PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai Doktori Iskola

Szabályozásbiológia Program

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid anti-apoptotikus és ontogenetikus hatása a posztnatális patkány retinában

PhD értekezés

Lakk Mónika

Témavezetők:

Dr. Gábriel Róbert
egyetemi tanár

Dr. Dénes Viktória
egyetemi adjunktus

Pécs, 2014

Hálából Édesanyámnak és Édesapámnak

„Egy folyamatot nem lehet úgy megérteni, hogy megállítjuk.
A megértésnek együtt kell haladnia a folyamattal, részévé kell válnia.”
Frank Herbert

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések listája ... 3
2. Bevezetés ... 6
2.1. A gerinces retina szerkezete ... 6
2.2. A gerinces retina fejlődése ... 7
2.3. Az apoptózis, mint a fejlődés egyik fontos mechanizmusa ... 8
2.4. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid ... 10
2.5. A PACAP legfontosabb funkciói ... 11
2.5.1. A PACAP neuroprotektív hatása ... 12
2.5.2. A PACAP fejlődésre gyakorolt hatása ... 13
2.6. PACAP receptorok és receptorokhoz kapcsolt szignáltranszdukciós útvonalak .. 13
2.7. Az L-glutamát szerepe a retina fiziológiájában ... 16
3. Problémafelvetés és célkitűzések ... 18
4. Anyagok és módszerek ... 20
4.1. Kísérleti állatok ... 20
4.2. Génexpressziós vizsgálatok ... 20
4.2.1. Állatok kezelése/Szövetpreparálás ... 20
4.2.2. RNS extrakció ... 20
4.2.3. Reverz transzkripció (RT) ... 21
4.2.4. Polimeráz láncreakció (PCR) ... 21
4.2.5. Őssejt PCR array futtatása ... 22
4.2.6. Kvantitatív real-time PCR (RT-PCR) ... 23
4.2.7. Kiértékelés ... 24
4.3. Fehérjék mennyiségi változásainak analízise ... 26
4.3.1. Állatok kezelése/Szövetpreparálás ... 26
4.3.2. Western blott analízis ... 26
4.4. cAMP mennyiségi meghatározása ... 29
4.4.1. Állatok kezelése/Szövetpreparálás ... 29
4.4.2. Mintaelőkészítés ... 29
4.4.3. Assay procedúra ... 30
4.4.4. Kiértékelés ... 30
4.5. Morfológiai vizsgálatok ... 30
4.5.1. Állatok kezelése/Szövetpreparálás ... 30
4.5.2. Félvékony metszetek készítése ... 31
4.5.3. Immuncitokémia ... 32
4.5.4. Whole-mount preparátum készítése ... 33
5. Eredmények ... 34
5.1. PACAP által aktivált szignáltranszdukciós útvonalak ... 34
5.1.1. AC útvonal vizsgálata ... 34
5.1.2. PLC útvonal vizsgálata ... 38
5.2. PAC1 receptor és izoformáinak azonosítása patkány retinában ... 40
5.2.1. Izoforma specifikus primerekkel végzett PCR-ok eredményei ... 40
5.2.2. A PAC1 receptor és izoformáinak génexpressziós változása a fejlődés során41
5.2.3. PAC1 fehérje mennyiségi változása a fejlődés során ... 45
5.3. Morfológiai vizsgálatok ... 46
5.3.1. A retina szerkezetében, PACAP1-38 kezelés hatására bekövetkező változások ... 46
5.3.2. PACAP1-38 kezelés hatása a retina calbindin, HPC-1 és Chx-10 immunpozitív sejtjeire ... 48

5.4. PACAP1-38 kezelés hatására bekövetkező expressziós változások 52
5.4.1. Proteoszóma komplex elemei 54
5.4.2. Szimmetrikus/aszimmetrikus sejtosztódásért felelős gének 55
5.4.3. Sejtmegújulásért felelős markerek 55
5.4.4. Fibroblaszt növekedési faktorok 56
5.4.5. Növekedési differenciációs faktorok 56
5.4.6. Sejtadhéziós molekulák 57
5.4.7. Sejt-sejt kommunikációt szabályozó gének 58
5.4.8. Embrionális sejtvonal markerek 59
5.4.9. Wnt útvonal tagjai 59
5.4.10. Retinális sejtdifferenciációs markerek 60
6. Eredmények megbeszélése 62
6.1. PAC1 receptor izoformák kifejeződése a fejlődő patkány retinában 62
6.2. PACAP által aktivált szignáltranszdukciós útvonal MSG indukálta neurodegenerációban 65
6.3. PACAP által szabályozott gének 68
6.3.1. PACAP1-38 kezelés hatására változást nem mutató gének csoportjai 68
6.3.2. Növekedési faktorok expressziójának változásai 68
6.3.3. Növekedési differenciációs faktorok expressziójának változásai 69
6.3.4. Sejt-sejt kommunikációt szabályozó gének expressziójának változásai 70
6.3.5. Embrionális sejtvonal markerek expressziójának változásai 71
6.3.6. A Wnt útvonal markerének expressziós változása 71
6.3.7. Retinális sejttípusok differenciációját irányító gének változásai 72
6.4. PACAP kezelés hatására bekövetkező morfológiai változások 73
7. Összefoglalás 75
8. Summary 77
9. Irodalomjegyzék 80
10. Köszönetnyilvánítás 93
11. Saját publikációs lista 94

1. Rövidítések listája

ABS: antitest higító oldat

AC: adenilát-cikláz

Acan: Aggrecan

AMPA: α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolepropion sav

APAF-1: apoptotikus proteáz aktiváló faktor-1

BCL-2: B-sejt CLL/limfóma-2

Bmp: Bone morphogenetic protein

BSA: szarvasmarha szérum albumin

Btrc: β-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase

CAD: caspase aktivált DNáz

cAMP: ciklikus adenozin-monofoszfát

CGC: kisagyi granuláris sejtkultúrák (cerebellar granule cell)

Chx10: Visual system homeobox 10

CREB: cAMP-függő DNS válaszelemet kötő fehérje

Cul1: Cullin1

D609CAS: foszfatidilkolin-specifikus PLC inhibítor

DAG: diacilglicerol

DAPI: 4'-6-diamidino-2-fenilindol

DDA: 2',4'-dideoxi-adenozin

DEPC: dietilén-pirokarbonát

Dhh: Desert hedgehog homolog

Dlx: Distal-less homeobox

DTT: ditiotreitol

E: embrionális

EC: extracelluláris

ER: endoplazmatikus retikulum

ERK: extracelluláris szignál-regulált kináz

ET-18-OCH_3: foszfatidilinozitol-specifikus PLC inhibítor

Fgf: Fibroblast growth factor

GAPDH: glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz

GCL: ganglion sejtek rétege (ganglion cell layer)

Gdf3: Growth differentiation factor

Gja1: Gap junction protein α 1

Gjb1: Gap junction protein β 1

i.v: intravitreális

IC: intracelluláris

ILM: belső határoló membrán

INL: belső magvas réteg (inner nuclear layer)

IP_3: inozitol-1,4,5-triszfoszfát

IPL: belső rostos réteg (inner plexiform layer)

KA: kainsav

L1CAM: L1 cell adhesion molecule

LacD: laktát-dehidrogenáz

Mash1: Achaete-scute complex homolog 1

Math5: Atonal homolog 7

MOPS: 3-morfolinopropánszulfid sav

MSG: nátriumglutamát

Msx1: Msh homeobox 1

Nanog: Nanog homeobox

NBL: neuroblaszt réteg (neuroblast layer)

NeuroD1: Neurogenic differentiation 1

Neurog1: Neurogenin1

NF: dúcsejtek axonjai

NMDA: N-metil-D-aszpartát

Oct4: Octamer-binding protein 4

OLM: külső határoló membrán

ONL: külső magvas réteg (outer nuclear layer)

OPL: külső rostos réteg (outer plexiform layer)

OS: fotoreceptorok külső szegmense

Otx2: Orthodenticle homeobox 2

P: posztnatális

PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid

PARP-1: poli[ADP-ribóz]-polimeráz-1

Pax6: Paired box 6

PBS: foszfát pufferelt sóoldat

PC12: mellékvesevelőből származó feokromacitóma sejtvonal

PCR: polimeráz láncreakció

PFA: paraformaldehid

PKA: protein-kináz A

PKC: protein-kináz C

PLC: foszfolipáz-C

PMCAO: tartós közép cerebrális artéria elkötés (permanent middle cerebral artery occlusion)

PVDF: polivinilidén difluorid

RIPA: radioimmunprecipitációs assay

RPE: retinális pigment epitélium

RPL13a: roboszómális protein L13a

RT: reverz transzkripció

RT-PCR: real-time PCR

s.c: szubkután

SDS: szódium-dodecil-szulfát

Skp1: S-phase kinase-associated protein

T: Brachyury homolog

TBST: TRIS-pufferelt sóoldat TWEEN-20

VIP: vazoaktív intesztinális polipeptid

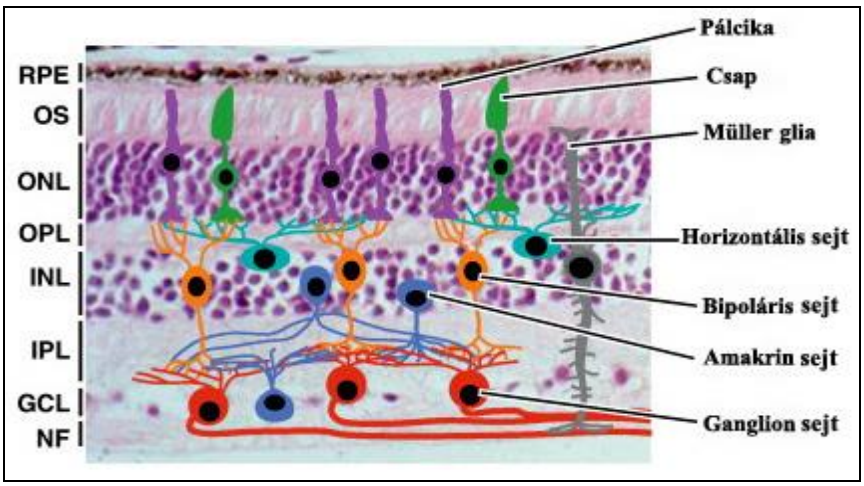
Wnt1: Wingless-type MMTV integration site family member 1

2. Bevezetés

2.1. A gerinces retina szerkezete

A gerinces retina gyakran használt kísérleti modellje a központi idegrendszernek, mely sejtgazdagságának, a sejtek közötti kapcsolatok sokféleségének és a rétegekbe rendezett struktúrájának köszönhetően megjeleníti az agy tipikus komplexitását.

A diencephalon hólyagból történő fejlődés következtében a gerinces retina alapvető szerkezete - különösen a négylábú gerincesek esetében - nagyon hasonló. Felépítését tekintve általában öt főbb rétegre különíthető, melyekben különböző típusú sejtek helyezkednek el. Ez az öt réteg: a külső magvas réteg (outer nuclear layer; ONL) és a külső rostos réteg (outer plexiform layer; OPL), a belső magvas réteg (inner nuclear layer; INL) és a belső rostos réteg (inner plexiform layer; IPL), valamint a ganglion sejtek rétege (ganglion cell layer; GCL) (1. ábra). A külső magvas réteget a fotoreceptorok építik fel, míg a másodlagos neuronok (bipoláris és horizontális sejtek), a harmadlagos neuronok (amakrin sejtek), valamint a Müller gliasejtek sejttestjei a belső magvas réteget hozzák létre. A fotoreceptorok (csapok és pálcikák), bipoláris sejtek és a horizontális sejtek egymással kialakított szinaptikus kapcsolatai alkotják a külső rostos réteget, a bipoláris, az amakrin, és a ganglion sejtek kapcsolatai pedig a belső rostos réteget (1. ábra). A fotoreceptorokra érkező fényinger a retinális információfeldolgozás során elektromos ingerré alakul és a ganglion sejtek afferens nyúlványain keresztül a nervus opticusba szedődve halad az agykéreg felé (Bagnoli és mtsai., 2003).



1. ábra: A retina rétegei és sejttípusai (Bassett és Wallace, 2012 alapján).
RPE: retinális pigment epitélium; OS: fotoreceptorok külső szegmense; ONL: külső sejtes réteg; OPL: külső rostos réteg; INL: belső sejtes réteg; IPL: belső rostos réteg; GCL: ganglion sejtek rétege; NF: dúcsejtek axonjai.

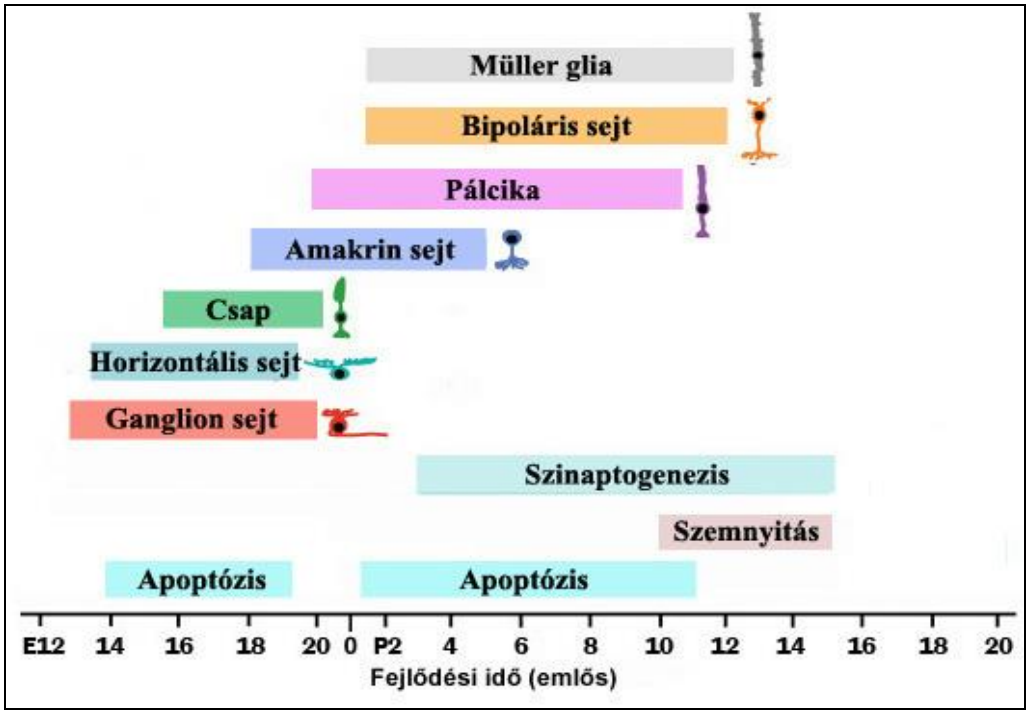
2.2. A gerinces retina fejlődése

A retinának, mint az egyik legbonyolultabb és legkomplexebb idegszövetnek az ontogenezise több lépésből tevődik össze. Az embrionális fejlődés alatt először egy korai neuroblaszt réteg jön létre, melyben a későbbi retinális sejtek progenitor formái vannak jelen. Az embrionális 17. nap környékén (E17) a progenitorok az ún. külső neuroblaszt rétegbe (neuroblast layer; NBL) tömörülnek, míg a belső felszínen kialakul az IPL által lehatárolt GCL. A külső neuroblaszt rétegben található sejtek csak a posztnatális 6.-8. nap (P6-P8) környékén rendeződnek az OPL által elválasztott külső és belső nukleáris rétegbe (Péquignot és mtsai., 2003). A retinogenezis további sajátossága, hogy a sejtek létrejötte a retina centrális területe felől a periféria felé csökkenő gradienst mutat, valamint az eltérő sejttípusok fejlődése nem egyidejűleg következik be, így mindegyik sejttípus egy egyedi proliferációs csúccsal jellemezhető (Rapaport és mtsai., 2004).

A patkány retina neurogenezise az E10 napon kezdődik meg. P1 stádiumban a végleges sejtszám 50%-a még progenitor formában van jelen (Rapaport és mtsai., 2004). A retinogenezis során a ganglion sejtek az E13 naptól az E19 napig, a horizontális sejtek az E15, a csap fotoreceptorok az E18, az amakrin sejtek a P1 napon, a pálcika fotoreceptorok a születés napjától a P6 napig, míg a Müller- és bipoláris sejtek a P6 napon mutatnak proliferációs csúcsokat (Reese és Colello, 1992; Rapaport és mtsai., 2004) (2. ábra). Ezen sejtek megfelelő rétegbe történő migrációja, differenciációja, funkcionális tulajdonságainak és szinaptikus kapcsolatainak kialakulása csak később következik be. A karakterisztikus neurokémiai fenotípusok, a tényleges sejtmorfológia létrejötte, valamint retinális sejtek elhelyezkedésének és funkcionalitásának végleges konzerválódása szintén egy hosszabb posztnatális periódust igényel (Bagnoli és mtsai., 2003).

Annak érdekében, hogy az érett retinára jellemző sejtszám kialakuljon, számos posztmitotikus sejt apoptotikus halála következik be. Az apoptózis két hullámban jelentkezik a retinogenezis során. Az első, korai hullám még embrionális korban figyelhető meg, mely legfőképpen a neuroblaszt réteg középső területét érinti. A sejtelimináció második fázisa a posztnatális fejlődés kezdetétől, P0-tól egészen a szem kinyílásáig, a P12-P13 napig tart (2. ábra). Az apoptotikus folyamatok csúcsa először a ganglion sejteket, majd az INL-ben lévő neuronokat, végül a bipoláris sejteket érinti (Bagnoli és mtsai., 2003). Bár a szinaptogenezis az IPL-ben a P3, míg az OPL-ben a P5 napon megkezdődik, az érett sejtre jellemző sajátosságok csak a túlélő sejtek megfelelő rétegbe történő migrációját követően alakulnak ki. Ebből kifolyólag az első szinaptikus vezikulákkal

rendelkező szinapszisok is csak a P7 napon jelennek meg. A receptorok, a transzporterek és a szinaptikus transzmisszióban fontos szinaptikus proteinek expressziója, valamint a fotoreceptorok külső szegmenseinek kifejlődése szintén csak a szem kinyílását megelőző P10-P15 közötti időszakra tehető (Bagnoli és mtsai., 2003; Johnson és mtsai., 2003) (2. ábra). A sejttípusokra jellemző morfológiai sajátosságok kialakulása a patkány retinában a P10 naptól egészen a P21 napig tart (Johansson és mtsai., 2000).

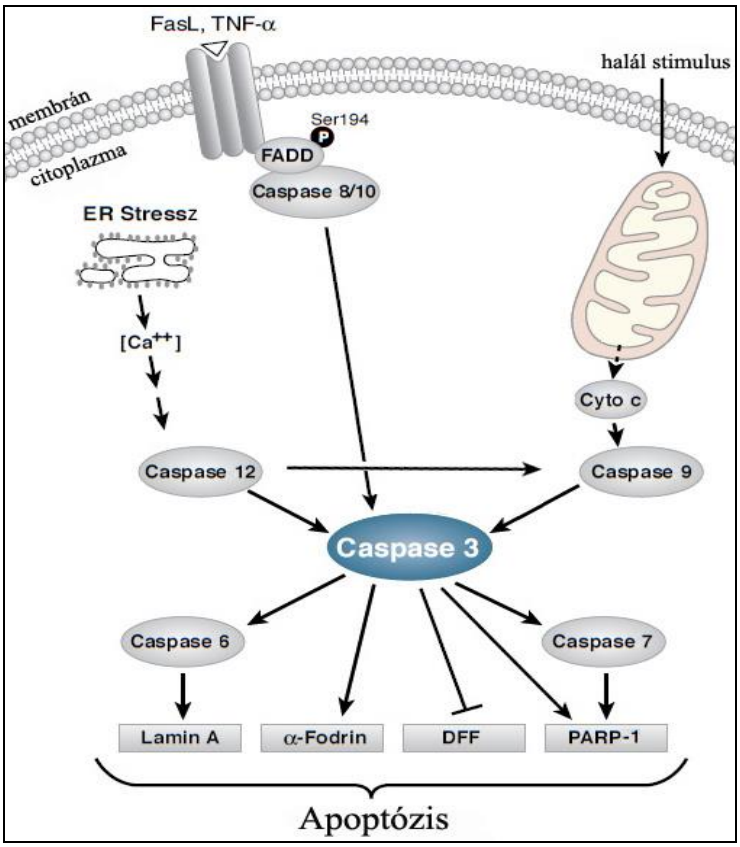


2. ábra: Az emlős retina fejlődése során bekövetkező események (Bassett és Wallace, 2012 alapján).

2.3. Az apoptózis, mint a fejlődés egyik fontos mechanizmusa

Az apoptózis a sejthalál gyakori formája, mely központi szerepet játszik minden soksejtű organizmus fejlődésében és homeosztázisának fenntartásában (Danial és Korsmeyer, 2004). Két, jól karakterizált apoptotikus útvonal jelenik meg az emlős sejtekben: az extrinszik és az intrinszik útvonal. Az extrinszik útvonal szerepe az állatok fejlődése során a nem kívánt sejtek eliminációja, mely a plazmamembránban lévő halálreceptorok aktivációjával kezdődik (Peter és Krammer, 2003). Az intrinszik sejthalál útvonalát a celluláris stressz szignálok indukálhatják. Ez a folyamat a mitokondrium, illetve az endoplazmatikus retikulum (ER) felől is elindulhat (Wang, 2001) (3. ábra).

Az apoptotikus folyamatok kulcsmolekulái a caspase enzimek, melyek az apoptotikus kaszkádba való belépési pontjuktól függően iniciátor (caspase 2, 8, 9, 10, 11 és 12) és végrehajtó (caspase 3, 6 és 7) enzimekre oszthatók (3. ábra). Az iniciátor caspase-ok aktiválódnak elsőként az adott apoptotikus útvonalban, és a végrehajtó caspase-ok aktiválóiként ők képezik az első lépést a kaszkádban (Boatright és Salvesen, 2003). A mitokondriumok membránjaiban jelenlévő B-sejt CLL/limfóma-2 (BCL-2) család proteinjei az apoptotikus szignálokra reagálva növelik a külső mitokondriális membrán permeabilitását (Breckenridge és mtsai., 2003), mely apoptotikus proteinek kibocsátását (pl. citokróm C) idézi elő. A citokróm C az apoptotikus proteáz aktiváló faktor-1 (APAF-1) megkötésével váltja ki az iniciátor caspase 9 aktivációját (Green és Reed, 1998). A caspase 12, mint proximális szignál molekula, az ER citoszólikus felszínén lokalizálva válaszol az ER stresszre (Nakagawa és Yuan, 2000). Az ER-nál történő aktivációját követően, a caspase 12 közvetlenül stimulálja a caspase 9 aktivációját és a mitokondriális citokróm C/APAF-1 útvonal független apoptózisát (Breckenridge és mtsai., 2003) (3. ábra).



3. ábra: A programozott sejthalál útvonalainak egyszerűsített ábrája (http://www.cellsignaling.com).

Az iniciátorokkal szemben, a citoszólban a végrehajtó caspase 3 és 7 zimogén dimerekként vannak jelen (Boatright és mtsai., 2003). Ezeket a más proteázok által végzett proteolízis aktiválhatja. A caspase 6 nem olyan alaposan tanulmányozott, mint a caspase 3 és 7, de a hosszú prodomén hiánya alapján és az iniciátorok által feltételezett downstream hasítása alapján az effektor caspase-okhoz tartozik (Boatright és Salvesen, 2003). A caspase 3 és 7 számos közös (pl., poli(ADP-ribóz) polimeráz-1=PARP-1), míg a caspase 6 csak a lamin A és B szubsztráttal rendelkezik, melyek hasításához ezen enzim aktivitása feltétlenül szükséges. Az enzim vagy aktivációjának hiányában a kromatin állomány kondenzálódása és az apoptotikus test kialakulása elmarad (Ruchaud és mtsai., 2002). A caspase 3 képes a caspase 6-ot, 7-et és pozitív visszacsatolás révén a caspase 9-et is aktiválni. A caspase 3 esszenciális olyan karakterisztikus apoptotikus jellemvonások megjelenésében, mint a DNS fragmentáció, valamint a PARP-1 és a caspase aktivált DNáz (CAD) hasítás (Nagata, 2000; Lakhani és mtsai., 2006) (3. ábra).

2.4. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet (PACAP) 1989-ben először birka hipotalamuszból izolálták, mely az adenilát-cikláz (AC) aktivitását stimulálta a hipofízis anterolaterális sejteiben (Miyata és mtsai., 1989). Izolálását követően további gerinces taxonokban is azonosították, többek között pontyban, békában, csirkében, egérben, patkányban és emberben is. Nukleotid és aminosav szekvencia analízisek során megállapították, hogy legalább 96%-os azonosság figyelhető meg a PACAP esetében a gerinces taxonok között. Ez a megfigyelés nagyfokú filogenetikai konzerválódottságra utal (Sherwood és mtsai., 2000).

A PACAP a szekretin/glukagon/VIP/növekedési hormon releasing hormon szupercsaládba tartozó peptid, mely két, különböző hosszúsággal jellemezhető formában (PACAP-27 és PACAP-38) fordul elő. A PACAP-27 a PACAP-38 27 aminosavas, C terminálison megrövidített formája, ami 68%-os azonosságot mutat a vazoaktív intesztinális peptiddel (VIP) (Pantaloni és mtsai., 1996) (1. táblázat). Előfordulás szempontjából a PACAP-38 jóval dominánsabbnak tekinthető, ugyanis 90%-át adja az emlős szervezetben található PACAP mennyiségének. A PACAP nemcsak a központi és perifériás idegrendszerben, hanem a legtöbb perifériás szervben is megtalálható. Kimutatták a hipokampuszban, a nagyagykéregben, a talamuszban, az amigdalában, a

retinában, a gerincvelőben, a vegetatív pre- és posztganglionáris neuronokban, a kardiovaszkuláris rendszerben, a gonádokban, a májban, a mellékvesében, a bélrendszerben és az immunrendszer sejtjeiben is (Vaudry és mtsai., 2000; Vincze és Köves, 2001; Dejda és mtsai., 2006; Meyer 2006).

1. táblázat: A VIP, PACAP-27 és PACAP-38 aminosav szekvenciája (Alsina-Fernandez és mtsai., 2005).

Peptid	Seq.ID	Szekvencia
VIP	SEQ ID NO: 1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN
PACAP-27	SEQ ID NO: 2	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVL-NH_2
PACAP-38	SEQ ID NO: 3	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYQRVKNK-NH_2

2.5. A PACAP legfontosabb funkciói

A PACAP pleiotropikus regulátornak tekinthető, azaz számos, egymástól jelentősen eltérő biológiai hatással rendelkezik. Hormonként/trófikus faktorként, immunmodulátorként, neurotranszmitterként, neuromodulátorként funkcionál, stimulálja a sejtproliferációt és sejtdifferenciációt a perifériás és központi idegrendszerben egyaránt (Sherwood és mtsai., 2000; Vaudry és mtsai., 2009). Glutamát és N-metil-D-aszpartát (NMDA) indukálta excitotoxicitás, etanol, ischémia, valamint anisomicin által kiváltott sejthalál során mutatott erős anti-apoptotikus hatásának következtében a neurotoxikus kutatások középpontjában van (Dohi és mtsai., 2002; Silveira és mtsai., 2002; Vaudry és mtsai., 2002,b; Tamás és mtsai., 2004). A PACAP és receptorainak egyedfejlődés során mutatott korai, embrionális expressziója arra utal, hogy fontos szerepet tölt be a fejlődési folyamatokban is (Bagnoli és mtsai., 2003). Számos tanulmány bizonyítja, hogy a PACAP hatással van a sejtproliferációra, sejtdifferenciációra, sejtmigrációra, sejtnövekedésre, neuronális túlélésre és szöveti regenerációra (Meyer, 2006; Dejda és mtsai., 2008; Njaine és mtsai., 2010).

2.5.1. A PACAP neuroprotektív hatása

Az irodalomban számos olyan tanulmány született, mely a PACAP neuroprotektív tulajdonságát írja le *in vitro* és *in vivo* körülmények között.

A kisagyi granuláris sejtkultúrákat (cerebellar granule cell= CGC) széles körben alkalmazzák az apoptózis természetes mechanizmusának tanulmányozására. Ez a modell kifejezetten alkalmas a PACAP neuroprotektív hatásának vizsgálatára, ugyanis a PACAP megvédi a CGC-ket a programozott sejthalállal szemben a kisagy fejlődése során (Vaudry és mtsai., 2000). Beszámoltak arról is, hogy etanol jelenlétében ugyanezen granuláris sejtek neurit növekedése megáll és a sejt zsugorodásával, a sejtmag kondenzációjával, valamint a DNS fragmentációjával együtt járó apoptózisuk következik be. Ugyanakkor a PACAP protektív hatása megakadályozta ezt az etanol indukálta apoptotikus sejthalált (Vaudry és mtsai., 2002 b). Hasonló anti-apoptotikus hatást figyeltek meg oxidatív stressz, valamint a szfingolipid metabolitokként ismeretes ceramidok által indukált apoptózissal szemben is (Vaudry és mtsai., 2002 a; Vaudry és mtsai., 2003).

Más, *in vitro* modellként használatos, mellékvesevelőből származó feokromacitóma (PC) sejtvonalú, PC12 sejtekben szintén bizonyítást nyert a PACAP neuroprotektív hatása β-amyloid által indukált citotoxicitás esetén. A PACAP megemelte a túlélő sejtek számát, valamint javította a neurit növekedés mértékét is, alátámasztva ezzel pozitív hatását (Onoue és mtsai., 2002). Ismert, hogy az anisomicin a transzláció gátlásával és szignáltranszdukciós útvonalak szabályozásával képes megakadályozni a sejtek differenciációját, valamint apoptózist indukál (Törőcsik és Szeberényi, 2000). A PACAP azonban képes volt megakadályozni ezen ágens, differenciálódó sejtekre gyakorolt negatív hatását a fejlődő retina NBL rétegében (Silveira és mtsai., 2002). Patkány agykérgi sejtkultúrákban a PACAP kivédte a glutamát indukálta neuronális sejthalált, a peptid jelenlétében a túlélő sejtek száma megemelkedett a kezeletlen mintákban mértekhez képest (Morio és mtsai., 1996). A PACAP retinális ganglion sejtkultúrákban, valamint intravitreális (i.v) injekcióját követően is képes volt a sejtek életképességét megnövelni, ugyanezen toxicitás esetén (Shoge és mtsai., 1999; Tamás és mtsai., 2004).

A PACAP az ischémia által indukált neurodegenerációban is hatásosnak bizonyult, intracerebroventrikulárisan és intravénásan alkalmazva, tartós közép cerebrális artéria elkötés esetén (permanent middle cerebral artery occlusion; PMCAO) nagymértékben csökkentette az infarktus kiterjedését, *in vivo* (Uchida és mtsai., 1996). Traumatikus agyi sérülés patkány modelljeiben a PACAP képes volt csökkenteni az axonális sérülés, az

apoptózis és az agyi ödéma mértékét (Kövesdi és mtsai., 2008; Mao és mtsai., 2012). Parkinson-kórban szintén hatásosnak mutatkozott, többek között azáltal, hogy redukálta a dopaminerg neurodegeneráció mértékét a substantia nigrában (Reglődi és mtsai., 2004).

2.5.2. A PACAP fejlődésre gyakorolt hatása

Korábbi tanulmányok bizonyítják, hogy a PACAP gén nagymértékben expresszálódik a központi idegrendszer fejlődése során (Masuo és mtsai., 1994; Tatsuno és mtsai., 1994). A neuropeptidet mRNS szinten már az embrionális fejlődés korai szakaszában, E13 napon detektálni tudták patkány kortexben, hipokampuszban és a hipotalamuszban is (Skoglösa és mtsai., 1999). A cerebellum Purkinje sejtjeiben a sejtproliferáció intenzív szakaszában, vagyis a születést követő első héten lehetett PACAP expressziót detektálni (Nielsen és mtsai., 1998). Ezekből az eredményekből arra következtettek, hogy a PACAP neurotrófikus faktorként funkcionál a központi idegrendszer fejlődésében.

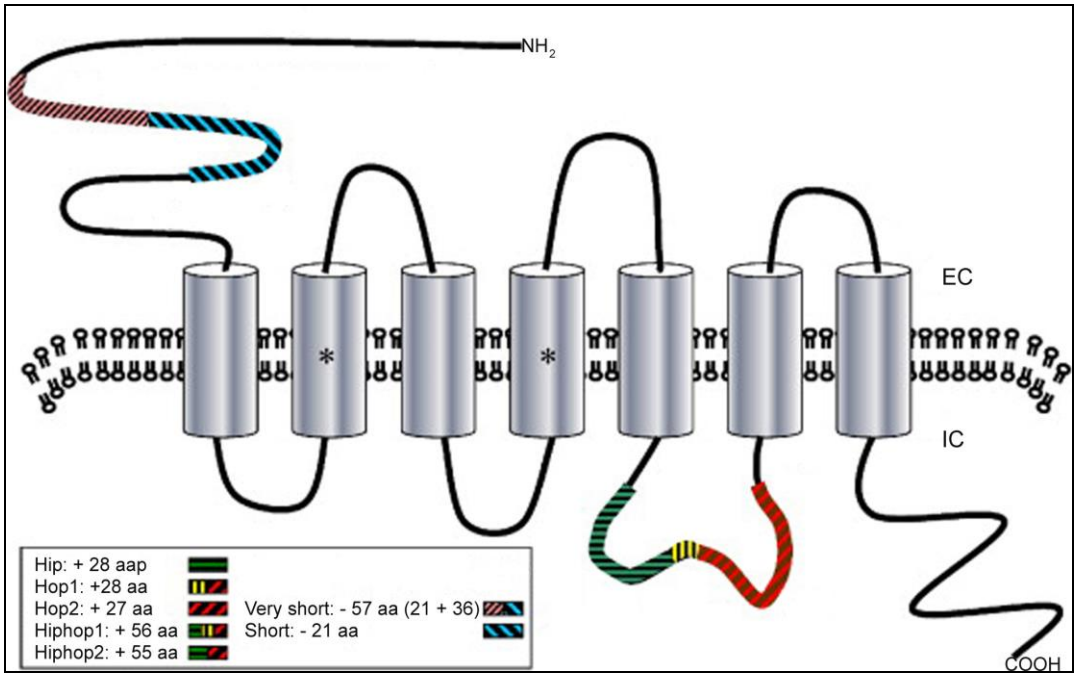
Más eredmények a neuropeptid és receptorainak jelenlétét szintén az embrionális időszakban, az E15-16 napon mutatták ki a szimpatikus neuroblasztokban, ahol is a receptor aktivációja különböző hatásokat indukált: megnövelte a prekurzorok mitotikus aktivitását és a neuroblasztok túlélési képességét, valamint stimulálta a neuritok növekedését (Lu és mtsai., 1996). Szintén bizonyított hatása a PACAP-nak, hogy a fejlődés korai stádiumában képes elősegíteni a neokortikális prekurzor sejtek differenciációját (Lu és DiCicco-Bloom, 1997) és stimulálja a fejletlen kisagyi granuláris sejtek túlélését (Vaudry és mtsai., 1999).

