2.67)

Reglődi D, Börzsei R, Bagoly T, Boronkai Á, Rácz B, Tamás A, Kiss P, Horváth G, **Brubel R**, Németh J, Tóth G, Helyes Zs. Agonistic behavior of PACAP6-38 on sensory nerve terminals and cytotrophoblast cells. *J Mol Neurosci* 2008;36: 270-278. (IF: 2.061)

Egyéb közlemények:

Brubel R, Horváth G, Reglődi D, Lubics A, Tamás A, Kiss P, László E, Németh J, Márk L, Szakály P. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor in the rat kidney. *Transplant Proc* 2011; 43: 1297-1299 (IF: 0,994)

Szakály P, László E, Kovács K, Rácz B, Horváth G, Ferencz A, Lubics A, Kiss P, Tamás A, **Brubel R**, Opper B, Baba A, Hashimoto H, Farkas J, Matkovits A, Magyarlaki T, Helyes Zs, Reglődi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) show increased susceptibility to in vivo renal ischemia/reperfusion injury. *Neuropeptides*. 2011;45:113-21 (IF: 2.036)

Czeplédi L, Tamás A, Börzsei R, Bagoly T, Kiss P, Horváth G, **Brubel R**, Németh J, Szalontai B, Szabadfi K, Jávor A, Reglődi D, Helyes Zs. Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. *Gen Comp Endocrinol*. 2011;172:115-9 (IF: 2.732)

Horváth G, Márk L, **Brubel R**, Szakály P, Rácz B, Kiss P, Tamás A, Helyes Zs, Lubics A, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Fürjes G, Németh J, Reglődi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide display increased sensitivity to renal oxidative stress in vitro. *Neurosci Lett* 2010;469: 70-74 (IF: 1.925)

Horváth G, **Brubel R**, Kovács K, Reglődi D, Opper B, Ferencz A, Szakály P, László E, Hau L, Kiss P, Tamás A, Rácz B. Effects of PACAP on oxidative stress-induced cell death in rat kidney and human hepatocyte cells. J Mol Neurosci 2010;484(2):148-52. (IF: 2.72)

Horváth G, Reglődi D, Opper B, **Brubel R**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Csernus V, Matkovits A, Rácz B. Effects of PACAP on the oxidative stress-induced cell death in chicken pinealocytes is influenced by the phase of the circadian clock. Neurosci Lett 2010;484:148-152 (IF:1.925)

Tudományos közlemények összesített impakt faktora: **23,194**

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Reglődi Dórának, Dr. Lubics Andreának és Dr. Tamás Andreának, akik támogatták és irányították tudományos tevékenységemet. Szeretném megköszönni intézetvezetőnknek, Dr. Csernus Valérnak, hogy támogatta tudományos munkámat.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Kiss Péternek a dolgozat szerkesztésében és ábraanyagának elkészítésében nyújtott segítségéért. Ezen kívül szeretnék köszönetet mondani Dr. Horváth Gabriellának és az Anatómiai Intézet összes dolgozójának.

Köszönet illeti Dr. Rácz Boglárkát, Dr. Márk Lászlót, Dr. Boronkai Árpádot és a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet munkatársait is a molekuláris biológiai és tömegspektrometriai kísérletek elsajátítása során nyújtott segítségéért.

Ezen kívül szeretnék köszönetet mondani Dr. Koppán Miklósnak, Dr. Várnagy Ákosnak és Dr. Varga Tamásnak a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról, illetve Dr. Szereday Lászlónak és Dr. Barakonyi Alíznek az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetből a kísérletekhez szükséges minták gyűjtéséhez nyújtott segítségéért.