Borba és mtsai. (2005) kimutatták, hogy a PACAP képes megemelni a tirozin-hidroxiláz expresszióját a retinális dopaminerg sejtkultúrákban, ezáltal befolyásolva a katekolamin szintézis enzimeinek mennyiségét. Tehát a PACAP a fejlődő idegrendszerben a sejtek proliferációjára és differenciációjára gyakorolt hatásán kívül képes endogén faktorként is hatni a neurokémiai fenotípusok meghatározásában.

2.6. PACAP receptorok és receptorokhoz kapcsolt szignáltranszdukciós útvonalak

A PACAP három különböző receptoron: a PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptorokon keresztül fejti ki hatását, melyek mindegyike a G protein-kapcsolt receptorok családjába

tartozik. A PAC1 receptor százszor nagyobb affinitással köti a PACAP-ot, mint a VIP-et, míg a VPAC1 és VPAC2 forma azonos affinitást mutat a két peptiddel szemben (Gottschall és mtsai., 1990). A receptorok azonos jellegzetessége a hét transzmembrán domén, valamint az intracellulárisan elhelyezkedő C- és extracelluláris N-terminális szekvenciák. Az alternatív splicing eredmények alapján a PAC1 receptornak húsz izoformáját tudjuk elkülöníteni gerincesekben, melyekből 16 csak az emlősökben, 11 pedig patkányban is előfordul. A beazonosított izoformák közül fontos megemlíteni a short, very short, null, hip, hop1, hop2, hiphop1 és hiphop2 variánsokat, melyek eltérő ligand-kötő szelektivitással és szignál mechanizmussal rendelkeznek (Blechman és Levkowitz, 2013). A short forma 21-, míg a very short a receptor extracelluláris N-terminális doménjét érintő, 57 aminosavat tartalmazó lánc kiesése során jön létre (Pantaloni és mtsai., 1996; Dautzenberg és mtsai., 1999). A PAC1 receptor további splice variánsait a harmadik intracelluláris hurokba beépülő, különböző aminosav kazetták alapján tudjuk elkülöníteni (4. ábra). Ezen hat splice variáns közül a null, a hop1 és a hop2 mind az AC, mind a foszfolipáz-C (PLC), míg a hip izoforma inkább az AC útvonalat aktiválja (5. ábra). A két kazetta kombinációja alapján létrejövő hiphop1 és hiphop2 izoformák intermedier fenotípust képeznek (Dickson és Finlayson, 2009; Blechman és Levkowitz, 2013).

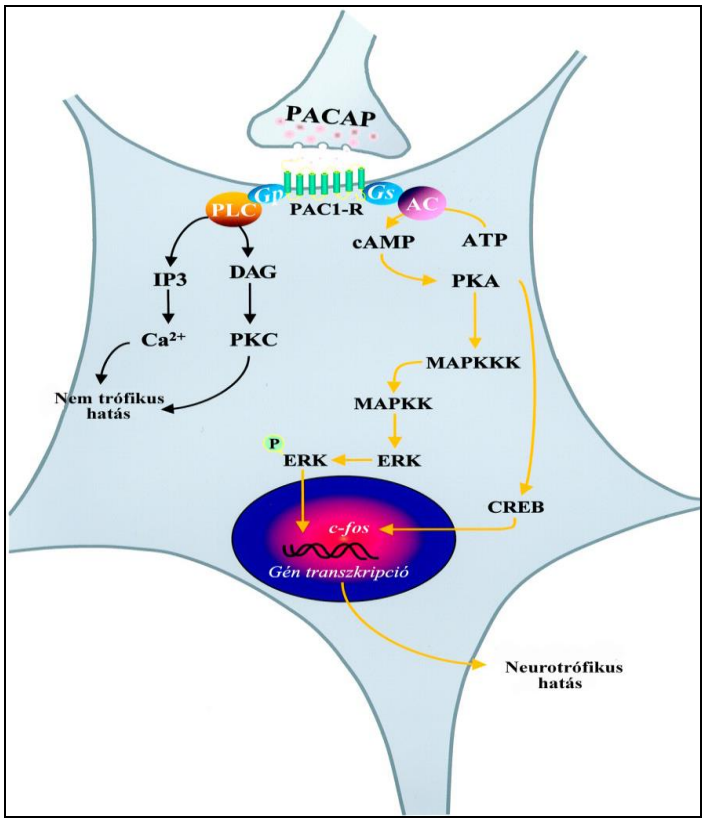


4. ábra: PAC1 receptor és splice variánsainak szerkezete (Dickson és Finlayson, 2009).
EC: extracelluláris tér; IC: intracelluláris tér.

A különböző PACAP receptorok szervezeten belüli eloszlása nagyon változatos. A PAC1 receptorok elsősorban a gerincvelőben, az adenohipofízisben, a hipotalamikus területeken, a mellékvesevelőben, endokrin mirigyekben, valamint a retinában mutathatók ki (Vaudry és mtsai., 2000). VPAC1 és VPAC2 receptorokat detektáltak a kortexben, hipokampuszban, hipotalamuszban, a hasnyálmirigyben és a retinában is (Vaudry és mtsai., 2009; Lakk és mtsai., 2012).

Az AC szignáltranszdukciós útvonal során a specifikus receptor aktivációja a ciklikus adenozin-monofoszfát (cAMP) termelődését váltja ki. A cAMP a protein-kináz A (PKA) enzimeken keresztül, közvetetten indukálja az extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK), valamint a cAMP-függő DNS válaszelemet kötő fehérjék (CREB) foszforilációját. Ezen molekulák a sejtmagba jutva génexpressziós változásokat indítanak el (Vaudry és mtsai., 2000) (5. ábra).

A másik útvonal esetében a Gq proteinhez kapcsolt PLC enzim a foszfoinozitol-4,5-biszfoszfátot hasítja diacilglicerolra (DAG) és inozitol-1,4,5-triszfoszfátra (IP_3). A keletkező DAG protein-kináz C (PKC) aktiválásán keresztül hat, míg az IP_3 az intracelluláris Ca^{2+} -raktárakból lévő Ca^{2+} felszabadulását idézi elő (Cavallaro és mtsai., 1995) (5. ábra).



5. ábra: PACAP által aktivált szignáltranszdukciós útvonalak (Vaudry és mtsai., 2000).

2.7. Az L-glutamát szerepe a retina fiziológiájában

Kutatási eredmények bizonyítják az serkentő neurotranszmitterként funkcionáló L-glutamát és receptorainak retinában való expresszióját. Az L-glutamát jelen van a fotoreceptorokban, a bipoláris- és ganglionsejtekben (Davanger és mtsai., 1994). Receptorai feloszthatók egy nem szelektív kation csatornát tartalmazó ionotróp és G proteinhez kapcsolt metabotróp osztályra. Az ionotróp glutamát receptorok egy nem szelektív kation csatornát tartalmaznak és tovább csoportosíthatók az agonistájuk szelektivitása alapján, NMDA és nem-NMDA [kainsav (KA) és α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolepropion sav (AMPA)] receptorokra (Thoreson és Witkovsky, 1999). A metabotróp csoport a G-proteinekkel való kapcsolódás, valamint az eltérő szignáltranszdukciós útvonalak aktiválása révén osztható tovább (Thoreson és Witkovsky, 1999). Egyik csoportja ($mGlu_{1,5}$) a G_q/G_{11} fehérjén keresztül képes elindítani a PLC útvonalat, míg második ($mGlu_{2,3}$) és a harmadik csoport ($mGlu_{4,6,7,8}$) a G_i/G_o proteinnel való közvetlen kapcsolat révén gátolja az AC aktivitást (Prezeau és mtsai., 1992; Thoreson és Witkovsky, 1999). A receptorok széles skálájának köszönhetően az L-glutamát számos hatást fejt ki a posztszinaptikus neuronokon.

Habár az L-glutamát fontos szerepet játszik a retina és a központi látórendszer normális fiziológiai folyamataiban, számos betegségben, mint a glaukómában, ischémiában, traumatikus sérülésekben és cukorbetegségben is az L-glutamát emelkedett szintjét detektálták (Dreyer és mtsai., 1996; Mawrin és mtsai., 2003; Diederen és mtsai., 2006; Pulido és mtsai., 2007). Az L-glutamát viszonylag alacsony koncentrációban képes excitotoxikus sejthalált indukálni (Otori és mtsai., 1998), melynek következtében az L-glutamátot vagy nátriumsóját (nátriumglutamát; MSG) széles körben használják fiziológiai modellekben, annak érdekében, hogy az endogén L-glutamát lehetséges toxikus hatásait felerősítsék és vizsgálják. Bizonyított, hogy az L-glutamát szint emelkedése apoptózis aktivációjához vezet (Sucher és mtsai., 1997; Chen és mtsai., 2001), melyet a sejtmembrán szerkezetének megváltozása, a DNS fragmentációja és a sejt zsugorodása kísér (Rogalińska, 2002).

A kísérleti adatok nagy része *in vitro* tanulmányokból származik (Chen és mtsai., 2001; Lee és mtsai., 2009; Swartz és mtsai., 2013), melynek legfőbb oka, hogy az L-glutamát felnőtt állatokban nem képes áthatolni a vér-retina gáton (Tomi és mtsai., 2005). Bár az *in vitro* modellek jóval kutatottabbak, mint az *in vivo*-k, mégis az utóbbiak jóval

lényegesebbek az L-glutamát biológiai hatásainak feltérképezésében. Ennek a problémának a kiküszöbölésére hoztak létre egy olyan *in vivo* modellt, mely újszülött állatokban tudja vizsgálni az L-glutamát neurodegeneratív hatásait (Dénes és mtsai., 2011). Ebben a modellben bizonyságot nyert, hogy a neurodegeneratív folyamat intrinszik útvonalában mind az iniciátor (caspase-9 és -12), mind az effektor (caspase-3,-6 és -7) caspase enzimek aktivációja bekövetkezik (Dénes és mtsai., 2011).

3. Problémafelvetés és célkitűzések

A Bevezetésben ismertetett összefüggések alapján kutatási munkámban a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Jól definiált az irodalomban a PACAP MSG indukálta retinális degenerációkban érvényesülő neuroprotektív és anti-apoptotikus hatása *in vivo* (Tamás és mtsai., 2004). Azonban ezen excitotoxicitás kivédését biztosító, PACAP által aktivált szignáltranszdukciós útvonalak azonosítása neonatális patkány retinában tisztázásra vár. Ezért a kísérletek során szerettük volna azonosítani a PACAP neuroprotektív hatásmechanizmusának subcelluláris folyamatait MSG indukálta sejthalál esetén, neonatális patkány retinában:

   a. a PACAP1-38 anti-apoptotikus hatásában érintett enzimek (caspase-3 és -9, PKA) mennyiségi változásának vizsgálata szubkután (s.c) MSG, valamint intravitreális (i.v) AC, PLC blokkoló és PACAP1-38 együttes beadásával.

2. Több tanulmány is született a PACAP receptorok és a PAC1 receptor izoformák előfordulásáról embrionális és felnőtt gerinces modellekben *in vitro* és *in vivo* (Lu és mtsai., 1998; Ajpru és mtsai., 2002; Njaine és mtsai., 2010). Mindezek ellenére a posztnatális fejlődés során megjelenő összes receptortípus leírása patkány retinában, valamint ezek expressziós szintjeiben bekövetkező változások pontos mennyiségi meghatározása hiányos. Ezért a kísérletek ezen csoportjában célul tűztük ki a patkány retinában expresszálódó PACAP receptorok azonosítását és expressziójuk mennyiségi változásainak meghatározását a posztnatális fejlődés során, valamint a PAC1 receptorok korai, posztnatális retinafejlődésben betöltött szerepének vizsgálatát:

   a. PACAP receptorok és PAC1 splice variánsok génexpressziós mintázatának vizsgálata különböző posztnatális fejlődési stádiumokban (P0, P1, P3, P5, P10, P15, P20),
   b. az expresszálódó receptor izoformák fehérjeszintű megjelenésének vizsgálata.

3. Szintén bizonyított a PACAP sejtproliferációra, sejtdifferenciációra, sejtnövekedésre és neuronális túlélésre gyakorolt pozitív hatása (Scharf és mtsai., 2008). Azonban az eddigi vizsgálatok nem terjedtek ki azon gének azonosítására, expressziójuk változásának vizsgálatára az emlős retinában, melyek a PACAP hatások kialakításában szerepet játszanak. Ezért a vizsgálatok utolsó csoportjában az i.v PACAP1-38 kezelés egészséges, újszülött patkány retinára gyakorolt hatását kívántuk megfigyelni:

a. expressziós változást mutató gének azonosítása őssejt PCR array használatával,
b. a főbb génútvonalak meghatározása a már azonosított gének segítségével és a PCR array eredményének pontosítása további gének vizsgálatával, valamint azok expressziós mintázatának leírásával,
c. a PACAP1-38 által kiváltott génexpressziós változások fehérjeszinten történő megerősítése,
d. a retina struktúrájában, valamint a retinális sejtpopulációkban, PACAP kezelés hatására bekövetkező változások detektálása P0-P5 fejlődési stádiumban.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Kísérleti állatok

A kísérletekhez különböző korú, mindkét nemből származó, albínó Wistar patkányokat használtunk. Az állatok tartása és kísérleti eljárásokba való részvétele a Pécsi Tudományegyetem Állatetikai Bizottsága által engedélyezett (BA02/2000-6/2006). Altatásuk során minden esetben Forane-t (Abbott Laboratories) használtunk, vagy 50 mg/ml tiopentált (Abbott Laboratories) injektáltunk intraperitoneálisan (i.p) az állatok hasüregébe. Az állatok dekapitálása altatott állapotban történt.

4.2. Génexpressziós vizsgálatok

4.2.1. Állatok kezelése/Szövetpreparálás

A génexpressziós vizsgálatokhoz újszülött (P0), valamint P1, P3, P5, P10, P15 és P20 napos patkányokat használtunk. Az expresszálódó PACAP receptorok és PAC1 splice variánsok meghatározásához kezeletlen retinákat távolítottunk el az állatokból.

A PACAP1-38 kezelés hatásának megfigyelése során az állatok egyik csoportjába szemenként i.v 2.5 µl 0.2 µg/µl (100 pmol), fiziológiás sóoldatban oldott PACAP1-38-at (SZTE-ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet, Szeged) injektáltunk, míg a kontroll csoport egyidejűleg ugyanakkora mennyiségű 0.9 %-os fiziológiás sóoldatot kapott. A szemeket 3, 6, valamint 12 órával a kezeléseket követően távolítottuk el, a retinákat dietilén-pirokarbonáttal (DEPC) RNáz-mentesített foszfát pufferelt sóoldatba (PBS) különítettük el a szemserleg többi részétől. A szöveteket szárazjégen fagyasztottuk, majd felhasználásig -80 ºC-on tároltuk.

4.2.2. RNS extrakció

A teljes RNS kinyerését RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) segítségével végeztük, mely egyben alkalmas volt a genomikus DNS eltávolítására is. Az így nyert minták RNS koncentrációját spektrofotométerrel (NanoDrop ND 1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, illetve Eppendorf Biophotometer plus) mértük meg 260 nm-en. A fehérjeszennyezés megállapításához az abszorbanciát 280 nm-en is meghatároztuk. A 260/280 arány minden esetben magasabb volt, mint 1.8, tehát a minták fehérjementesnek voltak tekinthetők.

4.2.3. Reverz transzkripció (RT)

A teljes RNS frakció 2 µg-ját használtuk fel mintánként. A reakciókhoz 5x RT puffert (Thermo Scientific), 5 µM oligodT-t (Thermo Scientific), 0,1M ditiotreitolt (DTT) (Sigma Aldrich), 2.5 mM dNTP-t (Thermo Scientific), 50 unit/µl H^- Revert Aid reverz transzkriptázt (Thermo Scientific), valamint a megfelelő végtérfogat eléréséhez szükséges RNáz mentes desztillált vizet (Thermo Scientific) mértünk össze. A reverz transzkripció folyamatát a 2. táblázat ismerteti.

2. táblázat: A reverz transzkripció lépései.

Hőmérséklet (ºC)	65	25	37	42	82
Időtartam (min)	5	10	10	50	3

4.2.4. Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR specifitásának növelése érdekében touchdown-PCR-t alkalmaztunk, melynek lényege, hogy a kezdeti hőmérsékletet 3-5 ºC-kal T_m felettire állítjuk be, majd a ciklusok során fokozatosan csökkentjük (T_m-mel megegyező, vagy annál alacsonyabb hőmérséklet), így biztosítva a pontatlan bekötődések kivédését. Az amplifikáció során a 25 µl-es reakcióelegyekbe 4 µl cDNS-t, 50 nM forward primert, 50 nM reverz primert és megfelelő mennyiségű Maxima Hot Start PCR Master Mix-et (Fermentas) mértünk össze. A PCR program pontos lépéseit a 3. táblázatban tüntettük fel. A felamplifikált mintákat 1.5%-os, etídium-bromidot tartalmazó agaróz gélben futtattuk meg.

3. táblázat: A touchdown-PCR program lépései.

Hőmérséklet (ºC)	95	94	60	72	94	55	72	72
Időtartam	10 min	20 sec	30 sec	20 sec	20 sec	30 sec	20 sec	3 min
Ciklusszám	1	5 (-0,5 ºC/ ciklus)			40			1

A 4. táblázatban feltüntetett primereket használtuk a PCR reakciókhoz. A splice variáns független PAC1 primereket a Poli(A) farok közelébe, a 3' nem kódoló területre terveztük, míg a PAC1 receptor izoforma primerek a splice variáns specifikus exonokra és exon határokra lettek tervezve.

4. táblázat: PAC1 receptor és splice variánsainak primer szekvenciája.

Név	Forward primer (5'-3')	Reverz primer (5'-3')
PAC1	CTTCCAGGGCTTTGTGGTGG	TGCTCTTGCTCAGGATGGA
Null	GGGACACCTACTGTGTGTGTAA	GGCCAGCCGTAAGTAGATGC
Hip	GCATTCACCCCCTTTCCTACG	CCTCCCCATTCAGGAAGCAG
Hop1	CGAGTCCAGCATCTACTTCAGC	CACAAGTCTTTCCCTCTTGCTGACG
Hop2	CGAGTCCAGCATCTACTTC	AACACAAGTCTTTCCCTCTTGC
Hiphop1	CAACGAGTCCAGCATCTACTTCTG	CACAAGTCTTTCCCTCTTGCTGACG
Hiphop2	GCATTCACCCCCTTTCCTCTG	CACAAGTCTTTCCCTCTTGCTGACG
RPL13a	CCAGAGGTTTTGGGGTCAGAA	GCAGTTGCAGACAAACTGGAGG

4.2.5. Őssejt PCR array futtatása

A futtatásokhoz 96 csöves patkány Stem cell (Őssejt) RT2 profiler TM PCR array (Qiagen) lemezeket használtunk. A PCR array zsebeibe a 3, valamint a 6 órás kezelésekből származó cDNS-t tartalmazó SYBR Green PCR reakcióelegyeket juttattunk. A reakcióelegyek végtérfogata 25 µl volt. Összetétele: 4 µl cDNS minta, 8.5 µl RNáz mentes desztillált víz (Thermo Scientific) és 12.5 µl 2x SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific). A futtatásokat StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems) géppel végeztük. A PCR program lépéseit az 5. táblázat ismerteti.

5. táblázat: A PCR program lépései.

Hőmérséklet (ºC)	95	95	60	72
Időtartam	3 min	15 sec	1 min	3 min
Ciklusok száma	1	40		1

Az eredmények kiértékelését ΔΔCT alapú program segítségével végeztük (http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php). Minden esetben a kontroll egyedekben mért expressziós szinthez viszonyítottunk.

Az általunk használt array a 6. táblázatban feltüntetett gének vizsgálatára volt alkalmas.

6. táblázat: Őssejt PCR array-ben megtalálható gének sora.

Őssejt specifikus markerek	**Gének rövidítése**
Sejtciklus regulátorok	Apc, Axin1, Ccna2, Ccnd1, Ccnd2, Ccne1, Cdk1, Cdc42, Ep300, Fgf1, Fgf2, Fgf3, Fgf4, Myc, Notch2, Pard6a, Rb1
Kromoszóma és kromatin modulátorok	Kat2a, Hdac1, Hdac2, Myst1, Myst2, Rb1, Tert
Szimmetrikus/aszimmetrikus sejtosztódást reguláló gének	Dhh, Ihh, Notch1, Notch2, Numb, Pard6a
Őssejtmegújítást jelző markerek	Hspa9, Myst1, Myst2, Neurog2, Sox2
Citokinek és növekedési faktorok	Bmp1, Bmp2, Bmp3, Cxcl12, Fgf1, Fgf2, Fgf3, Fgf4, Igf1, Jag1, LOC306312 (Gdf2), Gdf3 (Gdf3)
Sejtkommunikációt szolgáló gének	Dhh, Dll1, Gja1, Gjb1, Jag1
Sejtadhéziós gének	Acan, Apc, Bglap, Cd4, Cd44, Cdh1, Cdh2, Catna1 (Ctnna1), Cxcl12, Ncam1
Metabolikus markerek	Abcg2, Aldh1a1, Aldh2, Fgfr1
Őssejt differenciációs markerek	
Embrionális sejtvonal markerek	Actc1, Ascl2, Foxa2, Isl1, Krt15, Msx1, Myod1, Pdx1 (Ipf1), T
Hematopoetikus sejtvonal markerek	Cd19, Cd3d, Cd3e, Cd4, Cd8a, Cd8b, Mme
Mezenhimális sejtvonal markerek	Acan, Alpi, Bglap, Col1a1, Col2a1, Col9a1, Pparg
Neurális sejtvonal markerek	Cd44, Ncam1, Sigmar1, S100b, Tubb3
Fontosabb szignál útvonalak	
Notch útvonal	Dll1, Dll3, Dtx2, Dvl1, Ep300, Kat2a, Hdac1, Hdac2, Jag1, Notch1, Notch2, Numb
Wnt útvonal	Adar, Apc, Axin1, Btrc, Ccnd1, Fzd1, Myc, Ppard, Wnt1

4.2.6. Kvantitatív real-time PCR (RT-PCR)

a., PACAP receptorok és PAC1 izoformák meghatározása

Az előzőekben említettek alapján a kísérletekben natív, kezeletlen, különböző életkorú (P0, P1, P3, P5, P10, P15 és P20) egyedekből származó cDNS mintákat használtunk fel. A 25 µl végtérfogatú reakcióelegyek 4 µl cDNS-t, 5 µM forward primert, 5 µM reverz primert, 12.5 µl SYBR Green PCR Master Mix-et (Thermo Scientific) és a végtérfogat elérése érdekében RNáz mentes desztillált vizet tartalmaztak. Minden mintát triplikátumként futtattunk. Az RT-PCR program lépéseit a 7. táblázat ismerteti. Minden esetben a P0 mintákban mért génexpressziós szintek szolgáltak kontrollként. A fluoreszcens szignálok normalizációja érdekében, endogén kontrollként RPL13a-t használtunk.

7. táblázat: Az RT-PCR program lépései.

Hőmérséklet (ºC)	95	95	57-60	72
Időtartam	10 min	15 sec	20 sec	20 sec
Ciklusok száma	1	50		

b., PACAP kezelés hatása a génexpresszióra

A vizsgálatokhoz a P1 életkorú, 3, 6, valamint 12 órás, 2.5 µl 0.2 µg/µl (100 pmol) PACAP1-38 kezeléseket kapott állatokból származó cDNS-ket használtuk. Az eredmények pontosabbá tétele érdekében a reakcióelegyeket triplikátumokban futtattuk. A 20 µl végtérfogatú reakcióelegyek 3 µl cDNS-t, 5 µM forward primert, 5 µM reverz primert, 10 µl SYBR Green PCR Master Mix-et (Thermo Scientific), valamint a megfelelő végtérfogat elérése érdekében RNáz mentes desztillált vizet (Thermo Scientific) tartalmaztak. Az RT-PCR program lépéseit a 8. táblázat ismerteti. A kezelt állatok száma legalább 4 volt. Az eredmények értékelésénél minden esetben a kontroll egyedekben mért expressziós szinthez viszonyítottunk. A fluoreszcens szignálok normalizációja érdekében, endogén kontrollként roboszómális protein L13a-t (RPL13a), valamint laktát-dehidrogenázt (LacD) használtunk.

8. táblázat: Az RT-PCR program lépései.

Hőmérséklet (ºC)	95	95	57-60	72
Időtartam	10 min	15 sec	20 sec	20 sec
Ciklusok száma	1	50		

A PCR arrayben változást mutató gének kiegészített sorát, génspecifikus primereikkel együtt feltüntetve a 9. táblázatban foglaltuk össze.

4.2.7. Kiértékelés

Az eredmények kiértékeléséhez a StepOnePlus PCR rendszerhez mellékelt StepOne szoftvert (Applied Biosystems) használtuk. Mivel az endogén kontroll (RPL13a, LacD) és a mintagének erősítési hatékonysága (amplification efficiency) közel azonos volt, a ΔΔCT módszer segítségével határoztuk meg a kontroll mintákhoz képest bekövetkező expressziós változásokat. Ebből a relatív kvantifikációból az következik, hogy a diagrammokon ábrázolt expressziós változás értéke csak azt mutatja meg számunkra, hogy egy génnek az mRNS szintje a kontroll egyedhez képest hányszorosára nőtt vagy hányad részére csökkent. Az expressziós változások statisztikai analízisét független minták T próbájával

végeztük el. Amennyiben a statisztikai analízis során annak valószínűsége (p), hogy az összehasonlítandó eredmények átlaga azonos, kisebbnek bizonyult, mint 0.05 (5%), az átlagok különbségét szignifikánsnak tekintettük.

9. táblázat: Forward és reverse primerek szekvenciája.

Forward primerek	Szekvencia (5'-3')	Reverz primerek	Szekvencia (5'-3')
R_Acan_F	TGGGTTCACACCAAGAGTCC	**R_Acan_R**	TGGGTTCACACCAAGAGTCC
R_Btrc_F	TTGATGACAAGTACATCGTTTCTG	**R_Btrc_R**	CAGGTACTTGTGTTCCACACCT
R_Cd44_F	GGTGGTTTCGACACTGTGACT	**R_Cd44_R**	CCACTGTCTTGATTCCCACTT
R_Dhh_F	ACCGCCTGATGACAGAGC	**R_Dhh_R**	GCCTTCGTAGTGCAGTGAGTC
R_Fgf1_F	GCAAGGTTTTGGTGCTTACC	**R_Fgf1_R**	TCGATGGTGCGTTCAAGAC
R_Fgf2_F	TCTTCCTGCGCATCCATC	**R_Fgf2_R**	GCTTGGAGCTGTAGTTTGACG
R_Fgf4_F	TGGGTTCACACCAAGAGTCC	**R_Fgf4_R**	TGGGTTCACACCAAGAGTCC
R_Fgf8_F	CAGGTCCTGGCCAACAAG	**R_Fgf8_R**	GTATCGGTCTCCACAATGAGC
R_Fgf9_F	CGGTACTATCCAGGGAACCA	**R_Fgf9_R**	CAGGCCCACTGCTATACTGAT
R_Gja1_F	AGCCTGAACTCTCATTTTTCCTT	**R_Gja1_R**	CCATGTCTGGGCACCTCT
R_Gjb1_F	GAGAAGAGCGACCGATGC	**R_Gjb1_R**	GTGAGGGAGGGGTTGGAT
R_Bmp4_F	CGGGCTTGAGTACCCTGAG	**R_Bmp4_R**	TGGGATGTTCTCCAGATGTTC
R_Bmp9_F	TGGGTTCACACCAAGAGTCC	**R_Bmp9_R**	TGGGTTCACACCAAGAGTCC
R_Msx1_F	TGGGTTCACACCAAGAGTCC	**R_Msx1_R**	TGGGTTCACACCAAGAGTCC
R_Mash1_F	CTGGGAATGGACTTTGGAAG	**R_Mash1_R**	TGACGTCGTTGTCAAGAAACA
R_Math5_F	TGGGTTCACACCAAGAGTCC	**R_Math5_R**	TGGGTTCACACCAAGAGTCC
R_NeuroD1_F	GCAGAAGGCAAGGTGTCC	**R_NeuroD1_R**	TTTGGTCATGTTTCCACTTCC
R_Neurog1_F	CTCGGGGAGCACCCTTAC	**R_Neurog1_R**	CAGGTATCCCTCCCCTCTTTA
R_Nanog_F	TGGGTTCACACCAAGAGTCC	**R_Nanog_R**	TGGGTTCACACCAAGAGTCC
R_Oct4_F	CCTGCAGCAGATCACTAGCAT	**R_Oct4_R**	CACTCGAACCACATCCCTCT
R_Dlx1_F	GGGACTCACACAGACTCAGGT	**R_Dlx1_R**	CCTTGCTTCATCAGCTTCTTG
R_Dlx2_F	TGGGTTCACACCAAGAGTCC	**R_Dlx2_R**	TGGGTTCACACCAAGAGTCC
R_Chx10_F	TGGGTTCACACCAAGAGTCC	**R_Chx10_R**	TGGGTTCACACCAAGAGTCC
R_Pax6_F	GCCCTCACCAACACGTACA	**R_Pax6_R**	AGGTCTGACTGGGGACTGG
R_Otx2_F	GGTATGGACTTGCTGCATCC	**R_Otx2_R**	AGTTGTGCCCTCGTGAAAGT
R_Gdf3_F	CCAAGCTGTCTCCAATCTCC	**R_Gdf3_R**	TCTACCCACACCCACACTCA
R_T_F	ACCTGCAGTAGTGATGCCA	**R_T_R**	GGACCCTAGGCAAAGGACTC
R_Wnt1_F	CACCCTCATCCCAACTCACT	**R_Wnt1_R**	ATAGCTACAGCGGCAGGAGA
R_Skp1_F	CGCCTGAGGAGATTCGTAAA	**R_Skp1_R**	CACACCACTGGTTCTCTTTGC
R_L1CAM_F	CCCATGAAAGACGAGACCTT	**R_L1CAM_R**	TGCCTAGGGGTTTGATGTCT
R_RPL13a_F	CTCATGAGGTCGGGTGGAAGTA	**R_RPL13a_R**	TGGGTTCACACCAAGAGTCC
R_LacD_F	CACCCTCACCAAACATGCCTA	**R_LacD_R**	CACTTGAGTGGTTGGTTCCATCA

4.3. Fehérjék mennyiségi változásainak analízise

4.3.1. Állatok kezelése/Szövetpreparálás

a., A PAC1 receptor protein szintű meghatározása:

Az előzőekben említettek alapján a kísérletekben natív, kezeletlen, különböző életkorú (P1, P3, P5, P10, P15 és P20) egyedeket használtunk.

b., A PAC1 receptorhoz kapcsolódó, lehetséges szignátranszdukciós útvonalak feltérképezése:

A kísérletek ezen csoportját P1 korú albínó Wistar patkányokon végeztük. Az állatok egyik csoportja a neurodegeneráció indukálása érdekében s.c 2 mg/ttg MSG-t kapott fiziológiás sóoldatban oldva, míg a kontroll csoport egyedeibe ugyanakkora mennyiségű 0.9%-os fiziológiás sóoldatot injektáltunk. Ezzel egy időben a kísérleti állatok szemenként, i.v, fiziológiás sóoldatban oldott: 2.5 µl 0.2 µg/µl (100 pmol) PACAP1-38-at, 20 és 100 nmol AC inhibitorként ismert 2',4'-dideoxi-adenozint (DDA, Enzo Life Science), 5 és 10 µmol foszfatidilkolin-specifikus PLC inhibitort (D609CAS, Merck-Millipore), valamint DMSO-ban oldott: 5 és 10 nmol foszfatidilinozitol-specifikus PLC inhibitort (Et-18-OCH_3, Sigma Aldrich) kaptak különböző kombinációkban. A retinákat 3 és 6 órával a kezeléseket követően távolítottuk el.

c., A génexpressziós változások vizsgálata fehérje szinten:

A kísérletek során P1 korú albínó Wistar patkányok használtunk. A kezelések során az állatok egyik csoportjánál i.v 2.5 µl 0.2 µg/µl (100 pmol) PACAP-ot injektáltunk szemenként, míg a kontroll állatok ugyanekkora térfogatú 0.9%-os fiziológiás sóoldatot kaptak. A kezeléseket követő 12. és 24. óra elteltével távolítottuk el a retinákat.

Mindhárom esetben a kipreparált retinákat azonnal szárazjégre helyeztük és a felhasználásukig - 80 ºC-on tároltuk.

4.3.2. Western blott analízis

a., Protein kivonás:

A retinákat 150 µl hipotóniás, vagy radioimmunprecipitációs assay (RIPA) lízispufferben 5 percig jégen homogenizáltuk, majd 10 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően a mintákat 30

percig 13 000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk, majd a felülúszót elválasztottuk a szöveti üledéktől.

b., Protein koncentráció meghatározása:

A minták protein koncentrációinak méréséhez BCA Protein Assay Kit-et (Thermo Scientific) használtunk. A technika a Cu^{2+} ion Cu^{+} ionná történő redukcióján alapszik. A reakció során egy lila színű termék képződik, melynek abszorpciós maximuma 562 nm-en van. A spektrofotometriás méréseket Biophotometer plus (Eppendorf) műszerrel hajtottuk végre.

c., Minta előkészítése elektroforézishez:

A mintákat standardizáltuk, beállítva a koncentrációjukat 1 µg/µl-es értékre. A protein mintákhoz LDS mintapuffert és 500 mM DTT-t adtunk, majd 70 ºC-on inkubáltuk 10 percig.

d., Elektroforézis:

A futtatáshoz NuPAGE 4-12%-os gradiens (Life Technology), illetve 10 vagy 12%-os poli-akril-amid gélt használtunk. Az elektroforetikus tank belső kompartmentjébe antioxidánst tartalmazó 3-morfolinopropánszulfid sav (MOPS) futtató puffert töltöttünk. A gél zsebeibe 25-30 µg proteint juttattunk, majd az elektroforézis során a minták gélbe való teljes belépéséig 100 V, később pedig 180 V feszültséget alkalmaztunk.

e., Transzferálás:

A művelet során a géllel megegyező méretű polivinilidén difluorid (PVDF) membránt (Perkin Elmer) használtunk. A félszáraz transzferáló készülékbe (BioRad) való behelyezés előtt a filterpapírokból, a membránból és a gélből szendvicset készítettünk. Az elektroforetikus transzferálást 25-30 percig, 120 mA-en végeztük.

f., Immunblott:

A transzferálást követően a membránokat szobahőmérsékleten szárítottuk 1 órán keresztül, majd blokkoló oldatban 30 percig inkubáltuk, a nem specifikus kötőhelyek lekötése érdekében. A membránokat a primer antitestet tartalmazó blokkoló oldatban inkubáltuk egy teljes éjszakán át, 4 ºC-on. A normalizáláshoz anti-β-tubulin (1:10 000, Sigma-Aldrich), valamint anti-glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) (1:10 000,

Sigma-Aldrich) antitestet alkalmaztunk. A western blott analízisek során használt primer antitestek listáját a 10. táblázatban tüntettük fel.

10. táblázat: A Western blott analízishez használt primer anitestek.

Primer antitest	Gazda	Higítás	Forgalmazó
anti-aktív Caspase 3	nyúl	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-aktív Caspase 9	nyúl	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-foszfo PKA	nyúl	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-PAC1	nyúl	1:3000	Pierce
anti-Bmp 4	egér	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
anti-Fgf 1	kecske	1:1000	R&D Systems
anti-Wnt 1	egér	1:500	Cell Application
anti-Dlx 2	egér	1:500	Santa Cruz Biotechnology
anti-Gdf 3	nyúl	1:5000	Abcam
anti-Math 5	nyúl	1:1000	Abcam
anti-Gjb 1	nyúl	1:1000	Millipore

A membránok, TRIS-pufferelt sóoldat TWEEN-20-ban (TBST) történő mosását követően, 2 órán át szobahőmérsékleten anti-egér (1:10 000, Sigma Aldrich), anti-nyúl (1:10 000, Sigma Aldrich) és anti-kecske (1:10 000, Sigma Aldrich) IgG torma-peroxidázzal konjugált antitesteket tartalmazó blokkoló oldatban inkubáltuk.

g., Jeldetektálás és kiértékelés:

Az antitest-antigén kapcsolódás detektálásához Western Lightning Chemiluminescence Plus reagenst (Perkin Elmer) használtunk, melyekben a membránokat 60 sec-ig előinkubáltuk. Ezt követően az előhívást filmkazettában végeztük, mely során Kodak X-OMAT Blue Autoradiograph filmet (Sigma Aldrich) helyeztünk a membránokra, vagy FluorChem Q Imaging rendszer (ProteinSimple) segítségével detektáltuk a kemilumineszcens jelet.

A szignálok kvantifikációját AlphaView Q software (ProteinSimple) használatával végeztük el. Az eredmények statisztikai elemzését egyutas ANOVA teszttel, míg a posthoc analízist Dunett teszttel készítettük. Amennyiben a statisztikai analízis során annak valószínűsége (p), hogy az összehasonlítandó eredmények átlaga azonos, kisebbnek bizonyult, mint 0.05 (5%), az átlagok különbségét szignifikánsnak tekintettük.

h., Western blott analízisek során használt oldatok:

RIPA puffer: 10 mM foszfát puffer pH 7.2, 1% NP-40, 1% Na-deoxikolát, 0.1%szódium-dodecil-szulfát (SDS), 0.15 M NaCl, 2 mM EDTA, 2 µg/ml aprotonin, 0.5 µg/ml leupeptin, 2 mM Na-vanadát, 20 mM Na-fluorid, 0.5 mM DTT és 10 mM fenilmetilszulfonil fluorid (PMSF);

Hipotóniás lízis puffer: 20 mM TRIS-HCl pH 7.8, 10 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$, 2 µg/ml aprotonin, 0.5 µg/ml leupeptin, 2 µM Na-vanadát, 20 µM Na-fluorid, 0.5 mM DTT, 10 mM PMSF;

20 x futtató puffer /törzsoldat/: 50 mM MOPS, 50 mM TRIS, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, H_2O;

20 x transzfer puffer /törzsoldat/: 25 mM Bicine, 25 mM TRIS, 1 mM EDTA, H_2O;

TRIS-pufferelt sóoldat TWEEN-20 (TBST): 20 mM TRIS /1 M-os/, 150 mM NaCl /3 M-os/, 0.1% TWEEN-20;

Blokkoló oldat: 5% tejpor, 1% szarvasmarha szérum albumin (BSA), TBST.

4.4. cAMP mennyiségi meghatározása

4.4.1. Állatok kezelése/Szövetpreparálás

A kísérleteinket P1 korú albínó Wistar patkányokon végeztük. Az állatok egyik csoportja a neurodegeneráció indukálása érdekében s.c 2 mg/ttg MSG-t kapott, míg a kontroll csoport egyedeibe ugyanakkora mennyiségű 0.9%-os fiziológiás sóoldatot injektáltunk. Ezzel egy időben a kísérleti állatok szemenként, i.v 2.5 µl 0.2 µg/µl (100 pmol) PACAP1-38-at, fiziológiás sóoldatban oldott, 100 pmol adenilát-cikláz aktivátort (forskolin, Merck), vagy megegyező mennyiségű 0.9%-os fiziológiás sóoldatot kaptak. A retinákat 1, 2, 3, 4, valamint 5 órával a kezeléseket követően távolítottuk el.

4.4.2. Mintaelőkészítés

A szövetek homogenizálását 150 µl 0.1 M HCl oldatban, fecskendő segítségével végeztük 5 percig, majd további 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk. A mintákat 13 000 rpm fordulatszámon, 30 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk a szöveti üledéktől. A neutralizálás érdekében 15 µl 1 M NaOH-ot adtunk minden egyes mintához. A lizátumok teljes protein koncentráció meghatározását BCA^{TM} Protein Assay Kit (Pierce) segítségével határoztuk meg. Ezt követően a felülúszókat a Calibrator Diluent RD5-55-el (R&D Systems) higítottuk a kétszeres térfogatra.

4.4.3. Assay procedúra

A kísérletek során Parameter™ Mouse/Rat kompetitív cAMP immunassay-t használtunk (R&D Systems). A minták minden esetben duplikátumok formájában kerültek fel a lemezre. A streptavidin által bevont lemez minden zsebét mosó pufferrel 3x kimostuk, majd a nem specifikus kötő zsebek kivételével 50 µl biotinilált primer antitestet juttattunk a zsebekbe és 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltunk. Az ismételt mosást követően 50 µl egér/patkány cAMP konjugátumot minden egyes zsebbe, valamint 100 µl zero standard-et, a megfelelő higítású cAMP standard-et és a mintákat a megfelelő zsebekbe pipettáztuk. A két órás inkubációt követően a cAMP detektálás érdekében 100 µl szubsztrát oldattal 30 percig tovább inkubáltunk. A reakciókat 100 µl stop oldat hozzáadásával állítottuk meg. Az optikai denzitás meghatározását Labsystems Multiscan RC Microplate Reader (Artisan Technology Group) segítségével, 450 nm-en végeztük el. A korrekció 620 nm-en történt.

4.4.4. Kiértékelés

A kiértékelés a 620 nm-en végzett korrekciós eredmények, valamint a standard sor segítségével és a higítási mérték figyelembevételével történt. Az eredmények statisztikai elemzését egyutas ANOVA teszttel, míg a posthoc analízist Dunett teszttel végeztük el. Amennyiben a statisztikai analízis során annak valószínűsége (p), hogy az összehasonlítandó eredmények átlaga azonos, kisebbnek bizonyult, mint 0.05 (5%), az átlagok különbségét szignifikánsnak tekintettük. A cAMP szintjét minden esetben pmol/ml/mg protein egységre vonatkoztatva adtuk meg.

4.5. Morfológiai vizsgálatok

4.5.1. Állatok kezelése/Szövetpreparálás

A kísérleti állatok egyik szemébe i.v 2.5 µl 0.2 µg/µl (100 pmol) PACAP1-38-at, másik szemébe megegyező térfogatú 0.9%-os fiziológiás sóoldatot injektáltunk. A kezelést kétszer ismételtük meg, P1 és P3 korban. A szemek eltávolítását P5 korban végeztük el. A preparálás során a szaruhártyát és a szemlencsét leválasztva szemserleget alakítottunk ki. A félvékony metszetek készítéséhez a szemserlegeket 3 napon át, 4% paraformaldehidet (PFA) és 1% glutár-aldehidet tartalmazó oldatban tartottuk. A teljes (whole-mount)

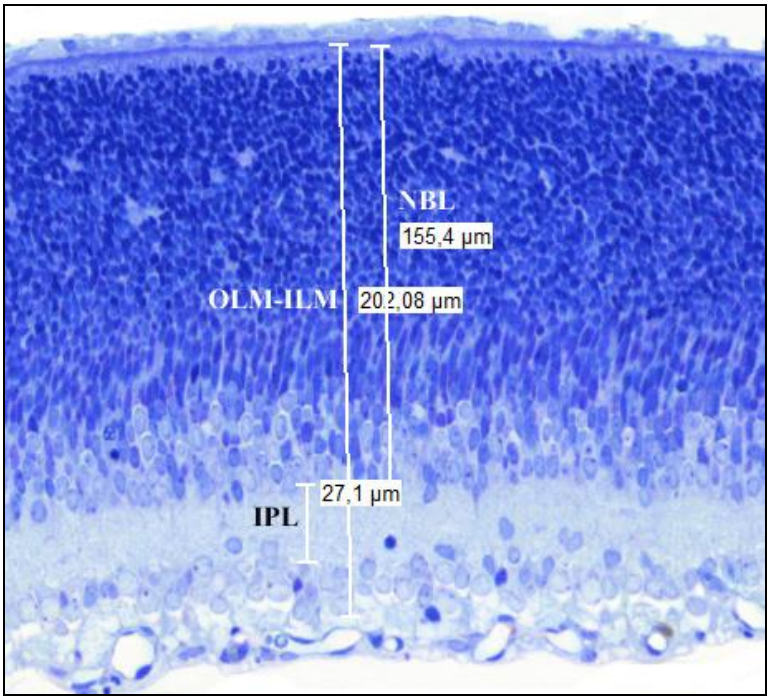
preparátumok és a kriosztátos metszetek esetében a szöveteket 2, illetve 4%-os PFA oldatban 2 órán át, szobahőmérsékleten fixáltuk.

4.5.2. Félvékony metszetek készítése

A paraformaldehidből a mintákat kivéve ötször 10 percig mostuk PBS-ben (pH=7,2). A víztelenítés során a szemserlegeket 15-15 perces lépésekben 30-, 50-, 70- és 90%-os, majd háromszor 20 perces 100%-os felszálló alkoholsoron vittük keresztül. Az alkohol kioldása érdekében a mintákat propilén-oxidban (Sigma-Aldrich) kétszer 15 percet derítettük, majd 3 órán keresztül propilén-oxid - műgyanta (Durcupan ACM, Sigma-Aldrich) 1:1 térfogatarányú elegyében inkubáltuk. A szemserlegek ezt követően szobahőmérsékleten, egész éjszakára tiszta műgyantába kerültek. A következő napon a mintákat friss műgyantával feltöltött blokktartókba helyeztük és 56 °C-on, termosztátban hagytuk polimerizálódni. A szemserlegek beágyazásakor minden esetben az optikus ideg nézett a metszési felszín felé. Így a metszetek számából nyomon tudtuk követni, hogy a retina melyik területét vizsgáljuk (centrális, perifériás). A műgyantába ágyazott mintákból MT-7000 Ultramikrotóm (RMC) segítségével 2-5 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteket 0.5% toluidinkékkel (pH=8.95) festettük. Egy napos száradást követően DPX-el (Sigma-Aldrich) fedtük a tárgylemezeket.

Kiértékelés során a metszeteket Mirax Desk szkennerrel (Carl Zeiss, Németország) digitalizáltuk, míg az adatok kezelését a Panoramic viewer (3Dhistech) szoftver segítségével végeztük. A morfometriai mérések elvégzésekor mindig a centrális retinákat hasonlítottuk össze a kontroll és a kezelt szemben. A centrális retina gyakorlati meghatározásában az általános szabályt vettük figyelembe, mely a vakfolttól mért távolságként 1 mm-t definiál. Mérési felszíneink ezt a távolságot nem lépték túl. Megmértük a teljes retina vastagságát (ez a külső és belső határoló membrán távolságát jelentette, OLM-ILM), az NBL vastagságát, valamint az IPL vastagságát (6. ábra). Továbbá meghatároztuk az IPL és az NBL teljes retina vastagsághoz viszonyított arányát, valamint a GCL rétegben a 100 µm szakaszra eső sejtek számát. Minden szem esetében legalább 15 metszeten végeztük el a méréseket (a n. opticus kilépésétől mindkét irányba), amelyek legalább 30 µm távolságra estek egymástól, így kiküszöbölve annak a lehetőségét, hogy kétszer is ugyanazon sejtet számoljunk meg. A fiziológiás sóoldattal kezelt szem esetében mért értékeket hasonlítottuk össze a 2x-es PACAP1-38-al kezelt szemben mért adatokkal.

A szignifikancia megállapítását független minták T-próbájával végeztük el. Amennyiben a statisztikai analízis során annak valószínűsége (p), hogy az összehasonlítandó eredmények átlaga azonos, kisebbnek bizonyult, mint 0.05 (5%), az átlagok különbségét szignifikánsnak tekintettük.



6. ábra: A félvékony metszeteken alkalmazott mérési paraméterek.
NBL: neuroblaszt réteg; OLM: külső határoló membrán; ILM: belső határoló membrán; IPL: belső rostos réteg.

4.5.3. Immuncitokémia

a., Kriosztátos metszetek készítése

A kriosztátos metszésekhez a szöveteket háromszor 10 percig mostuk PBS-ben, majd 10-, 20- és 30%-os felszálló szaharóz oldatsorban legalább 1-1 órát inkubáltuk. Ezt követően a szemserlegeket O.C.T. compound mounting médiumba (VWR International) ágyaztuk, szárazjégen fagyasztottuk, majd a felhasználásig -20 ºC-on tároltuk. A szöveteket kriosztát segítségével, 10-12 µm vastagságú szeletekre vágtuk. A metszeteket króm-zselatinos tárgylemezre vittünk fel, melyeket az immuncitokémia során használtunk fel.

b., Immuncitokémia speciális sejtmarkerek alkalmazásával:

Az előinkubálás, valamint permeabilizálás során a metszeteket 0.3% Triton X-100-at (VWR) tartalmazó PBS oldatban inkubáltuk 20 percig. Ezt követően a nem-specifikus

kötőhelyek blokkolása érdekében a retina metszeteket 5%-os normál kecske szérumot és 1%-os szarvasmarha szérum albumint (BSA) tartalmazó PBS-ben inkubáltuk (blokkoló oldat, ABS) 20 percig. A metszeteket egér anti-syntaxin-1 (anti-HPC-1; 1:2000), anti-Calbindin (1:1000), valamint birka anti-Chx-10 (homeodomén transzkripciós faktor; 1:1000) antitestet tartalmazó blokkoló oldatban inkubáltuk egy teljes éjszakán át, szobahőmérsékleten. Ezt követően a preparátumokat 6 x 5 percig PBS oldatban mostuk. A metszeteket anti-egér-IgG-448 (1:500) és anti-birka-IgG-557 (1:200) (Life Technologies) szekunder antitestet tartalmazó ABS oldatban inkubáltuk 4-6 órán át. Majd a preparátumokat ismét 6 x 5 percig PBS-ben mostuk.

A metszeteket 4′-6-diamidino-2-fenilindol-t (DAPI) tartalmazó ProLong Gold antifade reagenssel (Invitrogen) fedtük, majd Olympus FV-1000 konfokális lézer szkenning fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

c., Az immuncitokémia során használt oldatok:

Foszfát pufferelt fiziológiás sóoldat (PBS): 0.05 M $NaH_2PO_4(H_2O)$, 0.05 M $Na_2HPO_4(12 H_2O)$, 0.15 M NaCl, H_2O;

Antitest higító oldat (ABS): 5% normál szérum, 1% BSA, 0.1/ 0.3% Triton X-100, PBS.

4.5.4. Whole-mount preparátum készítése

A fixálást követően a retinákat leválasztottuk a szemserleg többi részéről, majd bevágtuk és 6 x 5 percig mostuk PBS-ben. A víztelenítés során a szemserlegeket 10-10 perces lépésekben 50-, 70-, 80-, 90- és 95%-os, majd 100%-os alkoholban inkubáltuk. Ezt követően ismét rehidratáltuk a szöveteket és ugyanannyi ideig tartó, de leszálló alkoholsorban történő inkubációkat hajtottunk végre. A 3 x 20 perces, 0.3%-os Triton X-100-at tartalmazó PBS-es mosás után a szemserlegek 4 ºC-on, blokkoló oldatban inkubálódtak egy teljes éjszakán át. Másnap a retinákat egér anti-Calbindin (1:1000) primer antitest tartalmú blokkoló oldatba helyeztük 2 teljes napra, szintén 4 ºC-ra. Az ismételt, 6 x 5 perces PBS-es mosást követően blokkoló oldatban egy teljes éjszakán át inkubáltunk, mely Alexa-Fluor-448-konjugált anti-egér IgG (1:500) szekunder antitestet tartalmazott. A retinákat DAPI-t tartalmazó ProLong Gold antifade reagenssel (LifeTech) fedtük, majd Olympus FV-1000 konfokális lézer szkenning fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

5. Eredmények

5.1. PACAP által aktivált szignáltranszdukciós útvonalak

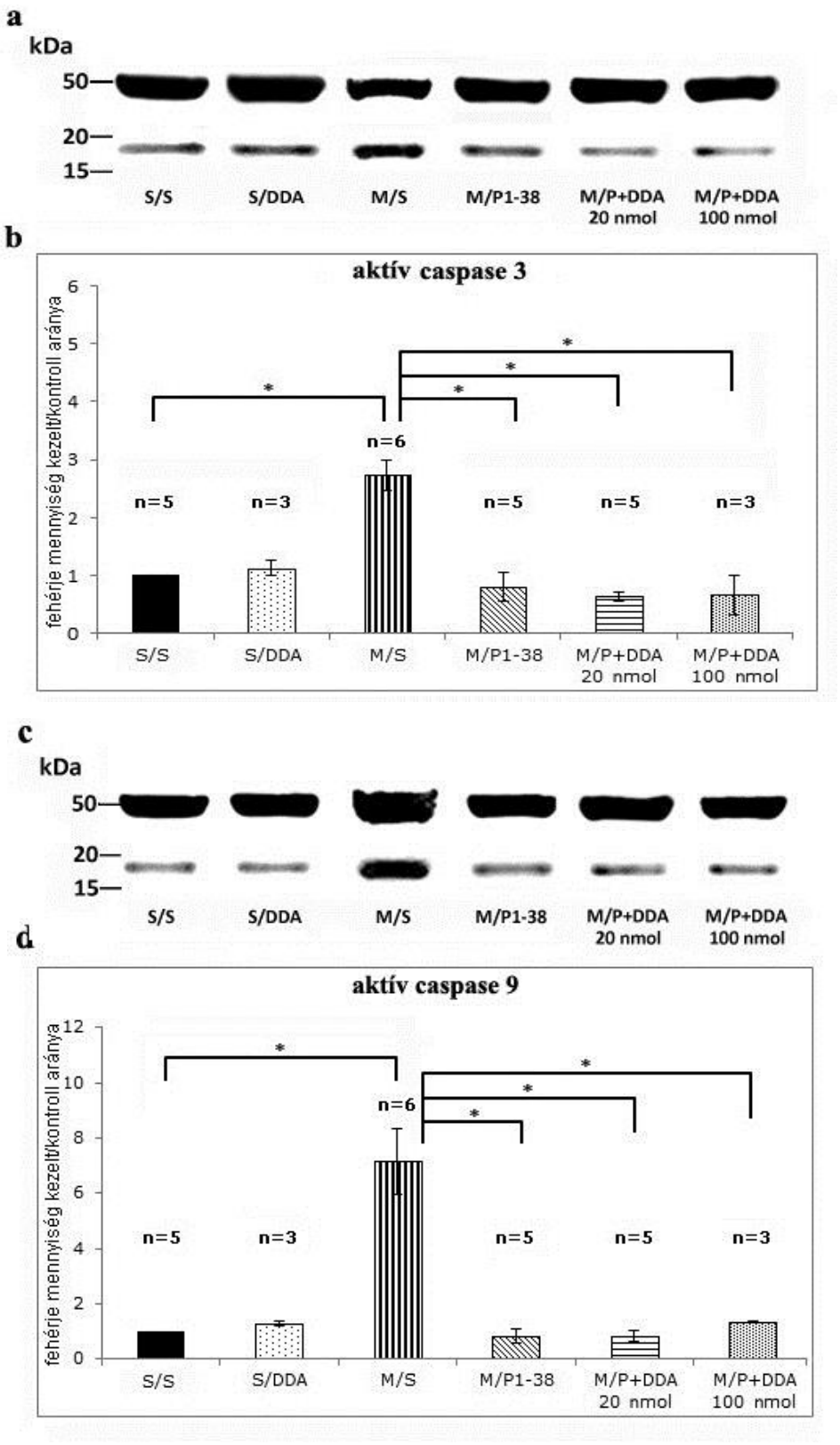
Kísérleteink első szakaszában azon lehetséges szignáltranszdukciós útvonalakat vizsgáltuk meg, melyek a PACAP által aktivált anti-apoptotikus folyamatokban szerepet játszanak, MSG indukálta neurodegeneráció esetén. Tekintve kutatócsoportunk korábbi eredményeit, miszerint az MSG a kezeléseket követő 6. órában emelte meg szignifikánsan a caspase 3 és a caspase 9 mennyiségét neonatális patkány retinában (Dénes és mtsai., 2011), az apoptotikus enzimek szintjét ebben a kísérleti időpontban vizsgáltuk meg.

5.1.1. AC útvonal vizsgálata

5.1.1.1. AC blokkoló hatásának vizsgálata

A G fehérjékhez kapcsolódó receptorok egy csoportja az agonista ligand megkötését követően aktiválja az AC útvonalat a cAMP képződését katalizáló AC enzim által. Annak érdekében, hogy kiderítsük a PACAP1-38 AC útvonalra kifejtett hatását, AC blokkolót alkalmaztunk.

Az AC blokkoló DDA i.v injekciója nem befolyásolta az aktív caspase 3 szintjét (S/DDA). Ezzel szemben a s.c adott MSG szignifikáns, a kontroll mintákhoz képest (S/S) közel háromszoros emelkedést idézett elő az enzim mennyiségében (M/S). Az i.v PACAP1-38 meggátolta a s.c injektált MSG hatását, ugyanis az aktív caspase 3 szintjét a kontrollban mért érték alá csökkentette (M/P1-38). Az AC inhibítor 20 és 100 nmol koncentrációban történő együttes alkalmazása a PACAP1-38-al hasonló eredményt mutatott, nem változtatta meg az apoptotikus enzim kontrollhoz viszonyított mennyiségét (M/P+DDA 20 nmol, 100 nmol). Tehát az AC útvonal kiiktatása ellenére a PACAP ki tudta fejteni anti-apoptotikus hatását, ezzel alacsony értéken tartva a caspase 3 szintjét (7. ábra: a,b). A caspase 9 esetében is hasonló eredményeket figyeltünk meg (7. ábra: c,d).

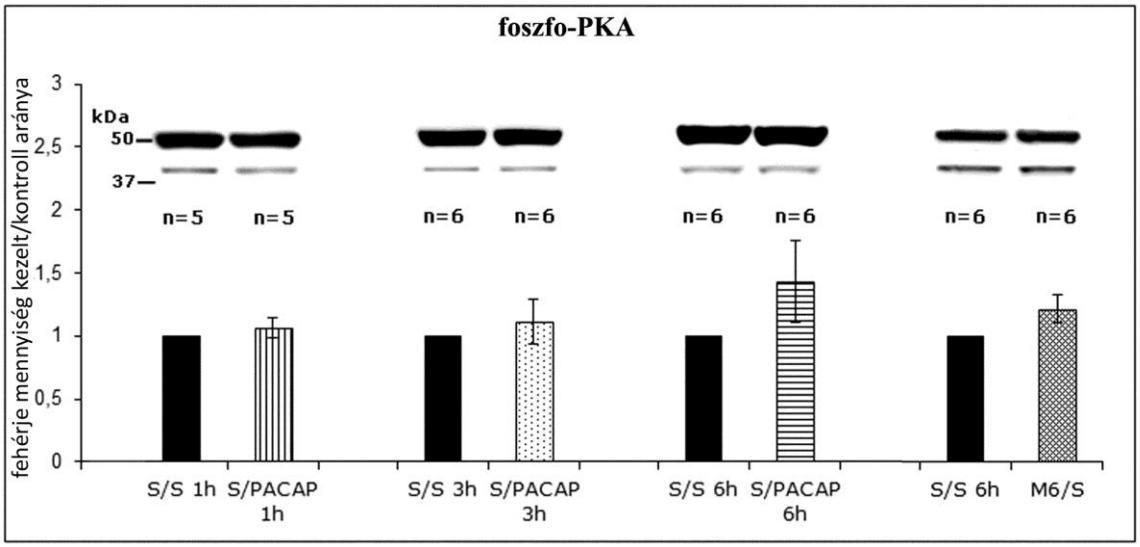


7. ábra: i.v injektált DDA hatása az aktív caspase 3 és caspase 9 szintjére, újszülött patkány retinában. (b,d) Az MSG beadás megemelte a caspase-ok szintjét (M/S), azonban a PACAP1-38 lecsökkentette az enzimek ezen aktivitását (M/P1-38). A DDA együttes alkalmazása PACAP1-38-al nem tudta kivédeni a PACAP hatását, az enzimek szintje alacsony maradt (M/P+DDA 20 és 100 nmol). **(a,c)** A hasított caspase 3 megjelenése 17 kDa-nál, míg a normalizációs kontrollként használt β-tubulin 50 kDa-nál volt megfigyelhető. *:$p \leq 0.05$

5.1.1.2. Foszfo-PKA szint meghatározása

A PKA szint vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az i.v PACAP1-38 1, valamint 3 órával a kezeléseket követően sem tudta megemelni a foszfo-PKA szintjét, mindkét esetben megközelítőleg a kontroll mintákban (S/S) mért mennyiséget mutatta (S/PACAP 1h, S/PACAP 3h). A hat órás kísérletek során egy kismértékű, de statisztikailag nem szignifikáns növekedést tapasztaltunk (S/PACAP 6h).

Az irodalomban már jól ismert, hogy egyes metabotróp glutamát receptorok ($mGlu_{2,3,4,6,7,8}$) a G_i/G_0 proteinen keresztül képesek AC blokkolóként hatni (Thoreson és Witkowsky, 1999), ezért feltételeztük, hogy a DDA azért hatástalan, mert az MSG már eleve blokkolja az AC aktivitását. Azonban eredményeinkben az MSG jelenlétében sem tudtunk csökkenést kimutatni az aktív enzim szintjében (M6/S). Ez a jelenség, miszerint az MSG nem csökkentette a foszfo-PKA szintjét, arra utalhat, hogy az MSG nem hat AC blokkolóként ebben a kísérleti rendszerben (8. ábra).



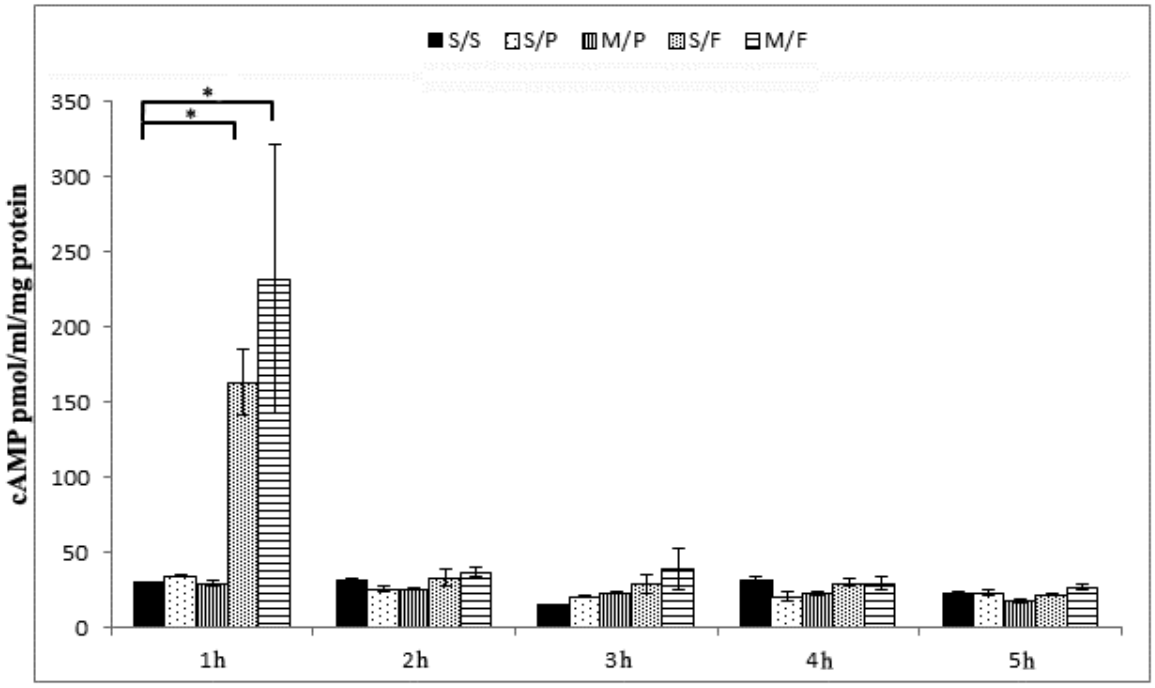
8. ábra: i.v PACAP1-38 és s.c MSG hatása a foszfo-PKA szintjére.
A foszfo-PKA szintje egyik időpontban sem változott szignifikánsan az i.v PACAP kezelés hatására (1, 3, 6h). A s.c MSG kezelés nem tudta szignifikánsan csökkenteni az enzim mennyiségét (M6/S). A belső kontrollként használt β-tubulin 50 kDa-nál, míg az aktív PKA 42 kDa-nál látható. *:$p \leq 0.05$

5.1.1.3. cAMP szint meghatározása

A cAMP az egyik legnagyobb mértékben tanulmányozott másodlagos hírvivő molekula, melynek fő funkciója a szubsztrátspecifitással rendelkező PKA-hoz való kötődése, konformációváltozással járó aktiválása és ezáltal számos celluláris folyamat szabályozása. Ezért, hogy kimutassuk az AC útvonal aktiválódását a PACAP által kiváltott sejtválaszban, megvizsgáltuk a cAMP mennyiségét különböző kombinációjú kezeléseket követően.

Továbbá tanulmányoztuk az AC aktivátor, i.v injektált forskolin hatékonyságát s.c fiziológiás sóoldat vagy MSG jelenlétében.

Az eredményeinkből jól látszik, hogy a cAMP szint 1 órával a kezeléseket követően szignifikánsan megemelkedett mind a fiziológiás sóoldat/forskolin (S/F), mind a MSG/forskolin (M/F) együttes adása esetén, mely pozitív kontrollként bizonyítja a kezelés hatékonyságát. Ugyanakkor a fiziológiás sóoldat/PACAP (S/P), valamint az MSG/PACAP (M/P) kombinációja során az intracelluláris hírvivő molekula szintje nem érte el a kontrollban (S/S) mért értékeket. A többi vizsgálati időpontban (2h, 3h, 4h, 5h) lényeges változásokat egyik kezelés esetében sem tapasztaltunk, a cAMP szintek a kontrollhoz közeli értékeket mutatták (9. ábra).

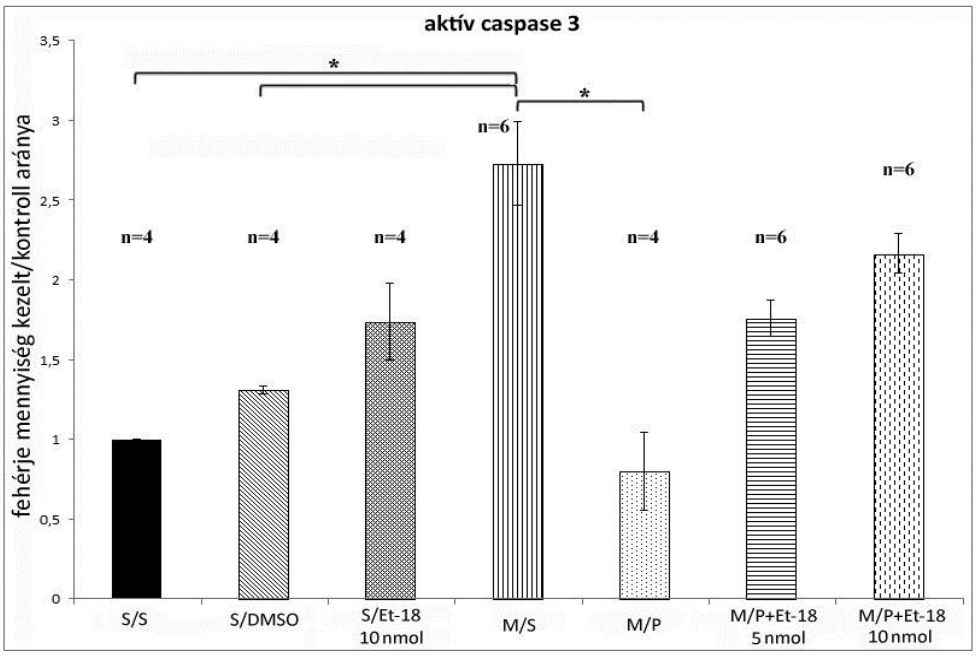


9. ábra: AC aktivátor hatása az intracelluláris cAMP mennyiségére.
A cAMP szinje csak 1 órával a kezeléseket követően emelkedett meg s.c fiziológiás sóoldat (S/F), illetve MSG (M/F) jelenlétében. A többi kezelési kombinációban (S/P, M/P) és időpontban (2, 3, 4 és 5h) lényeges változást nem detektáltunk. *:$p \leq 0.05$

A kapott eredmények alapján a PACAP1-38-al kezelt retinákban sem cAMP, sem aktív-PKA szint emelkedést nem tudtunk detektálni, melyekből arra következtethetünk, hogy a PACAP anti-apoptotikus hatását valószínűleg nem az AC/cAMP/PKA útvonalon keresztül fejti ki, MSG indukálta neurodegeneráció esetén. Eredményeink egyben azt is tükrözik, hogy a PACAP a retinában egyáltalán nem aktiválja az AC útvonalat az általunk alkalmazott dózisban.

5.1.2. PLC útvonal vizsgálata

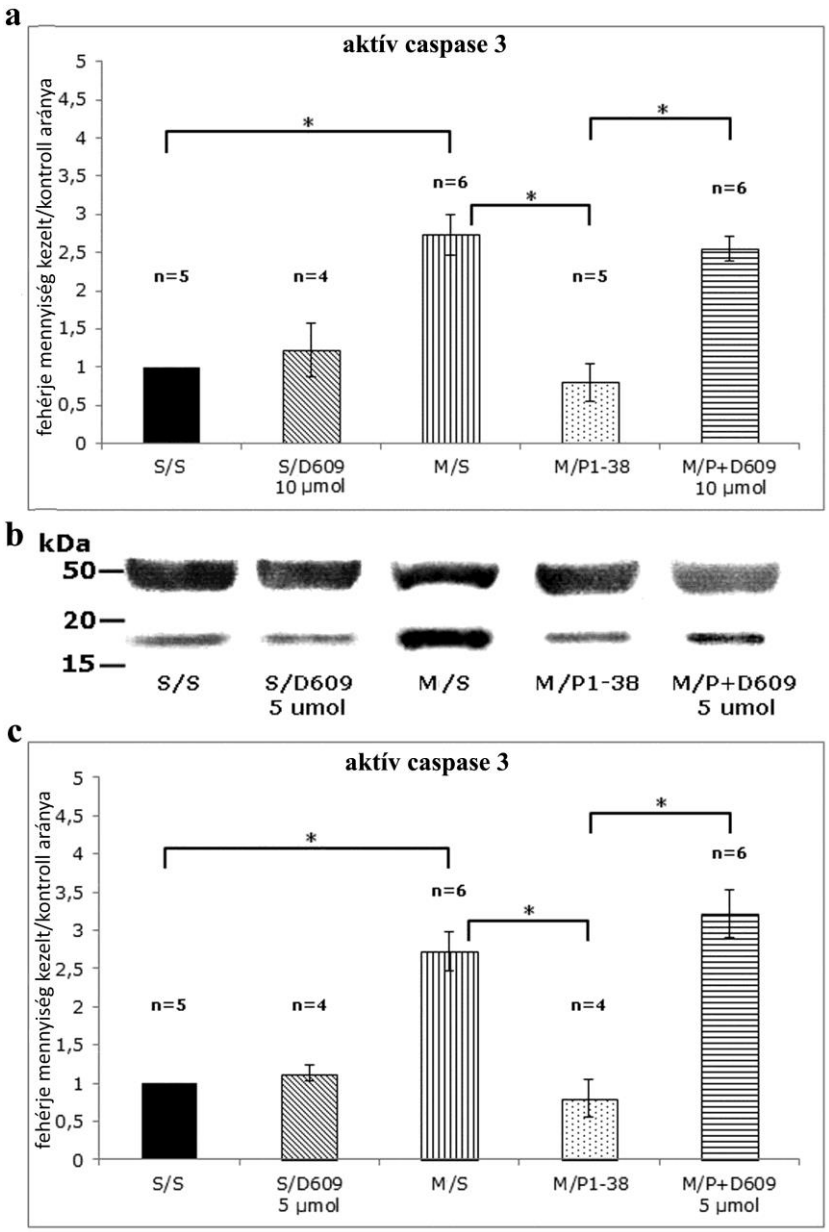
A következő kísérletekben különböző koncentrációjú és típusú PLC blokkolót használtunk, hogy kiderítsük a PACAP esetleges aktiváló hatását a PLC útvonalra. Eredményeinkről elmondható, hogy a foszfatidilinozitol-specifikus PLC inhibitor Et-18-OCH_3 hatástalannak bizonyult, több koncentrációban (M/P+Et-18 5 és 10 nmol) való alkalmazása sem tudta szignifikánsan kivédeni a PACAP apoptotikus enzimekre gyakorolt gátló hatását (10. ábra).



10. ábra: Az aktív caspase 3 szintje Et-18-OCH_3 kezelés hatására.
A PACAP1-38 szignifikánsan lecsökkentette a caspase 3 mennyiségét (M/P). Az Et-18-OCH_3 kismértékű, de szignifikáns emelkedést indukált a caspase 3 szintjében (M/P+Et-18 5nmol, 10 nmol). *:$p \leq 0.05$

A 11. ábra demonstrálja, hogy a foszfatidilkolin-specifikus PLC inhibitor D609CAS önmagában nem befolyásolta a caspase 3 mennyiségét (S/D609 10 µmol). Az MSG beadásakor az apoptotikus enzim aktivációjában nagymértékű növekedést figyelhettünk meg, mely a kontroll mintákhoz képest szignifikánsnak tekinthető (M/S). A PACAP1-38-as kezelés képes volt kivédeni az MSG apoptózist indukáló hatását, az aktív caspase 3 szintje markánsan csökkent (M/P1-38). Azonban az AC blokkolóval ellentétben a D609CAS hatásosnak bizonyult, ugyanis a PACAP1-38 és D609CAS 10 µmol-os koncentrációban való együttes beadása esetén - s.c MSG jelenlétében - a PACAP anti-apoptotikus hatása megszűnt és az aktív caspase 3 szintje az MSG kezelt mintákban mért értékeket közelítette meg (M/P+D609 10 µmol) (11. ábra: a). A PLC inhibitor csökkentett

koncentrációban (5 µmol) való alkalmazása esetén is hasonló változásokat figyelhettünk meg a D609CAS PACAP1-38 indukálta caspase 3 szintjére gyakorolt hatásában (M/P+D609 5 µmol) (11. ábra: b,c).



11. ábra: Az aktív caspase 3 szintje D609CAS kezelés hatására.
(a,c) A s.c MSG egy szignifikáns emelkedést indukált az aktív caspase 3 szintjében (M/S), melyet a PACAP1-38-as kezelés kivédett, az apoptotikus enzim a kontroll érték alá csökkent (M/P1-38). A PLC blokkolóként alkalmazott D609CAS képes volt kivédeni a PACAP anti-apoptotikus hatását, mindkét használt dózis esetén (M/P+D609 10 és 5 µmol). **(b)** A hasított caspase 3 17 kDa-nál, míg a normalizációs kontrollként használt β-tubulin 50 kDa-nál látható. *:$p \leq 0.05$

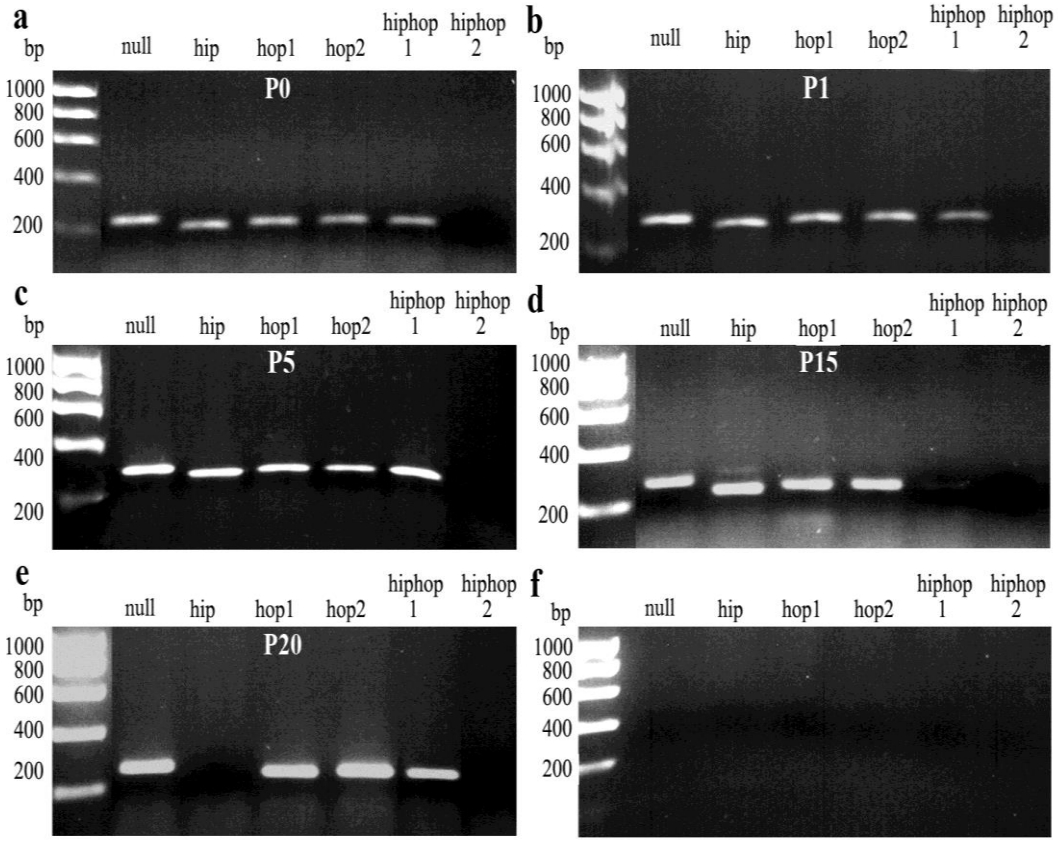
Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy az AC/cAMP/PKA útvonal nem, csak a PLC kapcsolt kaszkád aktiválódik a PACAP anti-apoptotikus hatásának kifejtésében, MSG indukálta neurodegeneráció esetén.

5.2. PAC1 receptor és izoformáinak azonosítása patkány retinában

5.2.1. Izoforma specifikus primerekkel végzett PCR-ok eredményei

Annak érdekében, hogy meghatározzuk azon PAC1 receptor splice variánsok jelenlétét, melyek expresszálódnak patkány retinában, specifikus primerekkel végzett touchdown-PCR vizsgálatokat hajtottunk végre. A fejlődés során öt időpontot választottunk ki (P0, P1, P5, P15, P20), hogy a főbb retinális eseményekkel együtt járó expressziós különbségeket detektálni tudjuk.

A PCR eredmények a fejlődés korai szakaszaiban hasonló profilt mutattak, ugyanis P0, P1 és P5 időpontokban a null, hip, hop1, hop2 és hiphop1 izoforma jelenlétét detektáltuk (12. ábra: a,b,c). P15 stádiumban a null, hip, hop1 és hop2 az előzőekhez hasonló szinten expresszálódott, azonban a hiphop1 elhanyagolható volt, csak egy halvány sáv formájában mutatkozott (12. ábra: d). Ezzel szemben a későbbi időpontban, P20 napon csak 4 variáns volt kimutatható, a hip izoforma jelenlétét nem tudtuk kimutatni (12. ábra: e). A nontemplát kontrollokban termék nem jelentkezett (12. ábra: f).



12. ábra: PAC1 receptor izoformák detektálása a retina különböző fejlődési stádiumaiban. **(a,b,c)** P0, P1 és P5 stádiumban a null, hip, hop1, hop2, hiphop1 splice variánsokat mutattuk ki, **(d)** míg P15 esetében csak a null, hip, hop1 és hop2 expresszálódik, a Hiphop1 alig detektálható. **(e)** P20 napnál a hip izoforma elhanyagolható, míg a null, hop1, hop2 és hiphop1 lényeges mennyiségben expresszálódik. **(f)** A nontemplát kontrollok futtatási képe.

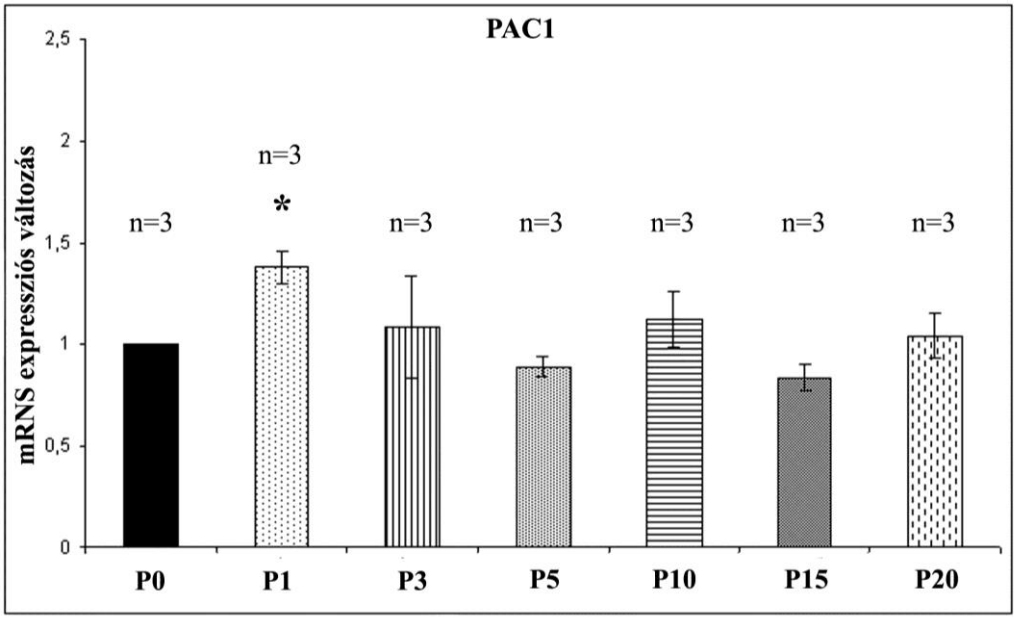
Bár a PCR vizsgálatok öt izoforma (null, hip, hop1, hop2 és hiphop1) jelenlétét igazolták, a futtatásokat követő szekvenálási eredmények a hop2 amplifikátum esetében azonosságot mutatottak ki a hop1-el. A két izoforma egyetlen aminosavban (3 bázispár) különbözik egymástól, mely a hop2 izoforma primereinek hop1-hez való bekötődését eredményezte. Többszöri primer tervezést követően is ugyanezt az eredményt kaptuk, ebből következően a további kísérleteket már csak négy: a null, hip, hop1 és hiphop1 izoformával végeztük el.

5.2.2. A PAC1 receptor és izoformáinak génexpressziós változása a fejlődés során

5.2.2.1. A PAC1 receptor expressziós változása a fejlődés során

A relatív mennyiségi változások meghatározását lehetővé tevő RT-PCR futtatások során először olyan primert alkalmaztunk, mely minden PAC1 splice variáns kimutatására alkalmas. A posztnatális fejlődés minden időpontjában mért értéket a P0 időpontban detektált expresszió mértékéhez viszonyítottuk.

A PAC1 receptor transzkripciós szintje lényeges változást egyik időpontban sem mutatott. Csak egyetlen stádiumban, P1 napon tudtunk kismértékű, de statisztikailag szignifikáns növekedést detektálni. A többi időpontban mért érték lényegében kiegyenlítettnek tekinthető a kontrollhoz képest (13. ábra).

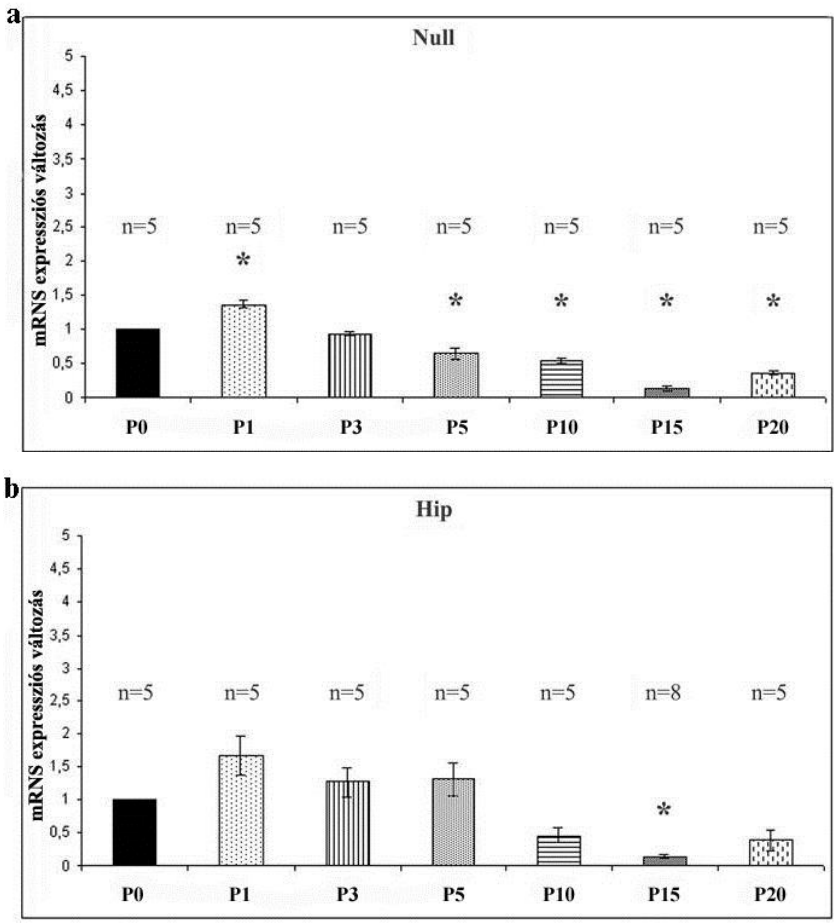


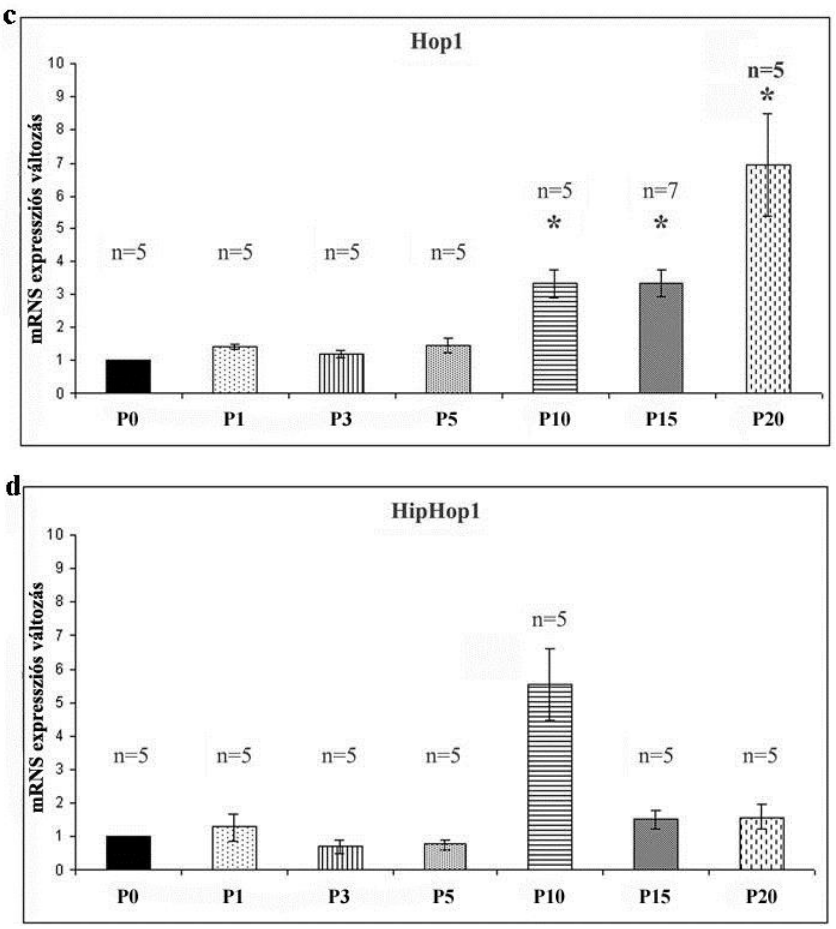
13. ábra: PAC1 receptor expressziós változása a posztnatális fejlődés során.
A PAC1 expressziós szintjében lényeges változás egyik fejlődési stádiumban sem tapasztalható (P1, P3, P5, P10, P15, P20). A kiértékelés során a P0 időpontban mért expressziós szint szolgált referencia értékként. *:$p \leq 0.05$

5.2.2.2. Az egyes izoformák önmagukhoz viszonyított expressziós szintje a fejlődés során

Bár a touchdown-PCR segítségével a PAC1 izoformák szintjében változást detektáltunk, de ez a technika pontos mennyiségi meghatározást nem tesz lehetővé, ezért a splice variáns specifikus primerekkel RT-PCR vizsgálatokat hajtottunk végre. Kísérleteink első csoportjában az egyes izoformák önmagukhoz viszonyított változását detektáltuk a fejlődés különböző időpontjaiban. A kontroll minden esetben az adott variáns P0 időpontban mért szintje volt.

A null és hip izoforma esetében hasonló tendenciát figyelhettünk meg. A P1 napon mért kisebb emelkedést követően a fejlődés előrehaladtával fokozatos csökkenés mutatkozott az expresszió mértékében. Mindkét esetben P15 napnál detektáltuk a legalacsonyabb értéket (14. ábra: a,b). A hop1 variáns ezzel szemben eltérő expressziós mintázatot mutatott. A fejlődés P5 napjáig lényeges növekedést nem tapasztaltunk, azonban az ezt követő időpontokban markáns, statisztikailag szignifikáns emelkedést detektáltunk egészen a P20 stádiumig (14. ábra: c). A hiphop1 esetében egyéni expressziós profilt figyeltünk meg, ugyanis a P10 napon mért nagymértékű, de nem szignifikáns növekedés kivételével változást nem tudtunk kimutatni (14. ábra: d).





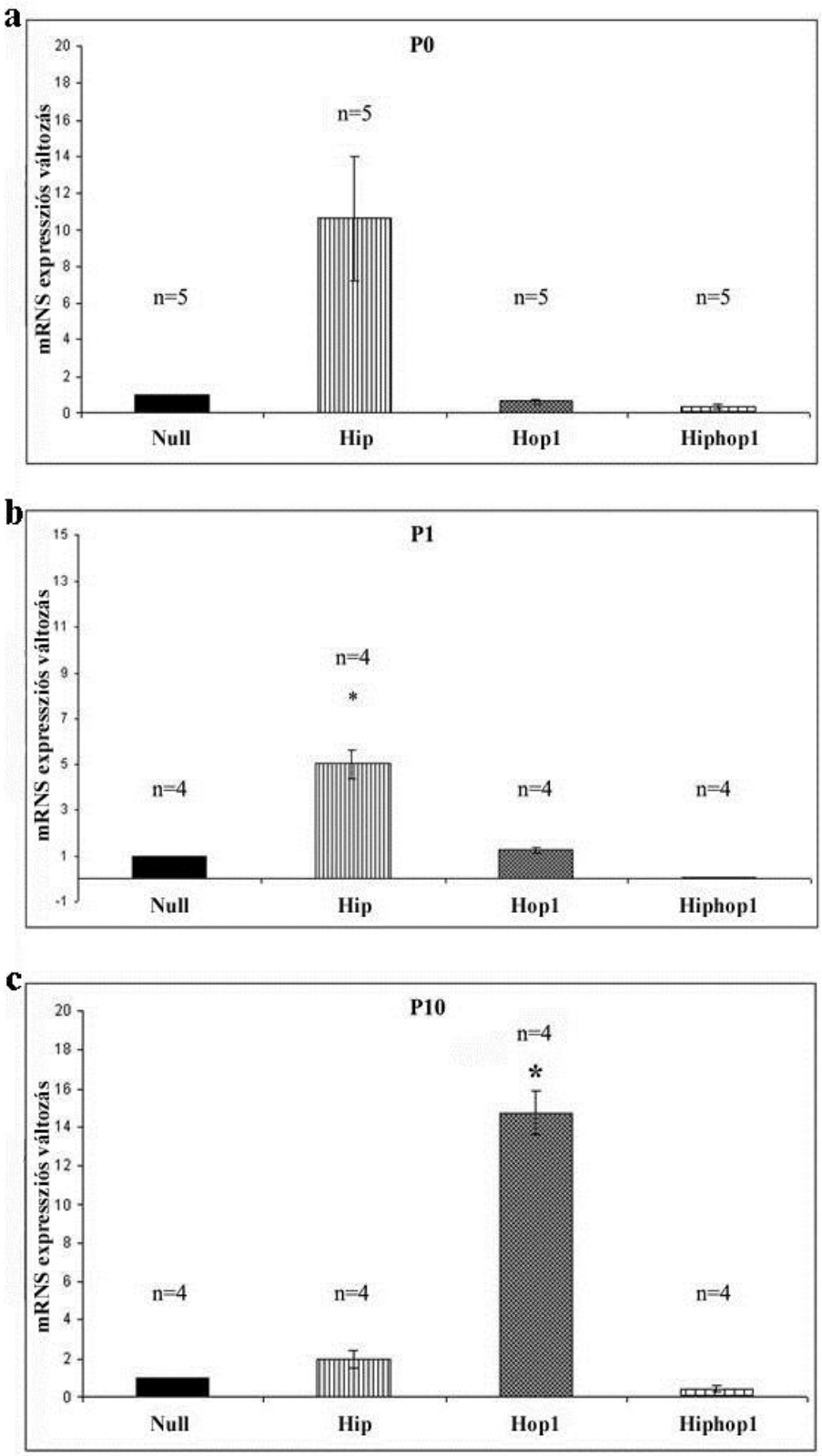
14. ábra: PAC1 receptor izoformák expressziós mintázata a posztnatális fejlődés során.
(a,b) A Null és a Hip izoforma esetében az expressziós változás hasonló tendenciát mutat, a fejlődés előrehaladtával fokozatos csökkenést figyelhetünk meg. **(c)** A Hop1 splice variáns P10 időpontban mutat először markáns expressziós növekedést, mely a későbbi időpontokban is megmutatkozik. **(d)** A Hiphop1 expressziós szintjében P10 napon mért növekedés kivételével változás nem detektálható. Minden esetben a P0 időpontban mért expressziós szint szolgált referencia értékként. *:$p \leq 0.05$

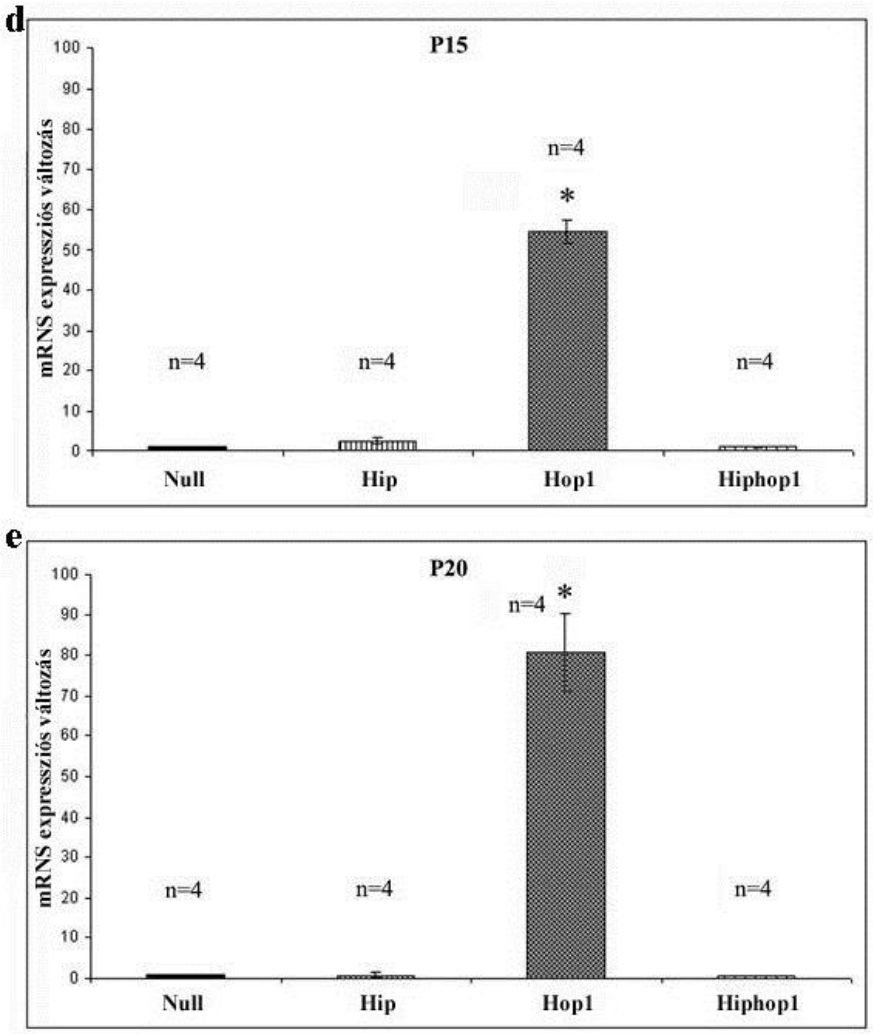
5.2.2.2. Az egyes izoformák egymáshoz viszonyított génexpressziós szintje a fejlődés során

Annak érdekében, hogy az egyes fejlődési időpontokban detektálhassuk az izoformák egymáshoz viszonyított dominanciáját, öt fejlődési stádiumot választottunk ki (P0, P1, P10, P15 és P20). Vizsgálataink során, minden időpontban a null izoforma expressziós szintje szolgált referencia értékként.

Az eredmények azt mutatták, hogy a fejlődés kezdeti szakaszában (P0 és P1) a hip izoforma expresszálódik a legnagyobb mennyiségben, tehát ebben az időpontban ez a variáns tekinthető dominánsnak (15. ábra: a,b). Ez a jelenség a P10 stádium környékére megváltozik, ugyanis a hop1 izoforma felváltja a hip-et (15. ábra: c). A hop1 statisztikailag szignifikáns növekedést mutatott a későbbi (P15 és P20) fejlődési időpontokban is (15.

ábra: d,e). A null izoformához képest a hiphop1 lényeges változást egyik stádiumban sem mutatott (15. ábra: a,b,c,d,e).





15. ábra: A PAC1 receptor izoformák egymáshoz viszonyított expressziós profilja a posztnatális fejlődés során.

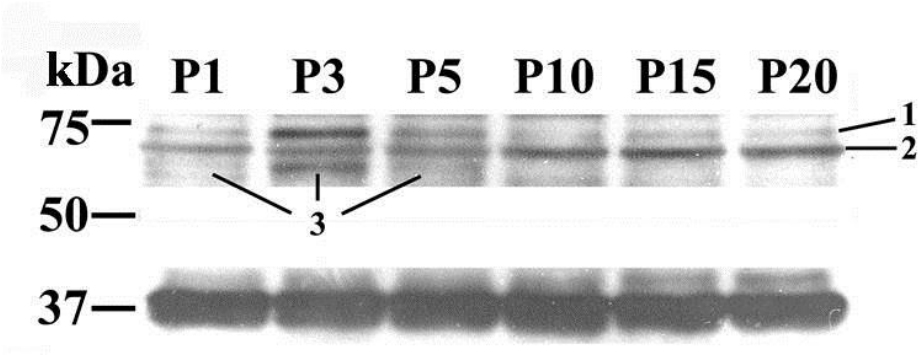
A hip izoforma expresszálódik a legnagyobb mennyiségben a fejlődés kezdeti szakaszán **(a,b)**, amit a P10 nap környékére a Hop1 izoforma vált fel **(c)**. Ezt követően a Hop1 expressziós dominanciája a fejlődés későbbi szakaszaiban tovább növekszik **(d,e)**. Minden időpontban a Null izoforma expressziós szintje szolgált referencia értékként. *:$p \leq 0.05$

5.2.3. PAC1 fehérje mennyiségi változása a fejlődés során

Az mRNS szinten detektált változások megerősítése érdekében immunblott technikát alkalmaztunk. Sajnos a kereskedelmi forgalomban nem található izoforma specifikus antitest, így a fehérje szintű vizsgálatokat PAC1 receptor antitest segítségével végeztük el, mely a fehérje extracelluláris N-terminális szekvenciáját ismeri fel. Ugyanakkor a harmadik intracelluláris hurokba való kazetta beépülés vagy kiesés eredményeképpen változik a protein mérete, így az izoformákat méretük alapján el tudjuk különíteni a poliakrilamid gélben.

A western blott futtatáson három sávot különíthettünk el. A legfelső sávban, a legnagyobb mérettel (75 kDa) rendelkező izoforma, a hiphop1 valószínűsíthető (16. ábra: 1). A

hiphop1-nél kisebb hip és hop1 splice variánsok azonos protein mérettel rendelkeznek, így a második sávban voltak megfigyelhetőek (16. ábra: 2). A legkisebb aminosav hosszúsággal jellemezhető Null izoforma a harmadik sávban, jóval a 75 kDa alatt jelentkezett (16. ábra: 3). A futtatások során normalizációs kontrollként a 37 kDa-nál detektálható GAPDH-et használtuk (16. ábra).

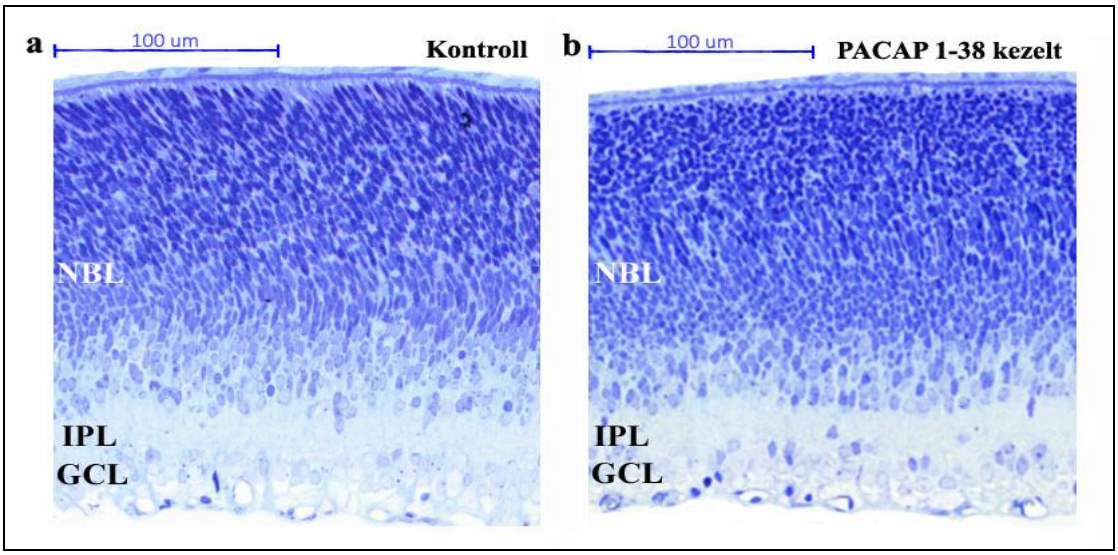


16. ábra: PAC1 receptor protein detektálása a posztnatális fejlődés során.
Három sáv figyelhető meg a western blott képen, 75 kDa-nál valószínűsíthetőleg a Hiphop1 (1-es szám), a 2-es számmal jelölt területen a Hip, valamint a Hop1 izoforma, míg a legkisebb mérettel a Null izoforma jelent meg (3-as szám). A normalizációs kontrollként használt GAPDH 37 kDa-nál látható.

5.3. Morfológiai vizsgálatok

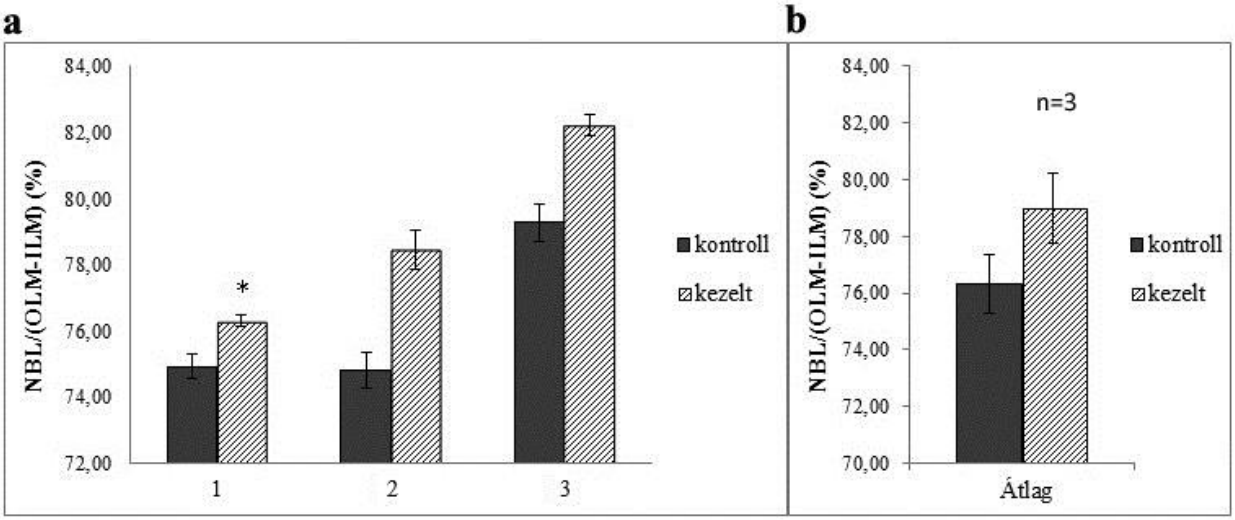
5.3.1. A retina szerkezetében, PACAP1-38 kezelés hatására bekövetkező változások

A kétszeres PACAP1-38 kezelés számottevő változást nem okozott a retina szerkezetében, mind a kontroll, mind a kezelt retinában megfigyelhető volt az NBL, az IPL és a GCL rétege (17. ábra: a,b).



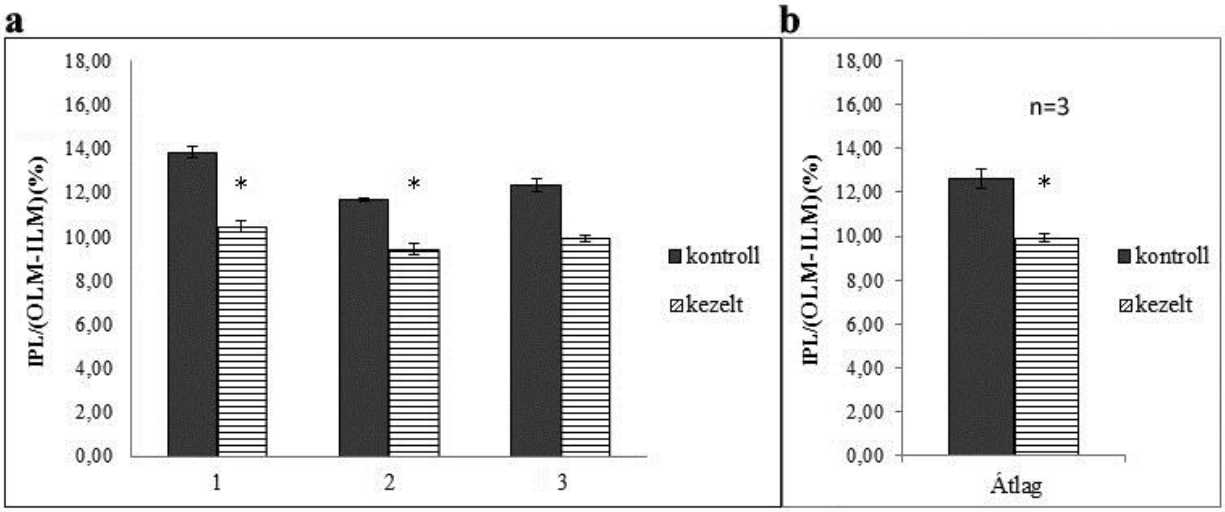
17. ábra: Kétszeres PACAP1-38 kezelés hatására bekövetkező morfológiai változások.
NBL: neuroblaszt réteg; IPL: belső rostos réteg; GCL: ganglion sejtek rétege.

A morfometriai vizsgálataink kimutatták, hogy a két időpontban (P1 és P3) megismételt i.v PACAP1-38 injekció hatására az NBL vastagságában minden esetben növekedés következett be a teljes retina vastagságához viszonyítva (18. ábra: a). A három egyedben mért értékekből számolt átlagos növekedés 2.65 % volt (18. ábra: b).



18. ábra: az NBL vastagsága a teljes retina vastagságához viszonyítva.
(a) A mért értékek egyedekre bontva. **(b)** a mért értékek átlagolása. *:p≤0.05

Az NBL-re vonatkozó mérésekkel ellentétesen az IPL vastagságában átlagosan 2.69 %-os csökkenést tudtunk detektálni. Két egyedben ez a csökkenés statisztikailag szignifikánsnak tekinthető (19. ábra: a), éppúgy, mint az egyéni értékekből számolt átlagolt vastagság esetén (19. ábra: b).



19. ábra: Az IPL vastagsága a teljes retina vastagságához viszonyítva.
(a) A mért értékek egyedekre bontva. **(b)** a mért értékek átlagolása. *:p≤0.05

A félvékony metszeteken végzett sejtszámolás eredményei azt mutatták, hogy mindhárom, kétszeres PACAP1-38 kezelést kapott egyedben alacsonyabb volt a GCL-ben található sejtek száma, mint a kontroll állatok retinájában (11. táblázat). A kontrollokban mért sejtek átlaga 15.02±1.51 db/100µm, míg a kezeltek átlag sejtszáma 13.17±1.3 db/100µm volt. Ez a változás a PACAP1-38 kezelés hatására bekövetkező, szignifikáns, 14.05%-os csökkenést jelent.

11. táblázat: Kétszeres PACAP1-38 kezelés hatására a GCL-ben bekövetkező sejtszám változás.
*:p≤0.05

	Kontroll szem (db ganglion sejt/100µm±szórás)	PACAP1-38 kezelt szem (db ganglion sejt/100µm±szórás)
1. állat	14.2±1.35	12.33±0.98
2. állat	14.7±1.13	12.87±1.09
3. állat	16.17±1.27	14.3±0.94
átlag	15.02±1.51	*13.17±1.3
Kontrollhoz viszonyított csökkenés:		14.05%

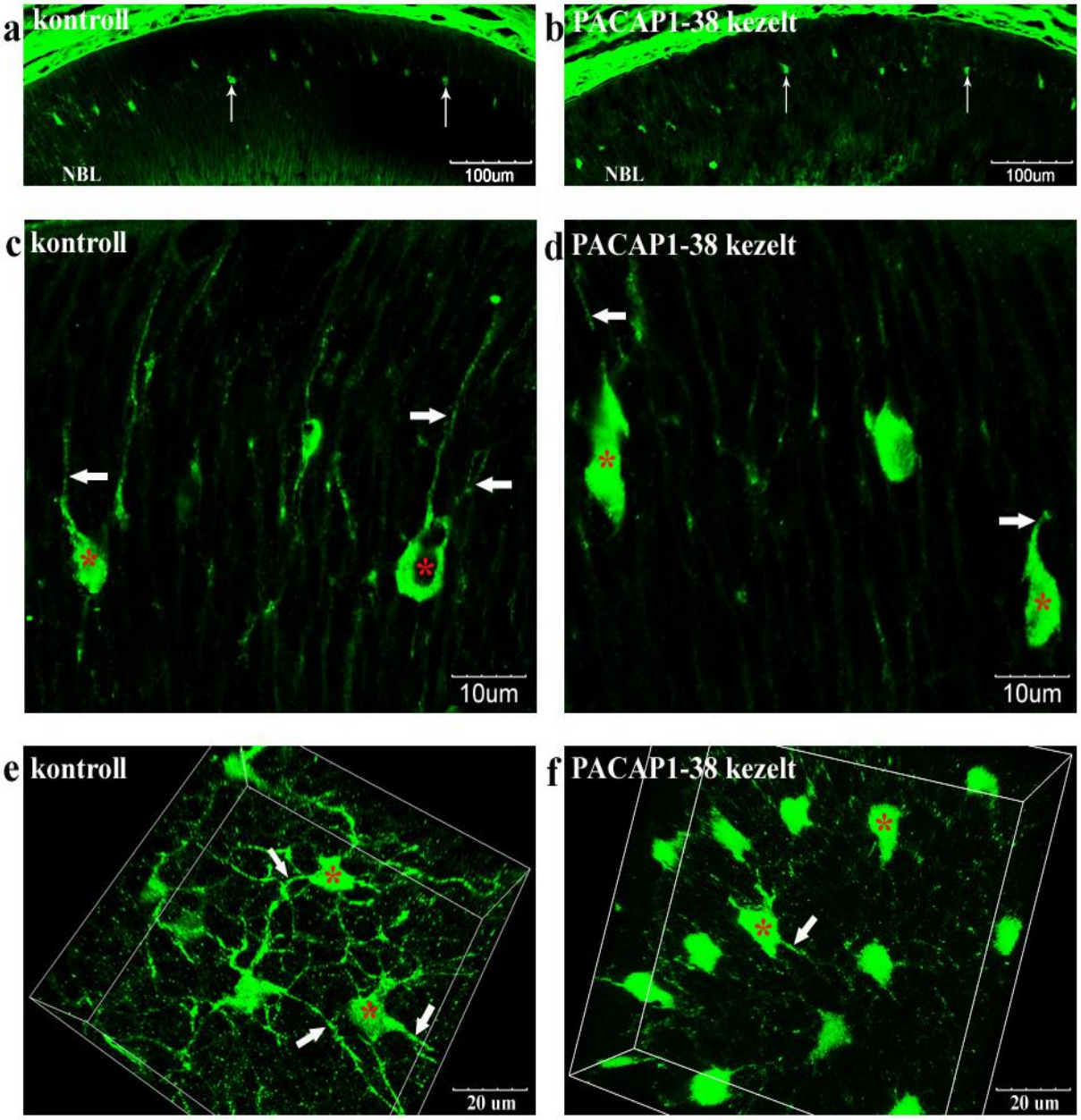
5.3.2. PACAP1-38 kezelés hatása a retina calbindin, HPC-1 és Chx-10 immunpozitív sejtjeire

Immuncitokémiai vizsgálatok során a változást szenvedett sejtpopulációk azonosítására specifikus sejtmarkereket használunk (Chx-10: bipoláris sejt, HPC-1: migráló amakrin sejt, calbindin: horizontális sejt). Az eredmények segítségével megfigyelhetővé váltak azok a sejtszintű változások melyek a kétszeri PACAP1-38 injekció hatására következnek be a fejlődő emlős retinában.

5.3.2.1. Calbindin immunreaktív sejtek

A calbindin az alacsony molekulasúlyú kalcium-kötő proteinek családjába tartozik, mely a retinában a horizontális sejtek jelölésére alkalmas. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a horizontális sejtek lokalizációja mind a kontroll, mind a 2x-es PACAP1-38 kezelt mintákban megegyezett. Továbbá a jelölt sejtek a PACAP1-38 kezelések hatására bekövetkező számbeli növekedése volt megfigyelhető az NBL rétegében (20. ábra: a,b). A kontroll mintákban a már kialakult horizontális sejtek nyúlványrendszere fejlettebbnek és szerteágazóbbnak mutatkozott (20. ábra: c,e), valamint a nyúlványok nemcsak horizontális, hanem vertikális irányba is kiterjedtek (20. ábra: c). Ezzel szemben a kezelt mintákban

hasonló arborizációs mintázatot nem tudtunk megfigyelni, a nyúlványok kis számban jelentek meg és a sejttest közvetlen közelére korlátozódtak (20. ábra: d,e).



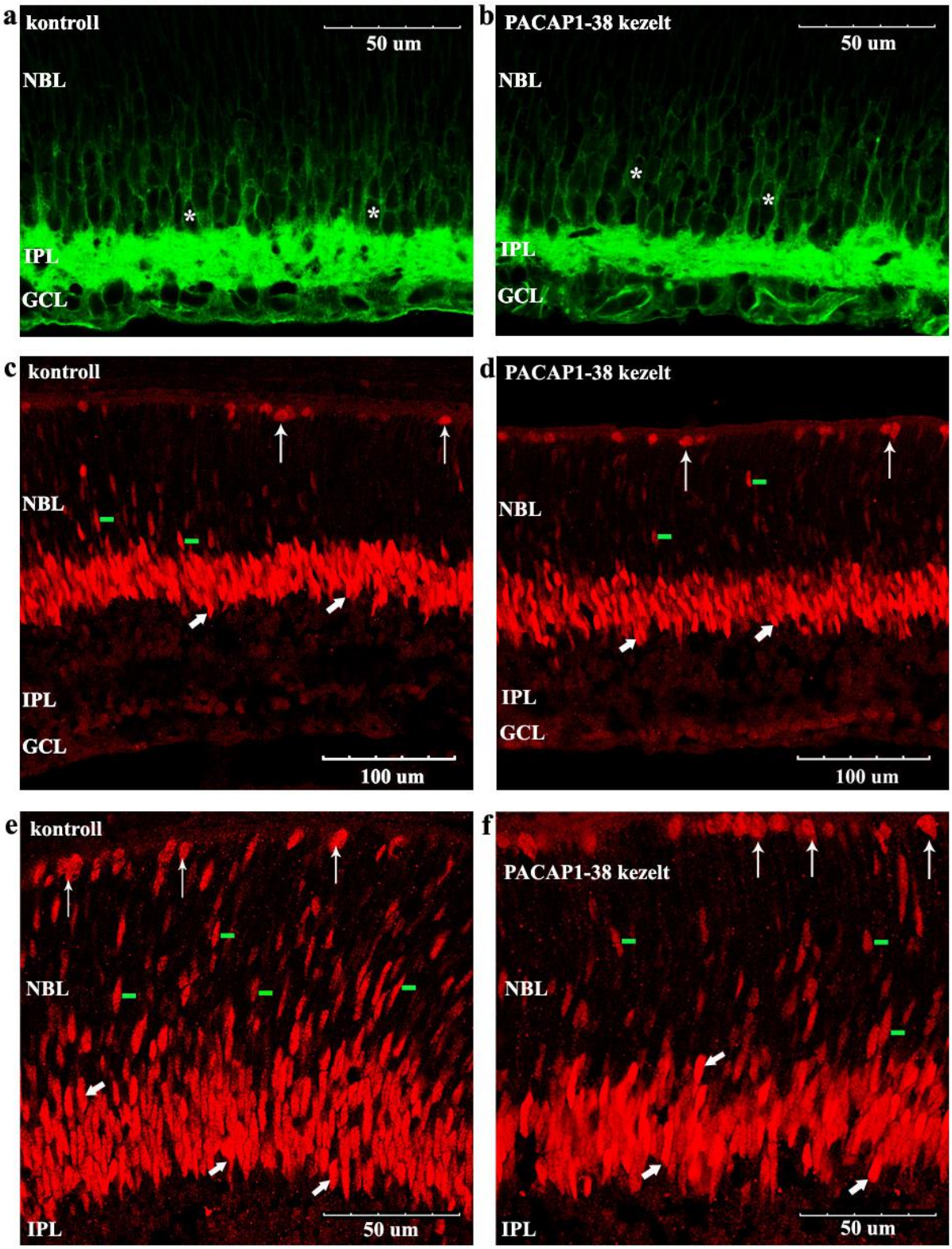
20. ábra: A horizontális sejtek eloszlása és arborizációja a patkány retinában.
(a,b) calbindin immunreaktív horizontális sejtek (nyíl) az NBL rétegében. **(c)** a sejttestekből (piros csillag) kiinduló nyúlványrendszer (vastag nyíl) fejlett, vertikálisan is megfigyelhető. **(d)** a sejtek (piros csillag) nagyon fejletlen nyúlványrendszerrel (vastag nyíl) rendelkeznek. **(e,f)** a 3 dimenziós felvételeken is jól látszik az arborizációs mintázatban (vastag nyíl) megjelenő különbség.

5.3.2.2. HPC-1 immunreaktív sejtek

A HPC-1 antitesttel történő jelölések segítségével az amakrin sejteket tudjuk megfesteni, az esetleg előforduló altípusoktól függetlenül. Kísérleteinkben a jelölődött sejtszalag vastagságában figyelhettünk meg különbséget, ugyanis a PACAP1-38 kezelések esetében a HPC-1 pozitív terület az IPL határán szélesebb sáv formájában jelent meg a kontroll mintákhoz képest. Ezzel párhuzamosan a kontroll retinák esetében a sejtek, a későbbi INL-ben való elrendeződése tömörebbnek, kompaktabbnak mutatkozott (21. ábra: a,b).

5.3.2.3. Chx-10 immunreaktív sejtek

A Chx-10 antitesttel végzett immuncitokémiai vizsgálatoknál nemcsak a migráló és a leendő INL-ben rendeződő bipoláris sejtek sejttestjei jelölődtek, hanem az NBL határában megtalálható progenitor sejtek is pozitivitást mutattak (21. ábra: c,d). A bipoláris sejtek által létrehozott sáv elhelyezkedésében és számában lényegi különbséget nem figyeltünk meg a kontroll és a 2x-es PACAP kezelt minták között, azonban a migráló sejtek száma jelentősen alacsonyabb volt a PACAP1-38 kezelt retinákban (21. ábra: e,f). A kezelt mintákban lévő Chx-10 pozitív progenitor sejtek száma ugyanakkor magasabbnak mutatkozott a kontroll mintákhoz viszonyítva (21. ábra: e,f).



21. ábra: Amakrin- és bipoláris sejtek megjelenése a PACAP kezelt retinában.
(a,b) a kezelt mintákban a HPC-1 jelölt amakrin sejtek (fehér csillag) szélesebb sejtszalagba rendeződtek az NBL és IPL határán, mint a kontroll retinában. **(c,d)** a Chx-10 antitest segítségével nemcsak a migráló (zöld vonal) és már rétegbe rendeződött bipoláris sejtek (vastag nyíl), hanem a progenitor sejtek (vékony nyíl) is pozitivitást mutattak. **(e,f)** a kontroll retinában nagyobb számban jelentek meg a migráló sejtek (zöld vonal), mint a kezelt mintákban.

5.4. PACAP1-38 kezelés hatására bekövetkező expressziós változások

Az általunk használt őssejt PCR array azon 84 gén expressziójának azonosítását tette lehetővé, melyek szignáltranszdukciós útvonalakban, valamint az őssejtek proliferációjában, növekedésében és differenciációjában is lényeges szerepet töltenek be. A kiértékeléseknél minden esetben a kontroll egyedekben mért expressziós szinthez viszonyítottunk. Az expressziós változást mutató gének sorát a 12. táblázatban foglaltuk össze.

Az eredményeink azt mutatták, hogy a PACAP1-38 14 gén esetében okozott változást, melyek közül 13 gén expressziós szintje a kezelést követő 3. órában lényegesen csökkent. A 6 órás kezelésekből származó mintákban ugyanezen gének mRNS mennyisége megemelkedett, egyetlen kivétellel, ugyanis az Acan expressziója csökkent a kontroll egyedekben mért szinthez képest (12. táblázat).

12. táblázat: A PCR array expressziós változást mutató génjeinek sora.
Kék színnel kiemelt értékek a számottevő csökkenést, míg a piros színnel jelöltek emelkedést mutatnak.

Relatív expressziós változás		
	3h	**6h**
Gén	**Érték**	**Érték**
Acan	0.8801	0.4624
Btrc	1.1018	3.7835
Cd44	2.1335	1.1337
Dhh	0.4973	2.7099
Fgf1	0.0081	1.6097
Fgf2	1.5535	2.3099
Fgf4	0.6579	5.0201
Gja1	1.507	2.1197
Gjb1	1.1657	2.6138
LOC306312	0.1985	10.2108
Msx1	0.7473	2.2001
Gdf3	0.5746	2.5238
T	0.3539	9.1898
Wnt1	0.218	11.7337

A PCR array-ben szereplő, expressziós változást mutató gének sorát kibővítettük, tekintettel az érintett génútvonalakra és a retina fejlődésének ezen szakaszára. A vizsgált géneket a neurális és nem-neurális szövetek fejlődésében legjelentősebb szerepet betöltő

génekből válogattuk ki, az irodalmi adatokra támaszkodva. Az általunk vizsgált gének teljes listáját a 13. táblázat tartalmazza, funkcionális csoportokba rendezve.

13. táblázat: A vizsgált gének neve és rövidítése.

Funkció	Vizsgált gének	Rövidített elnevezés
Proteoszóma komplex elemei	Cullin1	Cul1
	S-phase kinase-associated protein	Skp1
	Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase	Btrc
Szimmetrikus/aszimmetrikus sejtosztódásért felelős gének	Desert hedgehog homolog	Dhh
Sejtmegújulásért felelős markerek	Neurogenin 1	Neurog1
Citokinek és növekedési faktorok	Fibroblast growth factor 1, 2, 4, 8, 9	Fgf1, Fgf2, Fgf4, Fgf8, Fgf9
	Bone morphogenetic protein 4, 9	Bmp4, Bmp9
	Growth differentiation factor 3	Gdf3
Sejtadhéziós molekulák	Aggrecan	Acan
	Cd44	Cd44
	L1 cell adhesion molecule	L1CAM
Sejt-sejt kommunikációt szabályozó gének	Gap junction protein, alpha 1, beta 1	Gja1, Gjb1
Embrionális sejtvonal markerek	Msh homeobox 1	Msx1
	Brachyury homolog	T
	Nanog homeobox	Nanog
	Octamer-binding protein 4	Oct4
	Paired box 6	Pax6
Wnt útvonal tagjai	Wingless-type MMTV integration site family member1	Wnt1
Retinális sejtdifferenciációs markerek	Distal-less homeobox 1, 2	Dlx1, Dlx2
	Visual system homeobox 10	Chx10
	Orthodenticle homeobox 2	Otx2
	Neurogenic differentiation 1	NeuroD1
	Atonal homolog 7	Math5
	Achaete-scute complex homolog 1	Mash1

A génexpressziós eredmények kiértékelése során 4 gén esetében (Cul1, Bmp9, Nanog és Fgf4) csak 3 órával a kezeléseket követően detektáltunk lényeges változást. Ezekkel a gyorsan lecsengő változást mutató génekkel a fehérjeszintű vizsgálatokat nem végeztük el, ugyanis az ilyen rövid ideig tartó emelkedés/csökkenés nagy valószínűséggel nem nyilvánul meg fehérje szinten, vagy ha mégis, annak fiziológiai jelentősége megkérdőjelezhető. A western blott analízisek elvégzése során a funkcionális csoportokba

rendezett gének közül legalább egy, konzisztens változást mutató gént választottunk ki. A fehérjeszintű vizsgálatokban kiemelt géneket a 14. táblázat mutatja.

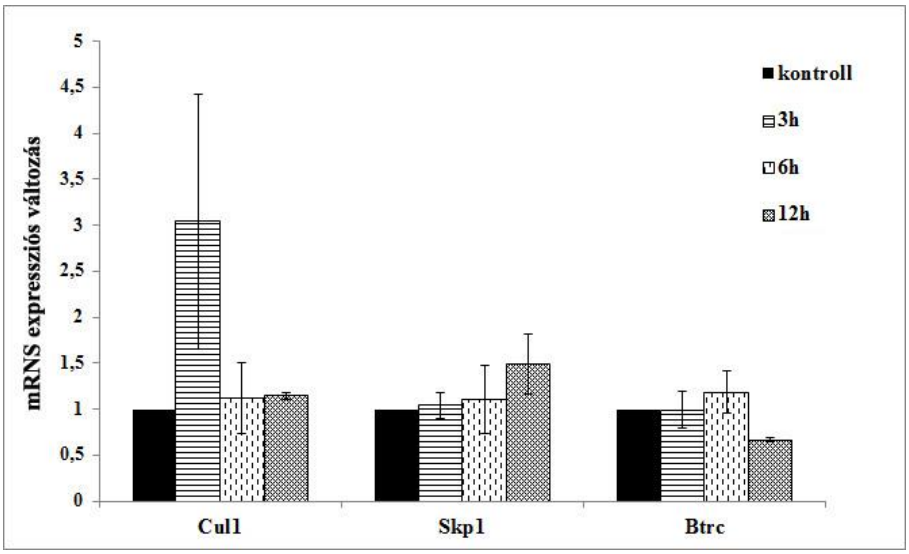
14. táblázat: A Western-blot analízisekben felhasznált gének.

Funkcionális csoport	Vizsgált fehérjék
Fibroblaszt növekedési faktorok	Fgf1
Növekedési differenciációs faktorok	Bmp4, Gdf3
Sejt-sejt kommunikációt szabályozó faktorok	Gjb1
Wnt útvonal tagjai	Wnt1
Retinális sejtdifferenciációs markerek	Math5, Dlx2

Fontos megjegyezni, hogy a fehérje detekció során, minden kísérleti időpontban legalább 4 mintát vizsgáltunk meg, amelyek közül csak a legmarkánsabb változást mutatót tüntettük fel a képeken.

5.4.1. Proteoszóma komplex elemei

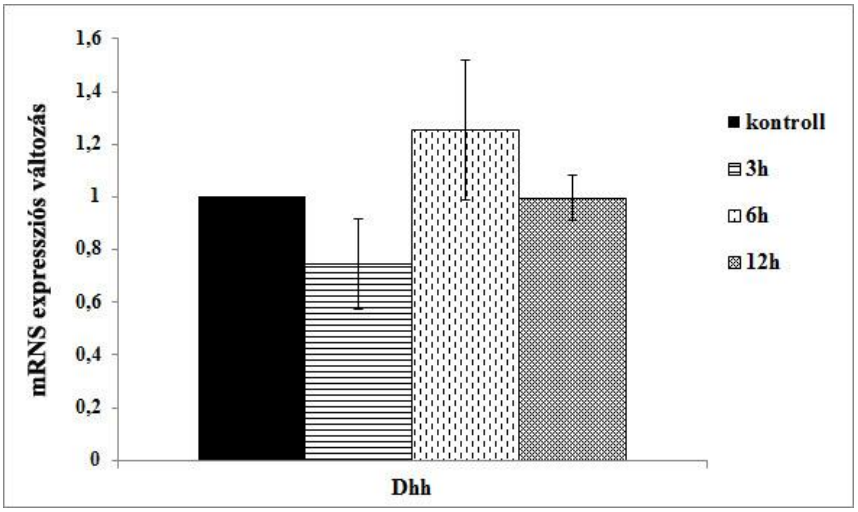
A proteoszómális komplex struktúrális kialakításában lényeges szerepet betöltő Cul1 gén expressziós szintjében csak 3 órával az i.v PACAP1-38 kezelést követően tudtunk számottevő, de statisztikailag nem szignifikáns növekedést detektálni (3.045±1.386). A komplexben a Cul1-hez kapcsolódó és összekötő proteinként funkcionáló Skp1 szintjében lényeges változás nem mutatkozott. A szubsztrát felismerő komponensként ismert Btrc szintje 12 órával a kezeléseket követően csökkent (0.666±0.026) (22. ábra).



22. ábra: Proteoszóma komplex elemeinek expressziós változása PACAP1-38 kezelés hatására.*:$p \leq 0.05$

5.4.2. Szimmetrikus/aszimmetrikus sejtosztódásért felelős gének

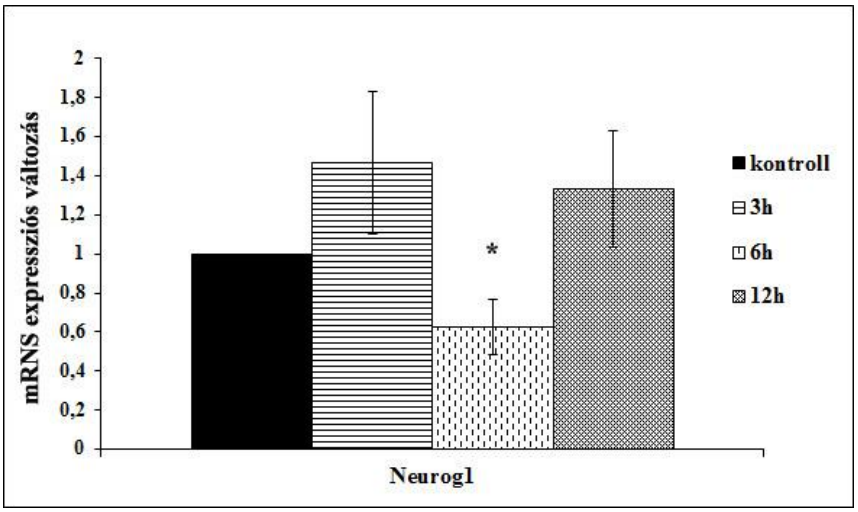
A sejtciklust szabályozó Hedgehog morfogének közül ismeretes Dhh gén expressziója a PACAP1-38 injekció hatására egyik vizsgálati időpontban sem változott szignifikánsan. A mért eredmények a kontroll egyedekben mért értékekhez közeli szinteket mutatták (23. ábra).



23. ábra: Szimmetrikus/aszimmetrikus sejtosztódásért felelős gének expressziós változása PACAP1-38 kezelés hatására. *:p≤0.05

5.4.3. Sejtmegújulásért felelős markerek

A Neurog1 a neurogenezis transzkripcionális regulátor génjeihez tartozik. Eredményeink azt mutatták, hogy expressziós szintje 3, valamint 12 órával a kezeléseket követően lényeges mértékben nem változott, azonban a 6 órás vizsgálatok során statisztikailag szignifikáns csökkenést tudtunk detektálni (0.627±0.141) (24. ábra).

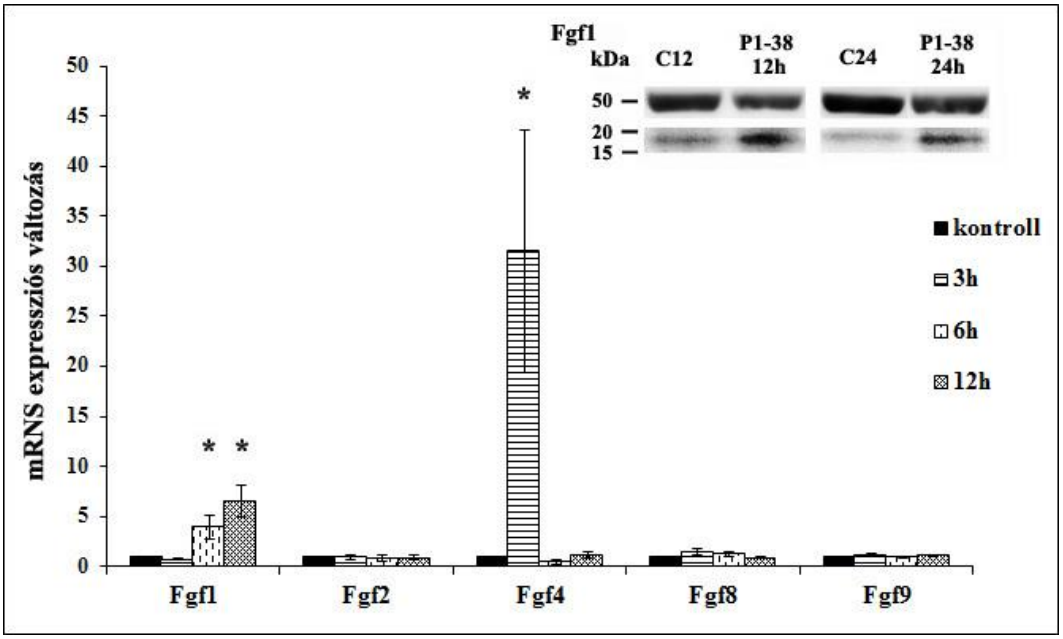


24. ábra: Sejtmegújulásért felelős gének expressziós változása PACAP1-38 kezelés hatására. *:p≤0.05

5.4.4. Fibroblaszt növekedési faktorok

A fibroblaszt növekedési faktorok közül vizsgált Fgf1 expressziós szintje a 6, valamint a 12 órás kezelések során egy fokozatos növekedési mintázatot mutatott (3.94±1.21; 6.49±1.56). Az Fgf4 ezzel szemben csak a PACAP1-38 injekciót követő 3. órában expresszálódott szignifikánsan magasabb szinten, mint a kontroll mintákban detektálható mRNS mennyisége (31.56±12.11). Az Fgf2, Fgf8 és Fgf9 esetében kapott eredményeink azt mutatták, hogy a PACAP1-38 injektálás nem változtatta meg a gének expressziós szintjét (25. ábra).

A western blott analízisek eredményei mindkét vizsgálati időpontban változást mutattak. Az Fgf1 protein mennyiségében mind 12, mind 24 óra elteltével emelkedést figyelhettünk meg a kontrollhoz képest (25. ábra).



25. ábra: Fibroblaszt növekedési faktorok expressziós változása PACAP1-38 kezelés hatására.
A normalizációs kontrollként használt β-tubulin 50 kDa-nál, a Fgf1 17-18 kDa-nál figyelhető meg. *:p≤0.05

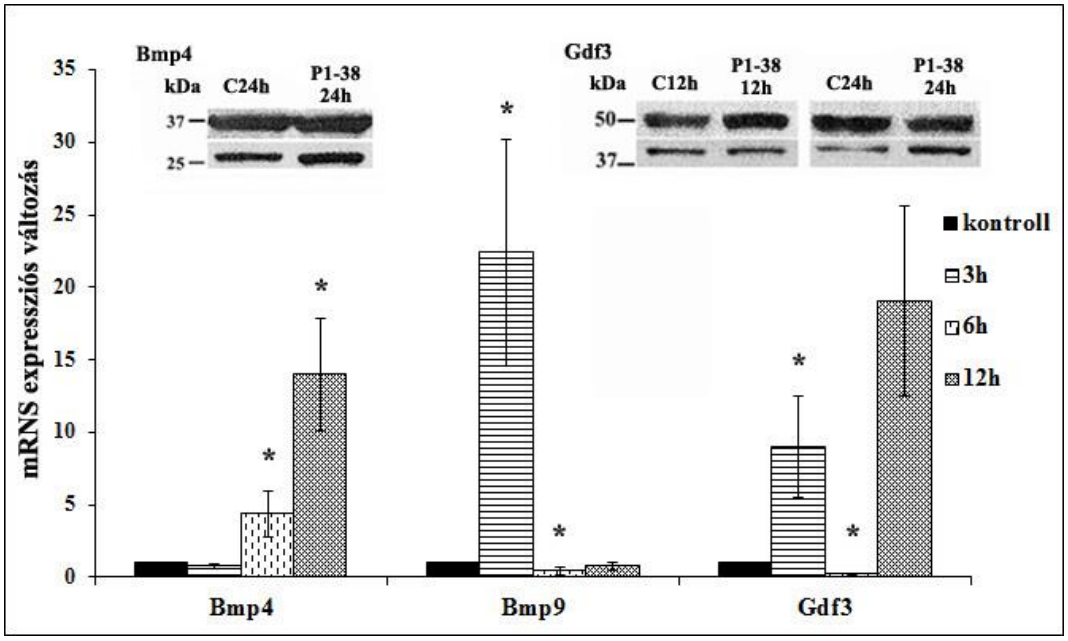
5.4.5. Növekedési differenciációs faktorok

A neuronok túlélését és differenciációját szabályozó gének közül a Bmp4, Bmp9 és Gdf3 expresszióját vizsgáltuk meg. A Bmp4 esetében a kontrollhoz hasonló értéket detektáltunk (0.76±015) 3 órával a kezeléseket követően, míg a 6 és 12 órás vizsgálatokban fokozatos, statisztikailag szignifikáns növekedést mutatott (4.35±1.6; 14.03±3.87) (26. ábra).

A Bmp9 expressziója csak 3 óra elteltével emelkedett meg szignifikánsan (22.39±7.83). A 6 órás vizsgálatokban ellentétes eredményeket tapasztaltunk, ugyanis a Bmp9 expressziója

lényegesen csökkent (0.44±0.27). A kezelést követő 12. órában a Bmp9 expressziója közel azonos volt a kontrolléval (0.81±0.27). A Gdf3 expressziós mintázata eltért a Bmp4 és Bmp9-től, ugyanis ezen gén esetében két időpontban: 3 és 12 óra elteltével tudtunk szignifikáns növekedést detektálni (8.99±3.49; 19.01±6.54), míg 6 óra elteltével nagymértékű csökkenést mutatott (0.21±0.09) (26. ábra).

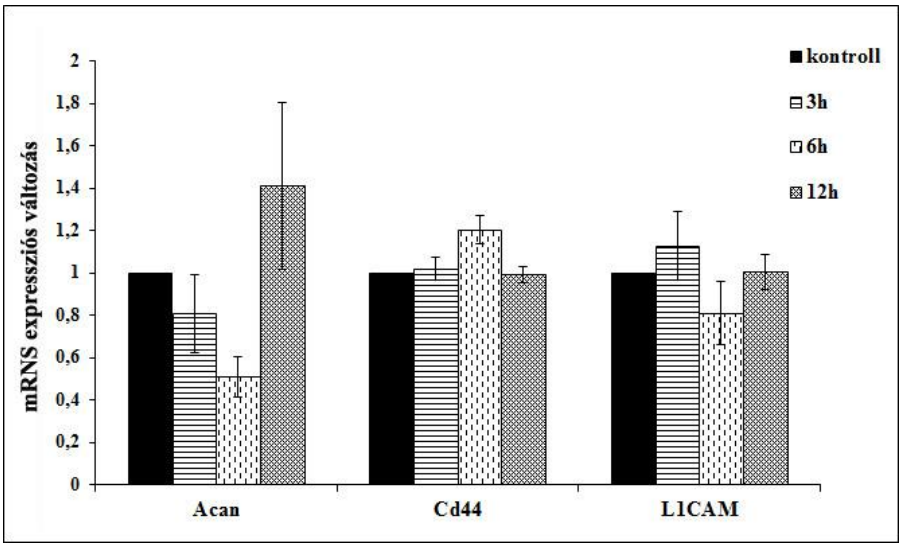
Annak ellenére, hogy a génexpresszióban fokozatos növekedést detektáltunk a Bmp4 esetében, a western blott analízisek eredményei csak a 24 órás mintákban mutattak számottevő emelkedést a fehérje szintjében. A Gdf3 fehérje mennyiségében a génexpresszióhoz hasonló változásokat tapasztaltunk, 12 óra elteltével csökkenést, míg 24 óra elteltével lényeges növekedést figyeltünk meg (26. ábra).



26. ábra: Növekedési differenciációs faktorok expressziós változása PACAP1-38 kezelés hatására. A normalizációs kontrollként használt β-tubulin 50 kDa-nál, a Bmp4 23-24 kDa-nál , míg a Gdf3 42 kDa-nál figyelhető meg. *:p≤0.05

5.4.6. Sejtadhéziós molekulák

A vizsgált sejtadhéziós molekulák közül egyedül az Acan esetében tudtunk változást detektálni. Hat órával a kezeléseket követően a kontroll mintákban mért szint közel felére csökkent a gén expressziója (0.57±0.15). A PACAP1-38 valószínűleg nem hat a Cd44 és az L1CAM gén expressziójára, ugyanis ezek minden mérési időpontban a kontroll érték közelében maradtak (27. ábra).

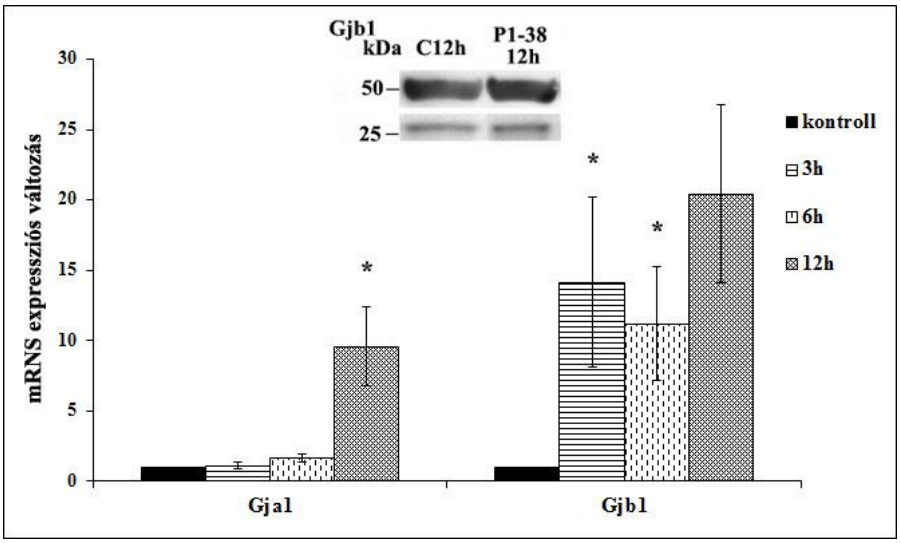


27. ábra: Sejtadhéziós molekulák expressziós változása PACAP1-38 kezelés hatására. *:p≤0.05

5.4.7. Sejt-sejt kommunikációt szabályozó gének

Az általunk vizsgált Gja1 és Gjb1 gének a sejt-sejt kommunikációt szabályozó konnexin gének családjába tartoznak. A Gja1 esetében csak 12 óra elteltével tudtunk változást megfigyelni, az mRNS expressziója statisztikailag szignifikáns növekedést mutatott (9.57±2.81). Ezzel szemben a Gjb1 transzkripciója mind a három kísérleti időpontban (3h, 6h, 12h) lényegesen emelkedett szinten volt (14.15±6.03; 11.2±4.01; 20.41±6.33) (28. ábra).

Az mRNS expresszióban mért növekedés ellenére a Gjb1 protein mennyisége egyik vizsgálati időpontban sem mutatott számottevő változást (28. ábra).

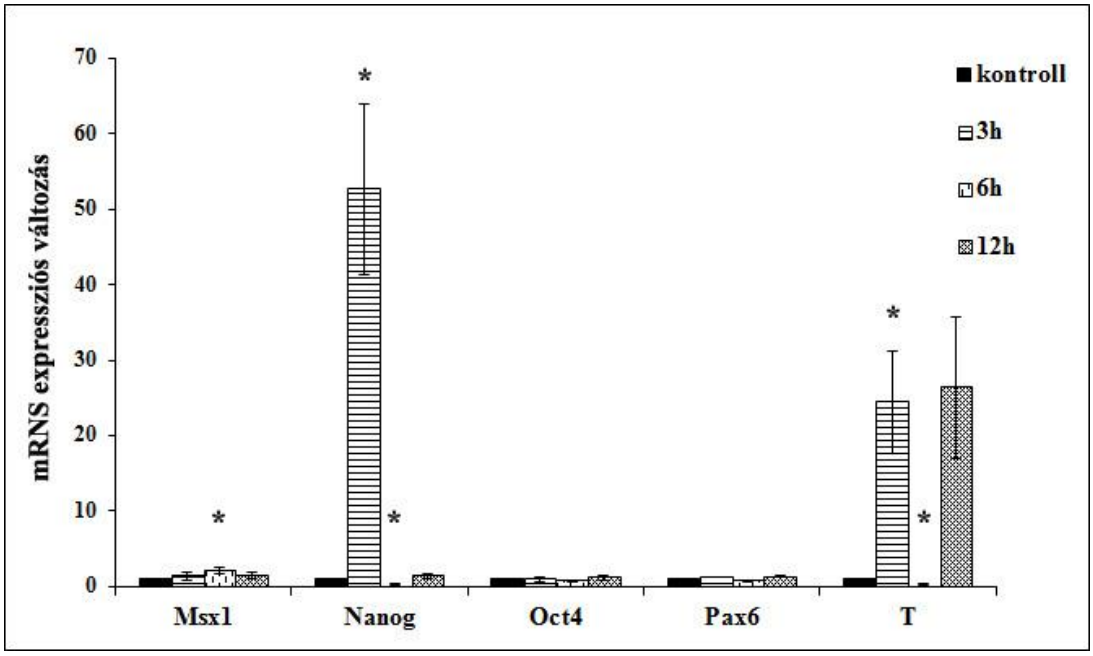


28. ábra: Sejt-sejt kommunikációt szabályozó gének expressziós változása PACAP1-38 kezelés hatására.

A normalizációs kontrollként használt β-tubulin 50 kDa-nál, míg a Gjb1 27 kDa-nál figyelhető meg.*:p≤0.05

5.4.8. Embrionális sejtvonal markerek

A PACAP1-38 az embrionális sejtvonal markerekre is hatást gyakorolt. A transzkripciós faktorként ismert Nanog gén már 3 órával a kezeléseket követően markáns növekedést mutatott (52.64±11.28), amelyet a 6 órás mintákban egy erőteljes csökkenés követett a kontroll mintákban mért expressziós szinthez képest (0.21±0.11). Tizenkét óra elteltével azonban lényeges változást nem detektáltunk (1.38±0.37). A T gén hasonló változásokat produkált a 3 és 6 órás vizsgálatokban (24.35±6.78; 0.21±0.11), ugyanakkor a 12 órás kezelések esetében expressziós szintje jóval a kontroll érték fölé emelkedett (26.35±9.46). Az Msx1 esetében csak 6 óra elteltével detektáltunk kismértékű, de szignifikáns növekedést (2.08±0.43). Az Oct4 és Pax6 gének expressziós szintje nem változott meg a PACAP1-38 injektálását követő vizsgálati időpontokban (29. ábra).



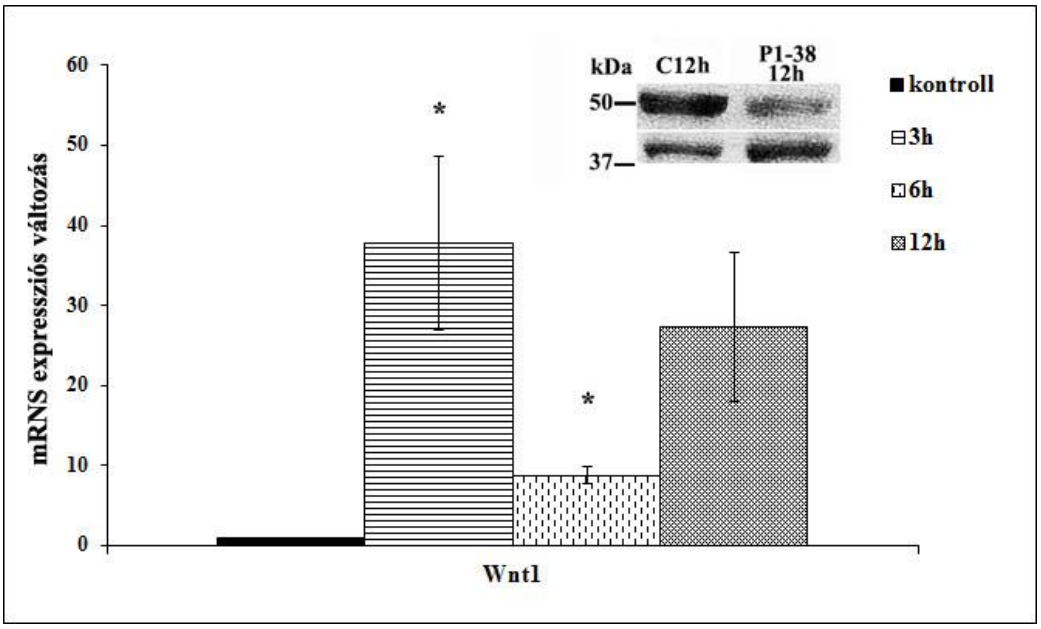
29. ábra: Embrionális sejtvonal markerek expressziós változása PACAP1-38 kezelés hatására. *:$p \leq 0.05$

5.4.9. Wnt útvonal tagjai

Az ontogenetikus folyamatokban esszenciális szereppel bíró szignálmolekula, a Wnt1 vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy már 3 órával a PACAP1-38 injekciót követően statisztikailag szignifikáns emelkedés következett be a gén expressziós szintjében (37.76±10.89). Hat óra elteltével, bár a 3 órás eredményekhez képest alacsonyabb, de a kontroll mintákhoz viszonyítva szintén emelkedett értéket detektáltunk (8.79±1.09). A

tizenkét órás vizsgálatokban egy ismételt, nagyfokú emelkedést figyelhettünk meg (27.32±9.3) (30. ábra).

A Wnt1 a génexpresszióval ellentétben, fehérjeszinten csak a 12 órás kezelések során mutatott mennyiségi változást (30. ábra), a kontroll értékhez képest lényeges növekedést tapasztaltunk.

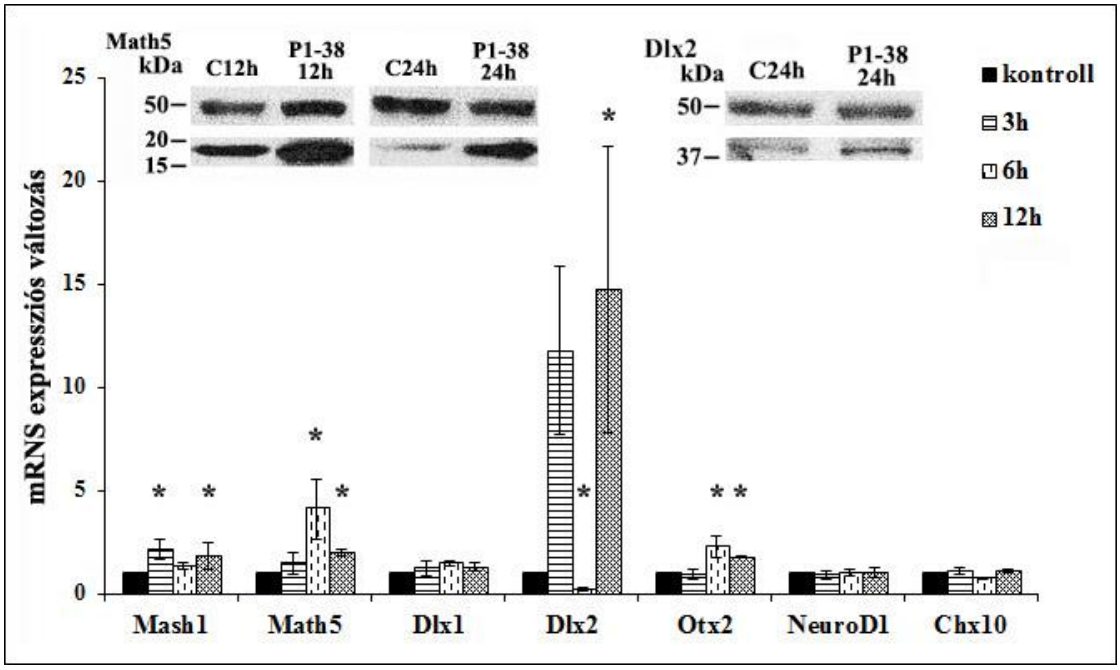


30. ábra: Wnt1 expressziós változása PACAP1-38 kezelés hatására.
A normalizációs kontrollként használt β-tubulin 50 kDa-nál, míg a Wnt1 40 kDa-nál figyelhető meg. *:p≤0.05

5.4.10. Retinális sejtdifferenciációs markerek

A retinális sejtdifferenciációs markerek fontos részét képezik a vizsgált géneknek, ugyanis lényeges szerepet töltenek be a sejtek konkrét sejttípusok felé történő elköteleződésében és differenciálódásában. Az elvégzett kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a Mash1 expressziójában kismértékű, de szignifikáns növekedés következett be 3, valamint 12 óra elteltével (2.16±0.48; 1.8±0.63). A Math5 esetében a 6 és 12 órás vizsgálatokban tudtunk növekedést detektálni (4.04±1.4; 1.96±1.16), míg a Dlx2 3 és 12 órával a PACAP1-38 injekciót követően mutatott nagymértékű, szignifikáns emelkedést (11.77±4.07; 14.71±6.92). A két időpont között azonban lényeges csökkenés volt megfigyelhető az mRNS expressziójában (0.2±0.07). Az Otx2 gén 6 és 12 óránál is a Math5-hoz hasonló expressziós mintázatot mutatott (2.27±0.49; 1.77±0.05). A Dlx1, NeuroD1 és Chx10 esetében egyik vizsgálati időpontban sem tudtunk változást mérni (31. ábra).

A Math5 esetében a transzkripció eredményekhez hasonlóan, fehérjeszinten mind a 12 órás, mind a 24 órás kezelések során lényeges mennyiségi növekedést detektáltunk. A Dlx2 esetében az expressziós mintázattól eltérő változást figyelhettünk meg, ugyanis 12 órás kezelésekben a fehérje mennyisége közel azonos volt a kontrollban mértekhez, míg a 24 órás minták számottevő növekedést mutattak (31. ábra).



31. ábra: Retinális sejtdifferenciációs markerek expressziós változása PACAP1-38 kezelés hatására. A normalizációs kontrollként használt β-tubulin 50 kDa-nál, a Math5 18 kDa-nál, míg a Dlx2 39-40 kDa-nál figyelhető meg. *:$p \leq 0.05$

6. Eredmények megbeszélése

A nagyfokú komplexitást és strukturális felépítést mutató gerinces retina fejlődése a neurogenezist modellező kutatás középpontjában áll. Az emlős retina neurogenezise során több, egymást részben átfedő folyamat figyelhető meg (sejtosztódás, apoptózis, sejtmigráció, arborizáció, szinaptogenezis), melyek számos intrinszik és extrinszik faktor szabályozása alatt állnak (Reese és Collelo, 1992; Galli-Resta és Ensini, 1996; Galli-Resta, 1998). A kutatások fontos területét képezik a PACAP sejproliferációra, sejtdifferenciációra, sejtnövekedésre és neuronális túlélésre gyakorolt hatásainak vizsgálata (Spengler és mtsai., 1993; Lu és mtsai., 1996; Falluel-Morel és mtsai., 2005; Scharf és mtsai., 2008). A nagyszámú publikáció ellenére, a legtöbb kísérleti munka csak felületesen érinti a peptid hatásmechanizmusának vizsgálatát. Különösen a retina területén szembesülünk hiányosságokkal, ezért a tervezett munka eredményei fontos és hiánypótló adatokat szolgáltathatnak.

6.1. PAC1 receptor izoformák kifejeződése a fejlődő patkány retinában

A gerincesek számos fajának központi idegrendszerében megfigyelhető a PACAP receptorok expressziója, már a korai, embrionális időszaktól kezdődően a teljes posztnatális fejlődésen keresztül a felnőtt korban is (Erhardt és mtsai., 2001; Hu és mtsai., 2002; Alexandre és mtsai., 2011). A PAC1 receptor mRNS jelenlétét már az E10 napon, míg a PACAP kötőhelyek jelenlétét E14 napon mutatták ki patkány idegrendszerben. Ebből a korrelációból arra következtettek, hogy a PACAP hatásának közvetítésében a PAC1 receptornak esszenciális szerepe van (Basille és mtsai., 2000). Az alternatív splicing analízisek a PAC1 receptor számos, többek között a very short, short, null, hip, hop1, hop2, hiphop1, hiphop2 izoformáját kimutatták, melyek szerepet játszhatnak a fejlődési folyamatok szabályozásában (Spengler és mtsai., 1993; Dautzenberg és mtsai., 1999). Attól függően, hogy milyen típusú a PAC1 receptor izoforma, változhat a PACAP által szabályozott folyamat. Ezt bizonyítja az a megállapítás, miszerint a PACAP a null izoformához való kapcsolódáson keresztül képes a prekurzor sejtek sejtciklusát terminálni és a differenciálódás felé hajtani, vagy ezzel ellentétes hatásként, képes proliferációt indukálni a neuroblasztokban a hop izofoma segítségével (Lu és DiCicco-Bloom, 1997; Lu és mtsai., 1998). Ebből következően a PACAP receptorok fejlődés során mutatott

expressziós mintázata képes meghatározni és befolyásolni a kapcsolódó ligand hatását. Az irodalomban már több tanulmány is született, melyek egyes PAC1 receptor izoformák expressziójának változását, vagy expressziójának hiányát írják le a cerebellumban, a nucleus suprachiasmaticusban, a talamuszban, hipotalamuszban, a kéregben és más agyi területekben (Pantaloni és mtsai., 1996; Ajpru és mtsai., 2002). Azonban nagyon kevés információ áll rendelkezésre a PAC1 receptor izoformák expressziójának mintázatáról a fejlődő emlős retinában.

Njainje és mtsai. (2010) tanulmányukban leírták, hogy a PACAP prekurzorának és PAC1 receptorának mRNS-e már az E16 napon detektálható patkány retinában, mely a teljes posztnatális fejlődés során és felnőtt korban is megmarad. A receptor posztnatális jelenlétét szintén bizonyítja, hogy a P1 retina NBL és GCL rétegében PAC1 expressziót detektáltak mind a retinális progenitor, mind a posztmitotikus differenciálatlan sejtekben (Silveira és mtsai., 2002). Izoforma specifikus vizsgálatokban nem tudták kimutatni a very short variánst, míg a null és a short mRNS szinten való jelenlétét detektálni tudták retinoblasztóma sejtvonalban (Dautzenberg és mtsai., 1999). Ezen PAC1 receptor izoformákon kívül a hop1 jelenlétéről csak felnőtt retinában számoltak be (D'Agata és Cavallaro, 1998). További, a PAC1 receptornak, valamint izoformáinak jelenlétét és expressziós változását leíró tanulmányok ezidáig nem születtek az újszülött és fejlődő szövetben.

Eredményeink kimutatták, hogy ha - tekintet nélkül a splice variánsokra - a teljes PAC1 receptor expressziót mérjük, akkor szintjében számottevő változást nem lehet detektálni a fejlődés során. A jelenség magyarázata - ahogy további vizsgálatainkból kiderült - az, hogy az egyes izoformák expressziójában történő csökkenést, a másik variáns expressziójának emelkedése kompenzálja. A neonatális patkány retinában csak a null, hip, hop1, valamint a hiphop1 splice variáns expresszálódik a 3. intracelluláris hurkot érintő izoformák közül. Ebben a stádiumban a hip receptor tekinthető dominánsnak, melynek expressziójában, a null izoformához hasonlóan, a P5 naptól kezdődően csökkenő tendenciát figyelhetünk meg a fejlődés előrehaladtával. A kifejlett emlős retinában elkülöníthető 7 sejttípus többsége újszülött korban még differenciálatlan formában van jelen, valamint a legtöbb sejttípus (amakrin, pálcika fotoreceptor, bipoláris és Müller-glia sejtek) proliferációs csúcsa P0 és P6 közötti időpontra tehető (Reese és Colello, 1992; Rapaport és mtsai., 2004). Ezzel egyidőben megkezdődik a már megszületett, posztmitotikus sejteknek a retina megfelelő területére történő migrációja (Reese és Galli-

Resta, 2002). A retinogenezis szintén fontos aspektusaként említhető apoptózis második sejteliminációs hullámának kezdete is ugyanerre a fejlődési stádiumra (P0/P1) esik, mely egészen a szem kinyílásáig tart és főleg a posztmitotikus sejteket érinti (Péquignot és mtsai., 2003; McKernan és mtsai., 2006). A hip és a null izoforma dominanciájából arra következtethetünk, hogy ez a két receptor ezen korai eseményekben tölthet be szerepet.

A hop1 és hiphop1 izoformák retinogenezist befolyásoló hatása nem tisztázott ebben a fejlődési időszakban, ugyanis eredményeink lényegi változást nem mutattak ki transzkripciós szintjükben. Alátámasztva az össz PAC1 transzkripciójának változatlanságával kapcsolatos feltevésünket, a hop1 expressziója, mintegy felváltva a hip és null receptort, a P5 és P10 nap között megemelkedik és egészen a felnőtt korig magas szinten marad. Ez, a domináns izoformák közötti csere megelőzi a szem kinyílásának folyamatát, mely a P10 és P15 közötti időszakra tehető. Az IPL-ben a P3, míg az OPL-ben a P5 napon megkezdődő szinaptogenezis megközelítőleg a szem kinyílásáig, P10-ig tart, mely valószínűsíthetően korrelál a hop1 expressziós szintjének emelkedésével. Továbbá a receptorok, transzporterek és a szinaptikus transzmisszióban fontos szinaptikus proteinek expressziója, valamint a fotoreceptorok külső szegmenseinek kifejlődése szintén a szem teljes kinyílását megelőző időszakra tehető (Bagnoli és mtsai., 2003; Johnson és mtsai., 2003). Eredményeink, miszerint a hop1 dominanciájának kialakulása ebben a stádiumban erősödik meg, azt feltételezi, hogy a posztnatális retina fejlődésének késői szakaszát befolyásolhatja. A hiphop1 expressziós szintjének emelkedése, hasonlóan a hop1 variánshoz, a P5 és P10 stádium közé esik, mely szintén összefüggésben állhat a szem kinyílását, valamint az azt megelőző folyamatokkal. P10 napon mért expressziós csúcsát követően ugyanakkor ezen izoforma transzkripciója a későbbi fejlődési időpontokban rendkívül alacsony. Az eredményekből arra következtethetünk, hogy a későbbi időpontokban számottevően nem szabályozza a retina fejlődési folyamatait.

Tekintve, hogy a transzlációs és poszttranszlációs szabályozásokat követően a fehérje mennyisége eltérhet a transzkripciós szintektől, fontos a PAC1 receptor-proteinek azonosítása is. Mivel PAC1 splice variáns specifikus antitestek nem kaphatóak kereskedelmi forgalomban, ezért a fehérje kimutatást PAC1 receptor antitest segítségével végeztük el. Az egyes izoformák eltérő molekulasúlyára alapozva 3 sávot különíthettünk el eredményeinkben, amely azt bizonyítja, hogy a PAC1 receptor splice variánsainak jelenléte nemcsak mRNS, hanem fehérje szinten is igazolható. Amennyiben izoforma specifikus antitestek elérhetőek lesznek, elvégezzük a szükséges vizsgálatokat annak

érdekében, hogy pontosabban alá tudjuk támasztani a PAC1 receptorok fejlődésre gyakorolt hatását.

6.2. PACAP által aktivált szignáltranszdukciós útvonal MSG indukálta neurodegenerációban

A közelmúltban számos *in vitro* és *in vivo* tanulmány bizonyította a PACAP potenciális neuroprotektív hatását stroke, ischemia (Stumm és mtsai., 2007; Ohtaki és mtsai., 2008) és számos toxikus ágenssel szemben. Anti-apoptotikus hatása megfigyelhető a β-amiloid (Onoue és mtsai., 2002), az oxidatív stressz (Pilzer és Gozes, 2006), valamint a glutamát indukálta excitotoxicitás esetén is (Babai és mtsai., 2006). A glutamát ezen, sejtpusztuláshoz vezető hatása során az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megemelkedik az NMDA receptorokon keresztül (Sucher és mtsai., 1997; Breckenridge és mtsai., 2003), valamint az apoptózis intrinszik útvonalát alkotó iniciátor (caspase 9) és effektor (caspase 3 és 6) caspase enzimek aktivációja következik be (Chen és mtsai., 2001; Dénes és mtsai., 2011). A PACAP, glutamát által indukált neuronális sejthalál során kifejtett protektív hatását főleg *in vitro* tanulmányokban, többek között kortikális neuronokban, PC12 sejtekben és retinális neuronokban vizsgálták (Morio és mtsai., 1996; Said és mtsai., 1998; Shoge és mtsai., 1999). Azonban a retinát érintő *in vivo* tanulmányok száma jóval alacsonyabb, mely visszavezethető arra a tényre, miszerint a glutamát nem képes átjutni a vér-retina gáton felnőtt állatokban (Tomi és mtsai., 2005). Ebből kiindulva a PACAP anti-apoptotikus hatásának vizsgálatát újszülött állatokon létrehozott *in vivo* modellben hajtottuk végre (Dénes és mtsai., 2011).

A PACAP protektív hatását membránreceptorain való kötődését követően az AC és PLC szignáltranszdukciós útvonalak aktiválásán keresztül fejti ki (Dejda és mtsai., 2008). Mindkét útvonal eredményeképpen a végrehajtó caspase enzimek gátlása következik be, azonban fontos kiemelni, hogy az irodalom nagy része az AC útvonal aktivációjáról számol be (Vaudry és mtsai., 2003; Ravni és mtsai., 2006). A PACAP AC útvonalon kifejtett hatását vizsgálták kisagyi granuláris sejtekben, gerincvelői neuronokon és retinális neuronokban egyaránt (Villalba és mtsai., 1997; Silveira és mtsai., 2002; Tomimatsu és Arakawa, 2008). A PACAP az AC útvonalban stimulálja az anti-apoptotikus ERK1/2 faktort, foszforilálja a CREB-et és gátolja a pro-apoptotikus p38MAPK produkciót, melyből arra következtettek, hogy a peptid protektív hatása az ERK/CREB/MAPK

útvonalon keresztül érvényesül (Dohi és mtsai., 2002; Silveira és mtsai., 2002; Aubert és mtsai., 2006; Falluel-Morel és mtsai., 2007). További tanulmányban Rácz és mtsai. (2007) beszámoltak arról, hogy a PACAP1-38 protektív hatása során megemeli a foszfo-PKA, a foszfo-Bad, valamint további anti-apoptotikus faktorok (pl., Bcl-xL és 14-3-3) szintjét. Eredményeik alapján feltételezték, hogy a PKA/Bad/14-3-3 útvonal szerepet játszik a PACAP által szabályozott neuroprotektív hatásban.

Vizsgálataink ezzel szemben azt mutatták, hogy kísérleti felállásunkban a PACAP nem serkenti az AC/cAMP/PKA útvonalat, hanem a PLC kaszkád aktivációján keresztül gátolja az apoptotikus gépezetet. Ezt az eredményt korábbi tanulmányok is alátámasztják, melyekben a PACAP-ot csak nanomoláris koncentrációban (1 és 10 nM) alkalmazva figyeltek meg cAMP szint emelkedést (Shoge és mtsai., 1999; Silveira és mtsai., 2002). Ugyanakkor Leliévre és mtsai. (1998) bebizonyították, hogy a PACAP dózisfüggő módon képes a cAMP szintben történő növekedést előidézni, valamint nanomoláris koncentrációban proliferációt előidéző funkciója megváltozik és anti-mitogén faktorrá válik. Ezenkívül fontos megemlíteni, hogy a PACAP nemcsak AC útvonalon keresztül, hanem a PLC/IP_3 kiváltotta Ca^{2+} felszabadulás által is képes aktiválni a CREB útvonalat, ezáltal kifejtve anti-apoptotikus hatását (Blechman és Levkowitz, 2013). A PACAP képes a PKC stimulációján keresztül növelni az ERK aktivitást PC12 sejtekben, ami szintén a CREB foszforilációjához vezet (Barrie és mtsai., 1997). Tehát, mindezekből kiindulva azt feltételezhetjük, hogy a PACAP hatása az általunk használt modellben nem az AC/cAMP/PKA aktiválásán keresztül érvényesül a neuroprotektiv folyamatban.

Ezt a feltevést erősítik meg azok a tanulmányok, melyek arról számolnak be, hogy a PACAP az AC útvonal mellett, a PLC útvonalat is képes aktiválni neuroprotektív hatásának kifejtése során. Kisagyi granuláris neuronokban sikerült bizonyítani, hogy a PACAP anti-apoptotikus hatása nem az ERK/MAPK útvonalon keresztül, hanem a PKA, valamint a PKC aktiváción keresztül valósulhat meg (Vaudry és mtsai., 2000). Kanekar és mtsai. (2010) szintén kimutatták, hogy a szaglóhám sejtvonalakban a PLC, illetve AC/MAPKK blokkolók/aktivátorok PACAP-al való együttes alkalmazása hatásosnak bizonyult TNFα-indukálta degenerációban, melyből arra következtettek, hogy mindkét útvonal szerepet játszik a PACAP anti-apoptotikus folyamataiban. Ugyanakkor más tanulmányban az szerepel, hogy a szagló rendszert ért, axonális sértést követő apoptózis során a PACAP csak a PLC útvonalon keresztül fejtette ki neuroprotektív hatását (Han és Lucero, 2005).

A mi esetünkben a foszfatidilinozitol-specifikus PLC inhibítor Et-18-OCH_3 nem tudta kivédeni a PACAP anti-apoptotikus hatását. Eredményünkkel összhangban Silveira és mtsai. (2002) szintén beszámoltak arról, hogy a foszfatidilinozitol-specifikus PLC inhibítor, U73122, valamint a szelektív Ca^{2+} csatorna-blokkolók is hatástalannak bizonyultak. Ugyanakkor vizsgálatainkban a foszfatidilkolin-specifikus PLC inhibítor kivédte a PACAP hatását, amiből arra következtethetünk, hogy a PACAP szubnanomoláris dózisban a PLC útvonalon keresztül fejtheti ki protektív hatását MSG indukálta excitotoxicitás esetén neonatális patkány retinában.

A fent említett bizonyítékok mellett lényeges kiemelni, hogy a PACAP szignáltranszdukciós útvonalakra gyakorolt hatását nagymértékben befolyásolja a ligandkötésre alkalmas receptorok jelenléte. A PAC1 receptor izoformák azonosítása során kimutattuk, hogy a neonatális patkány retinában a null, hip, hop1 és hiphop1 receptorok vannak jelen (Lakk és mtsai., 2012). Ismert, hogy a 3. intracelluláris hurkot érintő splicing mechanizmus befolyásolja ezen PAC1 receptorokhoz kapcsolódó útvonalakat (Spengler és mtsai., 1993; Dickson és Finlayson, 2009). A null és a hop1 izoforma mind az AC, mind a PLC enzimet képes aktiválni, azonban a hop1 sokkal nagyobb affinitást mutat mindkét útvonalra nézve (Spengler és mtsai., 1993; Nicot és DiCicco-Bloom, 2001; May és mtsai., 2010). Ezen receptortípusok a citoplazmatikus Ca^{2+} megemelésével és a foszfolipáz-D (PLD) aktivációján keresztül is képesek szignál kaszkádokat elindítani (Blechman és Levkowitz, 2013). A hip receptor nagyobb százalékban AC szabályozta szignál mechanizmust indít el, viszont képes a PLC_{β}-hoz kapcsolódó kaszkád aktivációjára is (May és mtsai., 2010). A hiphop1 izoforma redukált potenciállal rendelkezik mindkét szignáltranszdukciós útvonalra nézve (Spengler és mtsai., 1993; Dickson és Finlayson, 2009). A VPAC1 és VPAC2 receptorok jelenléte szintén bizonyított újszülött patkány retinában (Lakk és mtsai., 2012). Ezek a receptorok viszont a szignál mechanizmusok széles skálájával rendelkeznek, képesek aktiválni az AC/cAMP, PLC és PLD, valamint Ca^{2+} szabadíthatnak fel az AC vagy IP_3 enzimek kaszkádba való bevonása nélkül (Christopoulos és mtsai., 2003; Dickson és Finlayson, 2009). Mivel az újszülött patkány retinában jelenlévő összes PACAP receptor típus képes a PLC enzimhez kapcsolódó szignál mechanizmus elindítására, megalapozottnak tűnik azon feltevésünk, miszerint a PACAP ezen útvonal aktiválásán keresztül fejti ki anti-apoptotikus hatását.

6.3. PACAP által szabályozott gének

Az embrió retinális primordiuma azonos morfológiai sajátosságokkal rendelkező sejpopulációkat tartalmaz, míg a kifejlett retina hét morfológiai és funkcionális különbséget mutató sejtből épül fel (Malicki, 2004). A gerinces retina fejlődése tehát a komplexitás nagymértékű növekedésével járt. Az évtizedek óta folyó kutatások eredményei számos faktort azonosítottak, melyek a sejtciklusból való kilépést, a retinális sejtek létrejöttét, a sejtpolaritás kialakítását, a sejtmigrációt, valamint a sejtek közötti kapcsolatok megjelenését szabályozzák (McPherron és Lee, 1993; Mehler és mtsai., 1997; Liu és mtsai., 2003; Webber és mtsai., 2003; de Melo és mtsai., 2005). Mivel ismert a PACAP fejlődésre gyakorolt sokrétű hatása, fontosnak tartottuk azon molekuláris faktorok azonosítását, melyek a peptid hosszabb távú szabályozó folyamataiban szerepet játszanak.

6.3.1. PACAP1-38 kezelés hatására változást nem mutató gének csoportjai

A génexpresszió kontroll egyedhez viszonyított, legalább két időpontban mért kétszeres, szignifikáns növekedését vagy felére csökkenését tekintettük értékelendő változásnak. A konzisztens és/vagy szignifikáns változást nem mutató gének halmazába tartoznak a sejtadhéziót szabályozó (Acan, CD44, L1CAM), a sejtmegújulásért (Neurog1) és a szimmetrikus/aszimmetrikus sejtosztódásért felelős (Dhh) gének, valamint a proteoszóma komplex elemeit felsorakoztató gének (Cul1, Skp1, Btrc) csoportjai. Feltételezhetjük, hogy a PACAP kezelés nem befolyásolja a sejt-sejt kapcsolatok kialakulását és a sejtek migrációját a vizsgált géneken keresztül. Ugyanakkor nem zárható ki annak a lehetősége sem, hogy a PACAP más faktorokon keresztül vesz részt ezen folyamatok szabályozásába.

6.3.2. Növekedési faktorok expressziójának változásai

A fibroblaszt növekedési faktorok (Fgf) széleskörű biológiai hatással rendelkező polipeptidek. Az Fgf családba 23 protein sorolható, melyek a tirozin kináz receptorokhoz való kötődésüktől függően szabályozzák a celluláris folyamatokat (Reuss és mtsai., 2003). Az Fgf-knek és receptoraiknak számos tagja expresszálódik a fejlődő gerinces szemben, ahol fontos szerepet töltenek be a szemhólyag létrejöttében (Picker és Brand, 2005), a lencse kialakulásában (Vogel-Höpker és mtsai., 2000), a progenitor sejtek proliferációjában és differenciációjában (Yang 2004), az axonnövekedésben és a ganglionsejtek navigációjában (Webber és mtsai., 2003), valamint a retinális

angiogenezisben (Rousseau és mtsai., 2003). Eredményeink azt mutatták, hogy PACAP kezelés hatására az Fgf1 expressziója fokozatos növekedést mutat. Ez a pozitív irányú változás fehérjeszinten is detektálható volt. Korábbi tanulmányok beszámoltak arról, hogy az Fgf1 és receptora embrionális és posztnatális korban is detektálható fejlődő patkány retinában, embrionálisan az NBL-ben, míg születést követően a GCL-ben és INL-ben is lokalizálható (Lovicu és mtsai., 1997; Kinkl és mtsai., 2002; Cinaroglu és mtsai., 2005). Ezekből és eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a PACAP Fgf1 szekréción keresztül szerepet játszhat a progenitor sejtek proliferációjában, valamint a már megszületett retinális ganglion és amakrin sejtek differenciációjában.

6.3.3. Növekedési differenciációs faktorok expressziójának változásai

A transzformáló növekedési faktorok (TGF)-β családjába tartozó csont morfogenetikus proteinek (Bmp-k) a sejtfunkciók számos formáját képesek szabályozni a fejlődő idegrendszerben. Szerepet játszhatnak a sejtsors meghatározásában, az apoptózisban és a sejtproliferációban (Mehler és mtsai., 1997). A Bmp-k több tagja, többek között a Bmp4 és Bmp7 is expresszálódik a gerinces retina embrionális fejlődési szakaszában, ahol a retina dorzoventrális szerkezetének kialakításában vesznek részt (Wawersik és mtsai., 1999; Belecky-Adams és Adler, 2001). A retinogenezis későbbi szakaszában a retinális neuronok túlélését és differenciációját szabályozzák (Adler és Belecky-Adams, 2002; Liu és mtsai., 2003; Murali és mtsai., 2005). Posztnatális egér retinában Bmp4 és receptorának jelenlétét mutatták ki a GCL-ben és az INL-ben (Liu és mtsai., 2003). Haynes és mtsai. (2007) a Bmp útvonal a Smad és és az Fgf-függő ERK útvonal aktivációján keresztüli proliferációt és differenciációt előidéző hatásáról számoltak be embrionális csirke retinában. A Bmp útvonal ugyanebben a modellben gátolva a Fgf útvonalat, regenerációt indukált apoptózis során. További kutatás bizonyítja, hogy a Bmp4 kezelés hatására egér retinában a retinális progenitor sejtek ganglion sejtsors felé differenciálódnak, mely magyarázható a Bmp4, Math5 expressziójára gyakorolt pozitív hatásával (Du és mtsai., 2010). Bár Ricard és mtsai. (2012) beszámoltak arról, hogy a Bmp9 injekció a retinális vaszkularizáció mértékét fokozta, a Bmp9 retinában való jelenlétéről további irodalmi adat nem áll rendelkezésünkre. Ugyanakkor más szövetekben (pl. szív, máj) a Bmp9 képes az endoteliális sejtek proliferációjának és migrációjának erős gátlására az Alk1 ligandjához kötődve (Holderfield és Hughes, 2008).

Eredményeinkben a Bmp4 expressziója nagymértékű növekedést mutatott, míg a Bmp9 tranziens növekedését egy elnyújtott csökkenés követte. Ezekből arra

következtethetünk, hogy a PACAP a Bmp9 gátlásán és a Bmp4 aktiválásán keresztül sejtproliferációt indukálhat, valamint a Math 5 aktivációján keresztül a már megszületett ganglion sejtek differenciációját segítheti elő.

A TGFβ szupercsaládba tartozó Gdf3 jelenlétét számos gerinces szövetben igazolták (McPherron és Lee, 1993), azonban a retinában való expressziójáról irodalmi adatok nem állnak rendelkezésre. Korábbi tanulmányok beszámoltak arról, hogy Gdf3 expressziót mutattak ki emlős embrionális őssejtekben, melyekből arra következtettek, hogy a Gdf3 szerepet tölthet be a pluripotencia fenntartásában (Ramalho-Santos és mtsai., 2002; Sato és mtsai., 2003). Levine és Brivanlou, (2006) beszámoltak arról, hogy a Gdf3 szerepet játszhat a pluripotens őssejtek differenciálatlan állapotban való tartásában a Bmp-k gátlásán keresztül. Eredményüket arra alapozták, hogy az emberi embrionális őssejtekben a Gdf expressziójának megemelkedése pluripotens markerek (Oct3/4 és Nanog) megjelenését indukálta. A Gdf3 fehérjeszinten is bifázisos változást, csökkenést majd ezt követően emelkedést mutat, melyből valószínűsíthető, hogy a PACAP ezen keresztül progenitor sejtek működését és esetleg osztódását befolyásolja.

6.3.4. Sejt-sejt kommunikációt szabályozó gének expressziójának változásai

A gap junction-ok olyan membránstruktúrák, melyek csatornákat formálva szabályozzák a sejt-sejt kommunikációt, ezáltal téve lehetővé ionok, kisméretű organikus metabolitok és 1 kDa-nál kisebb másodlagos messenger molekulák kicserélődését (Bennett és mtsai., 1991; Nagy és Rash, 2000). Minden gap junction csatorna egy konnexon párból áll, melyeket egyenként 6 konnexin molekula épít fel (Bennett és mtsai., 1991). Sokrétű szerepet tölthetnek be a fejlődő idegrendszerben, szabályozhatják a migrációt, sejtdifferenciációt, az axonnövekedést és a szinapszisok kialakulását is (Nadarajah és mtsai., 1997; Bruzzone és Dermietzel, 2006). Rágcsálók központi idegrendszerében a konnexin-32 (Gjb1) és konnexin-43 (Gja1) expresszálódik a legnagyobb mennyiségben (Kumar és Gilula, 1996). Mindkét connexin molekula megtalálható a neuronokban a fejlődés korai szakaszától kezdődően (Bruzzone és Dermietzel, 2006). Giblin és Christensen (1997) a gap junction-ok jelenlétét írták le a gerinces retina különböző neuronális sejttípusaiban, melyek fontos szerepet töltenek be a gyors interneuronális kommunikációban, valamint a szignálok integrációjában és terjedésében. Bár génexpressziós vizsgálataink során a Gjb1 szintje megemelkedett, a poszttranszlációs szabályozásokra visszavezethetően, fehérjeszinten nem tudtunk változást detektálni.

Mindebből arra következtethetünk, hogy a PACAP ebben a korai fejlődési stádiumban nem hat a sejt-sejt kommunikációt szabályozó fehérjékre.

6.3.5. Embrionális sejtvonal markerek expressziójának változásai

A Nanog, a Pax6-hoz hasonlóan transzkripciós faktor, mely a retinogenezis során a multipotens állapot fenntartásáért felel, hiányában pedig sejtdifferenciáció következik be (Marquardt és mtsai., 2001; Firsova és mtsai., 2008). Bár a retinában való előfordulásával és funkciójával kapcsolatos irodalmi adatok nem állnak a rendelkezésünkre, más rendszerekben a tanulmányok arról számolnak be, hogy a Nanog képes gátolni a differenciációt, ugyanis a Nanog negatív regulációja képes elősegíteni a sejtek differenciálódását az embrionális fejlődés alatt (Hamazaki és mtsai., 2006; Pereira és Merrill, 2006). A PACAP1-38 hatására a Nanog szintjének emelkedése, végül erőteljes csökkenése a sejteket a differenciáció irányába indíthatja el.

A T-box génekhez tartozó, szintén transzkripciós faktorként ismert T (Brachyury) protein gerincesekben létfontosságú a posterior mezoderma differenciálódásában és az axiális fejlődésben (Beddington és mtsai., 1992; Shulte-Merker és mtsai., 1994). Ezt bizonyítja, hogy számos gerinces fajban (egér, csirke, zebrahal) már a korai embrionális korban kimutatták jelenlétét (Hermann és mtsai., 1990; Shulte-Merker és mtsai., 1992; Kispert és mtsai., 1995). Alacsonyabb rendű fajokban mutatott funkcionális sajátossága alapján arra következtetnek, hogy a sejtek morfogenetikus változásait a sejtadhézión és migráción keresztül szabályozhatja (Holstien és mtsai., 2010). Mivel a retinában való előfordulásáról nincs adat, az idegrendszer posztnatális fejlődésére gyakorolt hatása is kérdéses, így PACAP által indukált expressziójának hatásait tekintve csak a fent említett irodalmi adatokra támaszkodhatunk.

6.3.6. A Wnt útvonal markerének expressziós változása

A Wnt proteinek fontos szerepet töltenek be az embriogenezis során bekövetkező fejlődési folyamatokban, többek között a test polaritásának kialakulásában (Wodarz és Nusse, 1998). A központi idegrendszer fejlődésekor szabályozzák a sejtek elköteleződését, a sejtproliferációt, az axonnövekedést, valamint a dendritek és a szinaptikus kapcsolatok kialakulását (Hall és mtsai., 2000, Kiecker és Niehrs, 2001; Lyuksyutova és mtsai., 2003). A Wnt szignáltranszdukciós útvonalban a Wnt ligandok a receptorukhoz való kötődésen keresztül, leggyakrabban a β-catenin faktor aktivációjához vezetnek, annak a sejtmagba való transzlokációján keresztül szabályozzák a transzkripciós folyamatokat (Ciani és

Salinas, 2005). Más tanulmányok arról számolnak be, hogy a Wnt ligandok ugyanezen útvonalon keresztül az embrionális, szomatikus és neurális őssejtekből történő neuronális differenciációt segítik elő (Salero és Hatten, 2007; Wei és mtsai., 2012). Osakada és mtsai. (2007) a Wnt receptorok felnőtt retinában való megjelenéséből arra következtetnek, hogy a Wnt útvonalnak a fejlődést szabályozó hatásain kívül, a regeneratív folyamatok elősegítésében is szerepe van. Eredményeinkben emelkedést tapasztaltunk a Wnt1 szintjében, amiből arra következtethetünk, hogy a PACAP a Wnt útvonal aktiválásán keresztül szintén képes szabályozni a fejlődési folyamatokat.

6.3.7. Retinális sejttípusok differenciációját irányító gének változásai

A csoportba sorolt gének egyrészt a transzkripciós faktorok basic helix-loop-helix (bHLH) csoportjába tartoznak (Mash1, Math5, NeuroD1, Neurog1), másrészt a homeobox gének képviselői (Dlx1, Dlx2, Otx2, Chx10).

A NeuroD1 a retinális progenitor sejtek gliává, vagy neuronokká való differenciálódását szabályozza. Hiányában a Müller-sejtek és a bipoláris sejtek száma nő (Cepko, 1999). A NeuroD1 emellett a pálcikák életben maradásához (Morrow és mtsai., 1999), valamint az amakrin sejtek képződéséhez is szükséges (Inoue és mtsai., 2002). A Chx10 már a korai, embrionális kortól expresszálódik a neurális retinában, majd posztnatális fejlődés során és felnőtt korban megtalálható a retinális neuroepitéliumban és a bipoláris sejtekben (Burmeister és mtsai., 1996; de Melo és mtsai., 2003). Mind a Mash1, mind a Chx10 szükséges a progenitor sejtek proliferációjához és a posztmitotikus sejtek bipoláris sejtekké történő éréséhez, míg hiányukban a Müller-glia sejtek számának növekedése figyelhető meg (Akagi és mtsai., 2004; Rowan és Cepko, 2004). Az Otx2 fontos a retinális pigment epitélium és a fotoreceptor réteg kialakulásában, valamint a progenitor sejtek fotoreceptorokká történő érésben. Hiányában a differenciálódó fotoreceptor sejtek amakrin sejtekké alakulnak (Martinez-Morales és mtsai., 2001; Nishida és mtsai., 2003). Mivel eredményeinkben az eddig említett markerek egyikének sem változott az expressziója, feltételezhető, hogy a PACAP ebben a fejlődési stádiumban nem hat a Müller-glia, fotoreceptor-, bipoláris-, és amakrin sejtek képződésére.

A Dlx1 és Dlx2 már az E13 naptól expresszálódik a fejlődő retinában (Eisenstat és mtsai., 1999). Mindkét gén a retinális ganglion sejtek és az INL-ben lévő interneuronok képződésében játszik szerepet (de Melo és mtsai., 2003). De Melo és mtsai., (2005) kimutatták, hogy a Dlx1/2 mutáció következtében csak a differenciálatlan ganglion sejtek tűntek el a megemelkedett apoptózis során, ami a ganglion sejtpopuláció mintegy 30%-át

jelentette. Ebből arra következtettek, hogy csak a késői születésű ganglion sejt progenitorok függnek a Dlx1/2 jelenlététől, míg a korai születésűek nem tartoznak ezen gének szabályozása alá. A Math5 szintén a retinális ganglion sejtek sorsát és differenciálódását szabályozza. Azonban jelenléte esszenciális ezekre a sejtekre nézve, ugyanis a Math5 homozigóta mutánsa a retinális ganglion sejtek teljes hiányához és a csap fotoreceptor sejtek számbeli növekedéséhez vezet (Brown és mtsai., 2001). A Dlx2 időszakos és a Math5 tartósan magas mennyiségéből arra következtethetünk, hogy a PACAP kezelés a ganglion sejtek érését segíti elő újszülött patkány retinában.

6.4. PACAP kezelés hatására bekövetkező morfológiai változások

A kifejlődött emlős retina szerkezete neonatális korban három fő rétegre, a még differenciálatlan sejteket tartalmazó NBL-re, a GCL-re és a kettőt elválasztó IPL-re különíthető el. A külső neuroblaszt rétegben található sejtek csak a posztnatális 6.-8. nap környékén rendeződnek az OPL által elválasztott külső- és belső nukleáris rétegbe (Péquignot és mtsai., 2003). A fejlődő szem ventrikuláris zónájában helyet foglaló progenitor sejtekből 7 különböző sejttípus alakul ki. A sejttípusok születése párhuzamosan történik, de mindegyik sejttípus jól jellemezhető, egyedi sejtosztódási csúccsal rendelkezik. A posztnatális fejlődés során az amakrin sejtek a P1 napon, a pálcika fotoreceptorok a születés napjától a P6 napig, míg a Müller- és bipoláris sejtek a P6 napon mutatnak proliferációs csúcsokat (Reese és Colello, 1992; Rapaport és mtsai., 2004).

Morfometriai vizsgálataink kimutatták az NBL teljes retinavastagsághoz viszonyított növekedését PACAP kezelés hatására. Ezzel összefüggésben az immuncitokémiai eredményekben ugyanezen sejtrétegben a calbindin pozitív horizontális sejtek és az IPL határán lévő, HPC-1 pozitív amakrin sejtek számának megemelkedését tapasztaltuk. Ezen eredményekből arra következtethetünk, hogy a PACAP a horizontális és amakrin sejtek képződését serkenti az NBL rétegben. Feltevésünket a PACAP kezelés hatására bekövetkező, sejtproliferációt szabályozó fehérjék mennyiségi növekedése (pl., Fgf1, Bmp4, Wnt1) is alátámasztja.

További eredményként említhető a PACAP1-38 kezelés hatására bekövetkező IPL vékonyodása és a GCL-ben található sejtek számának szignifikáns csökkenése. A mért változás egyik magyarázata lehet a PACAP proliferáció mértékét csökkentő hatása. Azonban a PACAP azon gének és fehérjéik expresszióját emeli meg, melyek a sejtek

proliferációját (pl., Fgf1, Bmp4) és ganglion sejtek képződését jelző markerek (Math5, Dlx2) mennyiségét serkentik, tehát ez a feltevés nem valószínű. A GCL-ben történő sejtszámcsökkenés másik lehetséges oka lehet a PACAP apoptózist fokozó hatása. Ugyanakkor ismerve a PACAP anti-apoptotikus tulajdonságát (Vaudry és mtsai., 2000; Onoue és mtsai., 2002; Wang és mtsai., 2005), a feltételezés bizonyítása további vizsgálatokat igényel. Mivel a proliferáció gátlásának és az apoptózis növekedésének felvetése nem megalapozott, valószínűsíthetően a migráció mértékének csökkenése idézheti elő a GCL-ben történő sejtszám csökkenést. Ugyanis korábbi tanumányok beszámolnak arról, hogy a PACAP a posztnatális fejlődés első hetében, közvetlenül képes a fejletlen granuláris neuronok migrációjának gátlására a kisagyi Purkinje sejtrétegben (Falluel-Morel és mtsai., 2005, Cameron és mtsai., 2007). Raoult és mtsai. (2014) arról számoltak be, hogy az exogén PACAP1-38 71%-al lassítja le a fejletlen granuláris sejtek centripetális migrációját a kisagyi molekuláris sejtrétegben, míg a PAC1 receptor antagonistaként ismert PACAP6-38 ugyanezen sejtek migrációját 23%-al emeli meg a Purkinje sejtrétegben, *ex vivo*. Ezt a jelenséget a PACAP által aktivált szignáltranszdukciós útvonalakkal magyarázták. Köztudott, hogy a cerebellumban található endotelin receptorok által indukált G_q szignál gátolja a neuronális progenitor sejtek migrációját (Mizuno és mtsai., 2005). Mivel a PACAP szintén képes a G_q proteinen keresztül szignál útvonalat indítani (Spengler és mtsai., 1993), feltételezték, hogy a PACAP is ilyen módon fejti ki gátló hatását. Ezt a feltevést erősíti meg az a tény, miszerint az általunk azonosított null, hip, hop1 és hiphop1 receptor izoformák mindegyike képes aktiválni a G_q/PLC útvonalat (Blechman és Levkowitz, 2013). Szintén bizonyított, hogy PAC1 receptor immunreaktív sejtek figyelhetőek meg a posztnatális fejlődés első hetében az NBL, GCL területén, valamint később az INL területén is (Dénes és mtsai., 2014). Ezen eredményekből kiindulva, lehetséges, hogy a PACAP az NBL rétegben a PAC1 receptorokhoz való kötődése által szabályozza a migráló sejtek számát, ezáltal előidézve a sejtszám csökkenést a GCL-ben.

7. Összefoglalás

A PACAP mind a perifériás, mind a központi idegrendszerben előforduló, pleiotrópikus regulátor molekula, mely a fiziológiai hatások széles körével rendelkezik a fejlődő központi idegrendszerben (pl., sejproliferáció, sejtdifferenciáció, neuritnövekedés). Glutamát és NMDA indukálta excitotoxicitás, etanol, ischémia, valamint anisomicin által kiváltott sejthalál során mutatott erős anti-apoptotikus hatásának következtében a neurotoxikológiai kutatások középpontjában van. Szabályozó hatásait a PACAP sejtfelszíni receptoraihoz (PAC1, VPAC1, VPAC2) való kapcsolódásán keresztül érvényesíti, melyek mindegyike a G protein kapcsolt receptorok családjába tartozik. Az ismert PACAP receptorok és izoformáik által az AC és PLC szignáltranszdukciós útvonalak aktiválódhatnak.

Habár számos tanulmány vizsgálta a PACAP hatásait és receptorainak jelenlétét a központi idegrendszerben, a PACAP receptorok lokalizációja és expressziójuk alakulása a fejlődés során kevésbé ismert. A PACAP hatások kialakításában szerepet játszó gének azonosítása, expressziójuk változásának vizsgálata, valamint a glutamát által indukált excitotoxicitás kivédését biztosító, PACAP által aktivált szignáltranszdukciós útvonalak azonosítása neonatális patkány retinában szintén tisztázásra vár.

Vizsgálati eredményeinket a következő pontokba foglalhatjuk össze:

1. Elsőként azonosítottuk a retinában expresszálódó négy PAC1 receptor izoformát (null, hip, hop1, hiphop1) a retina posztnatális fejlődése során. A null és hip transzkripciós szintjében fokozatos csökkenést tapasztaltunk, míg a hop1 expressziójában a posztnatális 20. napon detektáltuk a legnagyobb növekedést. A hiphop1 a posztnatális 10. nap kivételével lényeges változást nem mutatott. Tehát a PAC1 receptor izoformák specifikus expressziós mintázatot vesznek fel a fejlődés során, mely mutatja a folyamat irányításában betöltött lényeges szerepüket.
2. A retinában elsőként világítottunk rá arra, hogy a PACAP a PLC útvonalon keresztül is képes kifejteni anti-apoptotikus hatását MSG indukálta neurodegenerációs modellben. Vizsgálatainkban a PKA és a cAMP szintje nem változott, az AC blokkoló (DDA), valamint a foszfatidilinozitol-specifikus PLC gátló (Et-18-OCH_3) sem tudta kivédeni a PACAP anti-apoptotikus hatását, míg a foszfatidilkolin-specifikus PLC blokkoló (D609CAS) hatásosnak bizonyult. További fontos megállapítás, hogy a PACAP különböző szignáltranszdukciós

útvonalak felé mutatott rugalmasságát a jelenlévő PACAP receptorok mellett a peptid extracelluláris koncentrációja is meghatározhatja.

3. Elsőként azonosítottunk számos, PACAP által szabályozott gént és géncsaládot a retinában. A génexpressziós vizsgálatok eredményeként a 31 vizsgált gén közül a PACAP1-38 kezelés növelte a sejtek proliferációját és pluripotens állapotban való tartását szabályozó gének szintjét (Fgf1, Bmp4, Gdf3, Nanog, T). Szintén emelkedést tapasztaltunk a Wnt1 és a ganglionsejtek differenciációjáért felelős faktorok (Math5, Dlx2) mennyiségében is. A sejtadhézióért, sejtek kommunikációjért és migrációjáért felelős gének változást nem mutattak. Mindebből arra következtethetünk, hogy a PACAP nem csak közvetlen, hanem a szekréciós proteineken (Fgf1, Bmp4, Gdf3, Wnt1) keresztül kifejtett, közvetett hatással is rendelkezik.
4. A morfológiai vizsgálatok során elsőként figyeltük meg a PACAP kezelés hatására bekövetkező változásokat a fejlődő emlős retinában. Kimutattuk az NBL vastagságának, illetve a Chx-10 pozitív progenitor, a horizontális és az amakrin sejtek számának növekedését, valamint a belső rostos réteg vastagságának és a ganglionsejtek számának csökkenését. Tehát megmutattuk, hogy a PACAP képes befolyásolni a retina morfológiai sajátosságait a retinális sejtek számának és differenciációjának szabályozása által.

Konklúzióként levonhatjuk, hogy a PACAP receptorok (VPAC1, VPAC2 és PAC1 izoformák) nagymértékben képesek szabályozni az emlős retina ontogenezisét. Úgy tűnik, hogy a PACAP egy részről a sejtek proliferációs képességének fenntartása, a progenitorok számának emelése és esetleg a migráció csökkentése által a szövet differenciációját lassíthatja. Más részről viszont felvetődik a PACAP - mint regenerációt serkentő faktor - alkalmazási lehetősége egyes neurodegenerációs betegségekben. Továbbá eredményeink rávilágítanak arra, hogy a PACAP extracelluláris koncentrációja befolyásolhatja a PACAP receptorokon keresztüli intracelluláris szignáltranszdukciós mechanizmusok létrejöttét, ezáltal az általuk mediált hatásokat.

8. Summary

As a pleiotropic hormone/neurotransmitter, the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP1-38) is responsible for a variety of physiological actions in the developing nervous systems (e.g. cell proliferation, differentiation, neurite outgrowth). PACAP1-38 signals via three G protein-coupled receptors: (1) PAC1-R, which binds PACAP1-38 more potently than VIP and (2) VPAC1 and (3) VPAC2 receptors, which do not discriminate between PACAP1-38 and VIP. In addition, PAC1-R is an object of alternative splicing that generates numerous isoforms. At present, sixteen PAC1-R splice variants have been described in mammals; these isoforms are distinguished by alterations in the N-terminal domain or the third intracellular loop or different combinations of both. Consequently, PAC1-R isoforms differ with respect to ligand-binding specificity/affinity and G-protein coupling resulting in the PACAP1-38 signal being transduced through multiple intracellular pathways.

As a consequence of its strong anti-apoptotic effect, first and foremost, the peptide has been in the focus of neurotoxicity research and its neuroprotective potential has been extensively investigated in numerous neurodegenerative models (e.g. ischemia, ethanol toxicity, NO toxicity, oxidative stress). Nevertheless, the early expression of PACAP and PAC1-R pointed to the possibility of their involvement in development of a wide range of living organisms.

Although, a neuroprotective effect of PACAP1-38 has been demonstrated in monosodium glutamate (MSG) induced neurotoxicity in retina, the underlying transduction pathways induced by PACAP1-38 in the *in vivo* MSG model remain unclear. Furthermore, the literature reporting the actions of PACAP and presence of PAC-1 receptor splicing variants in central nervous system is vast, however, the paucity of detailed information on the PAC1-R expressing elements and function of exogenous PACAP in retinal development is striking.

Therefore, in the present thesis, we aimed to (i) dissect the PACAP1-38-activated signaling pathways mediating its anti-apoptotic effect in MSG induced excitotoxicity in immature rat retina, (ii) describe the expression of PAC1-R isoforms on precise developmental time scale, (iii) identify genes that are governed by PACAP, at last but not at least, (iv) to find those retinal cell types that are affected by PACAP in the developing rat retina.

Results of our investigation are summarized in the following points:

1. Using splicing variant specific primers, the analysis revealed that the null, hip, hop1, hiphop1 variants were expressed in the rat retina and most importantly, each showed a unique expression profile. The transcript levels of the null and hip splice variants showed a gradual decline while expression of hop1 variant increased significantly during development. Hiphop1 transcript levels did not display remarkable changes except for a transient increase at P10. Since each PAC1 receptor isoform displays a unique expression profile, we suggest that selective splicing and expression of PAC1 receptor may be a pivotal component of developmental processes.
2. We found that cAMP blockade by an adenylyl-cyclase inhibitor DDA did not abrogate the neuroprotective effect of PACAP. Furthermore, following PACAP treatment cAMP and PKA levels were unaltered. On the other hand, blockade of the phosphatidylcholine-specific PLC pathway by D609CAS inhibited the effects of PACAP. It seems that at picomolar concentrations applied in our study, PACAP1-38 has no ability to increase cAMP production and still exerts significant anti-apoptotic effect through PLC activation. We conclude that intracellular PACAP pathways might be determined by extracellular PACAP levels. Consequently, PACAP produce a variety of outcomes in a dose-dependent manner.
3. We could identify numerous genes and gene families, which are regulated by PACAP. The effects of exogenously applied PACAP might stimulate pluripotency due to upregulation of Wnt1, T and Gdf3. It could promote specific neuronal differentiation of ganglion cells and photoreceptors through upregulation of Math5, Dlx2 and Otx2, respectively. PACAP appears not regulate cell adhesion, cell migration, cell-cell communication (Gjb1) and axon outgrowth (Acan, CD44, L1CAM). In sum, PACAP affects retinogenesis directly as well as indirectly through regulation of secreted signaling proteins.
4. As a consequence of i.v PACAP1-38 injection, an increase was observed in the thickness of the neuroblast layer compared to that of the control tissue. In line of this observation, the number of the Chx-10 positive progenitor cells, horizontal and amacrin cells was also increased. In addition, neurite outgrowth of the horizontal cells was severely underdeveloped in PACAP treated retinas. In contrast, the cell number in the ganglion cell layer and the thickness of the inner plexiform layer

appeared to decrease compared to the control retina. Consequently, the PACAP do has an ability to affect the morphogenesis of the retina, also, the number and differentiation of the retinal neurons.

In conclusions, our results provide the first evidence of the great flexibility of PACAP1-38 in triggering diverse signaling cascades to protect retinal cells against MSG-induced apoptosis. The observation that PAC1 receptors displayed enhanced and differential expression in different stages of the postnatal retina ontogenesis suggest a versatile physiological role for PACAP throughout retinal development. PACAP appears to affect retinal differentiation by inducing critical secreted signaling molecules with mitogenic effects. Acting directly and indirectly, PACAP seems to be a negative regulator of retinal development by inducing progenitor proliferation while repressing arborization.

9. Irodalomjegyzék

Adler R, Belecky-Adams TL. (2002) *The role of bone morphogenetic proteins in the differentiation of the ventral optic cup.* Development, 129(13):3161-71.

Ajpru S, McArthur AJ, Piggins HD, Sugden D. (2002) *Identification of PAC1 receptor isoform mRNAs by real-time PCR in rat suprachiasmatic nucleus.* Brain Res Mol Brain Res., 105(1-2):29-37.

Akagi T, Mandai M, Ooto S, Hirami Y, Osakada F, Kageyama R, Yoshimura N, Takahashi M. (2004) *Otx2 homeobox gene induces photoreceptor-specific phenotypes in cells derived from adult iris and ciliary tissue.* Invest Ophthalmol Vis Sci., 45(12):4570-5.

Alexandre D, Alonzeau J, Bill BR, Ekker SC, Waschek JA. (2011) *Expression analysis of PAC1-R and PACAP genes in zebrafish embryos.* J Mol Neurosci., 43(1):94-100.

Alsina-Fernandez J, Bokvist BK, Cummins RC, Glaesner W, Gromada JL, Mayer JP, Zhang L. (2005) *Selective vpac2 receptor peptide agonists.* WO2005113594 A1.

Aubert N, Falluel-Morel A, Vaudry D, Xifro X, Rodriguez-Alvarez J, Fisch C, de Jouffrey S, Lebigot JF, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. (2006) *PACAP and C2-ceramide generate different AP-1 complexes through a MAP-kinase-dependent pathway: involvement of c-Fos in PACAP-induced Bcl-2 expression.* J Neurochem., 99(4):1237-50.

Babai N, Atlasz T, Tamás A, Reglodi D, Tóth G, Kiss P, Gábriel R. (2006) *Search for the optimal monosodium glutamate treatment schedule to study the neuroprotective effects of PACAP in the retina.* Ann N Y Acad Sci., 1070:149-55.

Bagnoli P, Dal Monte M, Casini G. (2003) *Expression of neuropeptides and their receptors in the developing retina of mammals.* Histol Histopathol., 18(4):1219-42.

Barrie AP, Clohessy AM, Buensuceso CS, Rogers MV, Allen JM. (1997) *Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide stimulates extracellular signal-regulated kinase 1 or 2 (ERK1/2) activity in a Ras-independent, mitogen-activated protein Kinase/ERK kinase 1 or 2-dependent manner in PC12 cells.* J Biol Chem., 272(32):19666-71.

Basille M, Vaudry D, Coulouarn Y, Jegou S, Lihrmann I, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez B. (2000) *Comparative distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) binding sites and PACAP receptor mRNAs in the rat brain during development.* J Comp Neurol., 425(4):495-509.

Bassett EA, Wallace VA. (2012) *Cell fate determination in the vertebrate retina.* Trends Neurosci., 35(9):565-73.

Beddington RS, Rashbass P, Wilson V. (1992) *Brachyury-a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis.* Dev Suppl., 1992:157-65.

Belecky-Adams T, Adler R. (2001) *Developmental expression patterns of bone morphogenetic proteins, receptors, and binding proteins in the chick retina.* J Comp Neurol., 430(4):562-72.

Bennett MV, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Sáez JC. (1991) *Gap junctions: new tools, new answers, new questions.* Neuron, 6(3):305-20.

Blechman J, Levkowitz G. (2013) *Alternative Splicing of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Receptor PAC1: Mechanisms of Fine Tuning of Brain Activity.* Front Endocrinol., 4:55.

Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS. (2003) *A unified modell for apical caspase activation.* Mol Cell., 11: 529-541.

Boatright KM, Salvesen GS. (2003) *Mechanisms of caspase activation.* Curr Opin Cell Biol., 15: 725-731.

Borba JC, Henze IP, Silveira MS, Kubrusly RC, Gardino PF, de Mello MC, Hokoç JN, de Mello FG. (2005) *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) can act as determinant of the tyrosine hydroxylase phenotype of dopaminergic cells during retina development.* Brain Res Dev Brain Res., 156(2):193-201.

Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC. (2003) *Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways.* Oncogene, 22:8608-8618.

Brown NL, Patel S, Brzezinski J, Glaser T. (2001) *Math5 is required for retinal ganglion cell and optic nerve formation.* Development, 128(13):2497-508.

Bruzzone R, Dermietzel R. (2006) *Structure and function of gap junctions in the developing brain.* Cell Tissue Res., 326(2):239-48.

Burmeister M, Novak J, Liang MY, Basu S, Ploder L, Hawes NL, Vidgen D, Hoover F, Goldman D, Kalnins VI, Roderick TH, Taylor BA, Hankin MH, McInnes RR. (1996) *Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation.* Nat Genet., 12(4):376-84.

Cameron DB, Galas L, Jiang Y, Raoult E, Vaudry D, Komuro H. (2007) *Cerebellar cortical-layer-specific control of neuronal migration by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide.* Neuroscience, 146(2):697-712.

Cavallaro S, D'Agata V, Guardabasso V, Travali S, Stivala F, Canonico PL. (1995) *Differentiation induces pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor expression in PC-12 cells.* Mol Pharmacol., 48(1):56-62.

Cepko CL. (1999) *The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates.* Curr Opin Neurobiol., 9(1):37-46.

Chen TA, Yang F, Cole GM, Chan SO. (2001) *Inhibition of caspase-3-like activity reduces glutamate induced cell death in adult rat retina.* Brain Res., 904:177-88.

Christopoulos A, Christopoulos G, Morfis M, Udawela M, Laburthe M, Couvineau A, Kuwasako K, Tilakaratne N, Sexton PM. (2003) *Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins.* J Biol Chem., 278(5):3293-7.

Ciani L, Salinas PC. (2005*) WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity.* Nat Rev Neurosci., 6(5):351-62.

Cinaroglu A, Ozmen Y, Ozdemir A, Ozcan F, Ergorul C, Cayirlioglu P, Hicks D, Bugra K. (2005) *Expression and possible function of fibroblast growth factor 9 (FGF9) and its cognate receptors FGFR2 and FGFR3 in postnatal and adult retina.* J Neurosci Res., 79(3):329-39.

D'Agata V, Cavallaro S. (1998) *Functional and molecular expression of PACAP/VIP receptors in the rat retina.* Brain Res Mol Brain Res., 54(1):161-4.

Danial NN, Korsmeyer SJ. (2004) *Cell death: critical control points.* Cell, 116:205-219.

Dautzenberg FM, Mevenkamp G, Wille S, Hauger RL. (1999) *N-terminal splice variants of the type I PACAP receptor: isolation, characterization and ligand binding/selectivity determinants.* J Neuroendocrinol., 11(12):941-949.

Davanger S, Torp R, Ottersen OP. (1994) *Co-localization of glutamate and homocysteic acid immunoreactivities in human photoreceptor terminals.* Neuroscience, 63:123-33.

Dejda A, Jozwiak-Bebenista M, Nowak JZ. (2006) *PACAP, VIP, and PHI: effects on AC-, PLC-, and PLD-driven signaling systems in the primary glial cell cultures.* Ann N Y Acad Sci., 1070:220-5.

Dejda A, Jolivel V, Bourgault S, Seaborn T, Fournier A, Vaudry H, Vaudry D. (2008) *Inhibitory effect of PACAP on caspase activity in neuronal apoptosis: a better understanding towards therapeutic applications in neurodegenerative diseases.* J Mol Neurosci., 36(1-3):26-37.

de Melo J, Du G, Fonseca M, Gillespie LA, Turk WJ, Rubenstein JL, Eisenstat DD. (2005) *Dlx1 and Dlx2 function is necessary for terminal differentiation and survival of late-born retinal ganglion cells in the developing mouse retina.* Development, 132(2):311-22.

de Melo J, Qiu X, Du G, Cristante L, Eisenstat DD. (2003) *Dlx1, Dlx2, Pax6, Brn3b, and Chx10 homeobox gene expression defines the retinal ganglion and inner nuclear layers of the developing and adult mouse retina.* J Comp Neurol., 461(2):187-204.

Dénes V, Czotter N, Lakk M, Berta G, Gábriel R. (2014) *PAC1-expressing structures of neural retina alter their PAC1 isoform splicing during postnatal development.* Cell Tissue Res., 355(2):279-88.

Dénes V, Lakk M, Czotter N, Gábriel R. (2011) *A precise temporal dissection of monosodium glutamate-induced apoptotic events in newborn rat retina in vivo.* Neurochem Res., 36(8):1464-74.

Dickson L, Finlayson K. (2009) *VPAC and PAC receptors: From ligands to function.* Pharmacol Ther., 121(3):294-316.

Diederen RM, La Heij EC, Deutz NE, Kijlstra A, Kessels AG, van Eijk HM, Liem AT, Dieudonné S, Hendrikse F. (2006) *Increased glutamate levels in the vitreous of patients with retinal detachment.* Exp Eye Res., 83:45-50.

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(1-3):83-88.

Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, Podos SM, Lipton SA. (1996) *Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma.* Arch Ophthalmol., 114: 299-305.

Du Y, Xiao Q, Yip HK. (2010) *Regulation of retinal progenitor cell differentiation by bone morphogenetic protein 4 is mediated by the smad/id cascade.* Invest Ophthalmol Vis Sci., 51(7):3764-73.

Eisenstat DD, Liu JK, Mione M, Zhong W, Yu G, Anderson SA, Ghattas I, Puelles L, Rubenstein JL. (1999) *DLX-1, DLX-2, and DLX-5 expression define distinct stages of basal forebrain differentiation.* J Comp Neurol., 414(2):217-37.

Erhardt NM, Fradinger EA, Cervini LA, Rivier JE, Sherwood NM. (2001) *Early expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and activation of its receptor in chick neuroblasts.* Endocrinology, 142(4):1616-25.

Falluel-Morel A, Chafai M, Vaudry D, Basille M, Cazillis M, Aubert N, Louiset E, de Jouffrey S, Le Bigot JF, Fournier A, Gressens P, Rostène W, Vaudry H,Gonzalez BJ. (2007) *The neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide exerts anti-apoptotic and differentiating effects during neurogenesis: focus on cerebellar granule neurones and embryonic stem cells.* J Neuroendocrinol., 19(5):321-7.

Falluel-Morel A, Vaudry D, Aubert N, Galas L, Benard M, Basille M, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ**.** (2005) *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents the effects of ceramides on migration, neurite outgrowth, and cytoskeleton remodelling.* Proc Natl Acad Sci U S A.**,** 102(7):2637-42.

Firsova NV, Markintantova IuV, Smirnova IuA, Panova IG, Sukhikh GT, Zinov'eva RD, Mitashov VI. (2008) *[Identification of the OCT4-pg1 retrogene and NANOG gene expression in the human embryonic eye]*. Izv Akad Nauk Ser Biol., 2:134-8.

Galli-Resta L. (1998) *Patterning the vertebrate retina: the early appearance of retinal mosaics.* Semin Cell Dev Biol.**,** 9(3):279-84.

Galli-Resta L, Ensini M. (1996) *An intrinsic time limit between genesis and death of individual neurons in the developing retinal ganglion cell layer.* J Neurosci., 16(7):2318-24.

Giblin LJ, Christensen BN. (1997) *Connexin43 immunoreactivity in the catfish retina.* Brain Res., 755(1):146-50.

Gottschall PE, Tatsuno I, Miyata A, Arimura A. (1990) *Characterization and distribution of binding sites for the hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide.* Endocrinology, 127(1):272-277.

Green DR, Reed JC. (1998) *Mitochondria and apoptosis.* Science, 281:1309-1312.

Hall AC, Lucas FR, Salinas PC. (2000) *Axonal remodelling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling.* Cell, 100(5):525-35.

Hamazaki T, Kehoe SM, Nakano T, Terada N. (2006) *The Grb2/Mek pathway represses Nanog in murine embryonic stem cells.* Mol Cell Biol., 26(20):7539-49.

Han P, Lucero MT. (2005) *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide reduces A-type K+ currents and caspase activity in cultured adult mouse olfactory neurons.* Neuroscience, 134(3):745-56.

Haynes T, Gutierrez C, Aycinena JC, Tsonis PA, Del Rio-Tsonis K. (2007) *BMP signaling mediates stem/progenitor cell-induced retina regeneration.* Proc Natl Acad Sci U S A., 104(51):20380-5.

Herrmann BG, Labeit S, Poustka A, King TR, Lehrach H. (1990) *Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse.* Nature, 343(6259):617-22.

Holderfield MT, Hughes CC. (2008) *Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor-beta in vascular morphogenesis.* Circ Res., 102(6):637-52.

Holstien K, Rivera A, Windsor P, Ding S, Leys SP, Hill M, Hill A. (2010) *Expansion, diversification, and expression of T-box family genes in Porifera.* Dev Genes Evol., 220(9-10):251-62.

http://www.cellsignaling.com

Hu Z, Lelievre V, Rodriguez WI, Cheng JW, Waschek JA. (2002) *Comparative distributions of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide and its selective type I receptor mRNA in the frog (Xenopus laevis) brain.* Regul Pept., 109(1-3):15-26.

Inoue T, Hojo M, Bessho Y, Tano Y, Lee JE, Kageyama R. (2002) *Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina.* Development, 129(4):831-42.

Johansson K, Bruun A, deVente J, Ehinger B. (2000) *Immunohistochemical analysis of the developing inner plexiform layer in postnatal rat retina.* Invest Ophthalmol Vis Sci., 41(1):305-313.

Johnson J, Tian N, Caywood MS, Reimer RJ, Edwards RH, Copenhagen DR. (2003) *Vesicular neurotransmitter transporter expression in developing postnatal rodent retina: GABA and glycine precede glutamate.* J Neurosci., 23(2):518-529.

Kanekar S, Gandham M, Lucero MT. (2010) *PACAP protects against TNFα-induced cell death in olfactory epithelium and olfactory placodal cell lines.* Mol Cell Neurosci., 45(4):345-54.

Kiecker C, Niehrs C. (2001) *A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in Xenopus.* Development, 128(21):4189-201.

Kinkl N, Ruiz J, Vecino E, Frasson M, Sahel J, Hicks D. (2003) *Possible involvement of a fibroblast growth factor 9 (FGF9)-FGF receptor-3-mediated pathway in adult pig retinal ganglion cell survival in vitro.* Mol Cell Neurosci., 23(1):39-53.

Kispert A, Koschorz B, Herrmann BG. (1995) *The T protein encoded by Brachyury is a tissue-specific transcription factor.* EMBO J., 14(19):4763-72.

Kövesdi E, Tamás A, Reglodi D, Farkas O, Pál J, Tóth G, Bukovics P, Dóczi T, Büki A. (2008) *Posttraumatic administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in central fluid percussion injury in rats.* Neurotox Res., 13(2):71-8.

Kumar NM, Gilula NB. (1996) *The gap junction communication channel.* Cell, 84(3):381-8.

Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA Jr, Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA. (2006) *Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis.* Science, 311: 847-851.

Lakk M, Szabó B, Völgyi B, Gábriel R, Dénes V. (2012) *Development-related splicing regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors in the retina.* Invest Ophthalmol Vis Sci., 53(12):7825-32.

Lee BK, Lee DH, Park S, Park SL, Yoon JS, Lee MG, Lee S, Yi KY, Yoo SE, Lee KH, Kim YS, Lee SH, Baik EJ, Moon CH, Jung YS. (2009) *Effects of KR-33028, a novel Na+/H+ exchanger-1 inhibitor, on glutamate-induced neuronal cell death and ischemia-induced cerebral infarct.* Brain Res., 1248:22-30.

Lelièvre V, Pineau N, Du J, Wen CH, Nguyen T, Janet T, Muller JM, Waschek JA. (1998) *Differential effects of peptide histidine isoleucine (PHI) and related peptides on stimulation and suppression of neuroblastoma cell proliferation. A novel VIP-independent action of PHI via MAP kinase.* J Biol Chem., 273(31):19685-90.

Levine AJ, Brivanlou AH. (2006) *GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos.* Development, 133(2):209-16.

Liu J, Wilson S, Reh T. (2003) *BMP receptor 1b is required for axon guidance and cell survival in the developing retina.* Dev Biol., 256(1):34-48.

Lovicu FJ, de Iongh RU, McAvoy JW. (1997) *Expression of FGF-1 and FGF-2 mRNA during lens morphogenesis, differentiation and growth.* Curr Eye Res., 16(3):222-30.

Lu N, Black IB, DiCicco-Bloom E. (1996) *A paradigm for distinguishing the roles of mitogenesis and trophism in neuronal precursor proliferation.* Brain Res Dev Brain Res., 94(1):31-6.

Lu N, DiCicco-Bloom E. (1997) *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an autocrine inhibitor of mitosis in cultured cortical precursor cells.* Proc Natl Acad Sci U S A., 94(7):3357-62.

Lu N, Zhou R, DiCicco-Bloom E. (1998) *Opposing mitogenic regulation by PACAP in sympathetic and cerebral cortical precursors correlates with differential expression of PACAP receptor (PAC1-R) isoforms.* J Neurosci Res., 53(6):651-62.

Lyuksyutova AI, Lu CC, Milanesio N, King LA, Guo N, Wang Y, Nathans J, Tessier-Lavigne M, Zou Y. (2003) *Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling.* Science, 302(5652):1984-8.

Malicki J. (2004) *Cell fate decisions and patterning in the vertebrate retina: the importance of timing, asymmetry, polarity and waves.* Curr Opin Neurobiol., 14(1):15-21.

Mao SS, Hua R, Zhao XP, Qin X, Sun ZQ, Zhang Y, Wu YQ, Jia MX, Cao JL, Zhang YM. (2012) *Exogenous administration of PACAP alleviates traumatic brain injury in rats through a mechanism involving the TLR4/MyD88/NF-κB pathway.* J Neurotrauma., 29(10):1941-59.

Marquardt T, Ashery-Padan R, Andrejewski N, Scardigli R, Guillemot F, Gruss P. (2001) *Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells.* Cell, 105(1):43-55.

Martinez-Morales JR, Signore M, Acampora D, Simeone A, Bovolenta P. (2001) *Otx genes are required for tissue specification in the developing eye.* Development, 128(11):2019-30.

Masuo Y, Tokito F, Matsumoto Y, Shimamoto N, Fujino M. (1994) *Ontogeny of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its binding sites in the rat brain.* Neurosci Lett., 170(1):43-6.

Mawrin C, Pap T, Pallas M, Dietzmann K, Behrens-Baumann W, Vorwerk CK. (2003) *Changes of retinal glutamate transporter GLT-1 mRNA levels following optic nerve damage.* Mol Vis., 9:10-13.

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(13):9749-61.

McKernan DP, Caplis C, Donovan M, O'brien CJ, Cotter TG. (2006) *Age-dependent susceptibility of the retinal ganglion cell layer to cell death.* Invest Ophthalmol Vis Sci., 47(3):807-14.

McPherron AC, Lee SJ. (1993) *GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines.* J Biol Chem., 268(5):3444-9.

Mehler MF, Mabie PC, Zhang D, Kessler JA. (1997*) Bone morphogenetic proteins in the nervous system.* Trends Neurosci., 20(7):309-17.

Meyer DK. (2006) *The effects of PACAP on neural cell proliferation.* Regul Pept., 137(1-2):50-57.

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(1):567-74.

Mizuno N, Kokubu H, Sato M, Nishimura A, Yamauchi J, Kurose H, Itoh H. (2005) *G protein-coupled receptor signaling through Gq and JNK negatively regulates neural progenitor cell migration.* Proc Natl Acad Sci U S A., 102(35):12365-70.

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(1-2):82-8.

Morrow EM, Furukawa T, Lee JE, Cepko CL. (1999) *NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent.* Development, 126(1):23-36.

Murali D, Yoshikawa S, Corrigan RR, Plas DJ, Crair MC, Oliver G, Lyons KM, Mishina Y, Furuta Y. (2005) *Distinct developmental programs require different levels of Bmp signaling during mouse retinal development.* Development, 132(5):913-23.

Nadarajah B, Jones AM, Evans WH, Parnavelas JG. (1997) *Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation.* J Neurosci., 17(9):3096-111.

Nagata S. (2000) *Apoptotic DNA fragmentation.* Exp Cell Res., 256:12-18.

Nagy JI, Rash JE. (2000) *Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS.* Brain Res Rev., 32(1):29-44.

Nakagawa T, Yuan J. (2000) *Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis.* J Cell Biol., 150:887-894.

Nicot A, DiCicco-Bloom E. (2001) *Regulation of neuroblast mitosis is determined by PACAP receptor isoform expression.* Proc Natl Acad Sci U S A., 98(8):4758-63.

Nielsen HS, Hannibal J, Fahrenkrug J. (1998) *Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the postnatal and adult rat cerebellar cortex.* Neuroreport., 9(11):2639-42.

Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, Matsuo I, Furukawa T. (2003) *Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development.* Nat Neurosci., 6(12):1255-63.

Njaine B, Martins RA, Santiago MF, Linden R, Silveira MS. (2010) *Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide controls the proliferation of retinal progenitor cells through downregulation of cyclin D1.* Eur J Neurosci., 32(3):311-321.

Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Shioda S. (2008) *Role of PACAP in ischemic neural death.* J Mol Neurosci., 36(1-3):16-25.

Onoue S, Endo K, Ohshima K, Yajima T, Kashimoto K. (2002) *The neuropeptide PACAP attenuates beta-amyloid (1-42)-induced toxicity in PC12 cells.* Peptides, 23(8):1471-8.

Osakada F, Ooto S, Akagi T, Mandai M, Akaike A, Takahashi M. (2007) *Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals.* J Neurosci., 27(15):4210-9.

Otori Y, Wei JY, Barnstable CJ. (1998) *Neurotoxic effects of low doses of glutamate on purified rat retinal ganglion cells.* Invest Ophthalmol Vis Sci., 39:972-81.

Pantaloni C, Brabet P, Bilanges B, Dumuis A, Houssami S, Spengler D, Bockaert J, Journot L. (1996) *Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation.* J Biol Chem., 271(36):22146-22151.

Peter ME, Krammer PH. (2003) *The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond.* Cell Death Differ., 10:26-35.

Pequignot MO, Provost AC, Salle S, Taupin P, Sainton KM, Marchant D, Martinou JC, Ameisen JC, Jais JP, Abitbol M. (2003) *Major role of BAX in apoptosis during retinal development and in establishment of a functional postnatal retina.* Dev Dyn., 228(2):231-238.

Pereira L, Yi F, Merrill BJ. (2006) *Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal.* Mol Cell Biol., 26(20):7479-91.

Picker A, Brand M. (2005) *Fgf signals from a novel signaling center determine axial patterning of the prospective neural retina.* Development, 132(22):4951-62.

Pilzer I, Gozes I. (2006) *VIP provides cellular protection through a specific splice variant of the PACAP receptor: a new neuroprotection target.* Peptides. 27(11):2867-76.

Prezeau L, Manzoni O, Homburger V, Sladeczek F, Curry K, Bockaert J. (1992) *Characterization of a metabotropic glutamate receptor: direct negative coupling to adenylyl cyclase and involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein.* Proc Natl Acad Sci U S A., 89:8040-4.

Pulido JE, Pulido JS, Erie JC, Arroyo J, Bertram K, Lu MJ, Shippy SA. (2007) *A role for excitatory amino acids in diabetic eye disease.* Exp Diabetes Res., 2007:36150.

Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. (2002) *"Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells.* Science, 298(5593):597-600.

Raoult E, Bénard M, Komuro H, Lebon A, Vivien D, Fournier A, Vaudry H, Vaudry D, Galas L. (2014) *Cortical-layer-specific effects of PACAP and tPA on interneuron migration during post-natal development of the cerebellum.* J Neurochem., 130(2):241-54.

Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM. (2004) *Timing and topography of cell genesis in the rat retina.* J Comp Neurol., 474(2):304-324.

Rácz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Röth E, Tóth G, Hegyi O, Verzál Z, Fabricsek C, Reglódi D. (2007) *Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the PKA-Bad-14-3-3 signaling pathway in glutamate-induced retinal injury in neonatal rats.* Neurotox Res., 12(2):95-104.

Ravni A, Bourgault S, Lebon A, Chan P, Galas L, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez B, Eiden LE, Vaudry D. (2006) *The neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells: control by multiple transduction pathways.* J Neurochem., 98(2):321-9.

Reese BE, Colello RJ. (1992) *Neurogenesis in the retinal ganglion cell layer of the rat.* Neuroscience, 46(2):419-429.

Reese BE, Galli-Resta L. (2002) *The role of tangential dispersion in retinal mosaic formation.* Prog Retin Eye Res., 21(2):153-68.

Reglodi D, Lubics A, Tamás A, Szalontay L, Lengvári I. (2004) *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat modell of Parkinson's disease.* Behav Brain Res., 151(1-2):303-12.

Reuss B, von Bohlen und Halbach O. (2003) *Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system.* Cell Tissue Res., 313(2):139-57.

Ricard N, Ciais D, Levet S, Subileau M, Mallet C, Zimmers TA, Lee SJ, Bidart M, Feige JJ, Bailly S. (2012) *BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodelling.* Blood, 119(25):6162-71.

Rogalińska M. (2002) *Alterations in cell nuclei during apoptosis.* Cell Mol Biol Lett., 7:995-1018.

Rousseau B, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A, Javerzat S. (2003) *Involvement of fibroblast growth factors in choroidal angiogenesis and retinal vascularization.* Exp Eye Res., 77(2):147-56.

Rowan S, Cepko CL. (2004) *Genetic analysis of the homeodomain transcription factor Chx10 in the retina using a novel multifunctional BAC transgenic mouse reporter.* Dev Biol., 271(2):388-402.

Ruchaud S, Korfali N, Villa P, Kottke TJ, Dingwall C, Kaufmann SH, Earnshaw WC. (2002) *Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation.* EMBO J., 21:1967-1977.

Said SI, Dickman K, Dey RD, Bandyopadhyay A, De Stefanis P, Raza S, Pakbaz H, Berisha HI. (1998) *Glutamate toxicity in the lung and neuronal cells: prevention or attenuation by VIP and PACAP.* Ann N Y Acad Sci., 865:226-37.

Salero E, Hatten ME. (2007) *Differentiation of ES cells into cerebellar neurons.* Proc Natl Acad Sci U S A., 104(8):2997-3002.

Sato N, Sanjuan IM, Heke M, Uchida M, Naef F, Brivanlou AH. (2003) *Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse.* Dev Biol., 260(2):404-13.

Scharf E, May V, Braas KM, Shutz KC, Mao-Draayer Y. (2008) *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) regulate murine neural progenitor cell survival, proliferation, and differentiation.* J Mol Neurosci., 36(1-3):79-88.

Schulte-Merker S, Ho RK, Herrmann BG, Nüsslein-Volhard C. (1992) *The protein product of the zebrafish homologue of the mouse T gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo.* Development, 116(4):1021-32.

Schulte-Merker S, van Eeden FJ, Halpern ME, Kimmel CB, Nüsslein-Volhard C. (1994) *no tail (ntl) is the zebrafish homologue of the mouse T (Brachyury) gene.* Development, 120(4):1009-15.

Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE. (2000) *The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily.* Endocr Rev., 21(6):619-70.

Shoge K, Mishima HK, Saitoh T, Ishihara K, Tamura Y, Shiomi H, Sasa M. (1999) *Attenuation by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons.* Brain Res., 839(1):66-73.

Silveira MS, Costa MR, Bozza M, Linden R. (2002) *Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide prevents induced cell death in retinal tissue through activation of cyclic AMP-dependent protein kinase.* J Biol Chem., 277(18):16075-80.

Skoglösa Y, Takei N, Lindholm D. (1999) *Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide mRNA in the developing rat brain.* Brain Res Mol Brain Res., 65(1):1-13.

Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L. (1993) *Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor.* Nature, 365(6442):170-5.

Stumm R, Kolodziej A, Prinz V, Endres M, Wu DF, Höllt V. (2007) *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is up-regulated in cortical pyramidal cells after focal ischemia and protects neurons from mild hypoxic/ischemic damage.* J Neurochem., 103(4):1666-81.

Sucher NJ, Lipton SA, Dreyer EB. (1997) *Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells.* Vision Res., 37: 3483-3493.

Swartz MM, Linn DM, Linn CL. (2013) *Tropisetron as a neuroprotective agent against glutamate-induced excitotoxicity and mechanisms of action.* Neuropharmacology, 73:111-21.

Tamas A, Gabriel R, Racz B, Denes V, Kiss P, Lubics A, Lengvari I, Reglodi D. (2004) *Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium-glutamate.* Neurosci Lett., 372(1-2):110-113.

Tatsuno I, Somogyvari-Vigh A, Arimura A. (1994) *Developmental changes of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor in the rat brain.* Peptides, 15(1):55-60.

Thoreson WB, Witkovsky P. (1999) *Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina.* Prog Retin Eye Res., 18:765-810.

Tomi M, Mori M, Tachikawa M, Katayama K, Terasaki T, Hosoya K. (2005) *L-type amino acid transporter 1-mediated L-leucine transport at the inner blood-retinal barrier.* Invest Ophthalmol Vis Sci., 46:2522-30.

Tomimatsu N, Arakawa Y. (2008) *Survival-promoting activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the presence of phosphodiesterase inhibitors on rat motoneurons in culture: cAMP-protein kinase A-mediated survival.* J Neurochem., 107(3):628-35.

Törocsik B, Szeberényi J. (2000) *Anisomycin affects both pro- and antiapoptotic mechanisms in PC12 cells.* Biochem Biophys Res Commun., 278(3):550-6.

Uchida D, Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Shioda S, Banks WA. (1996) *Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide.* Brain Res., 736(1-2):280-6.

Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Fournier A, Vaudry H. (1999) *Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development.* Proc Natl Acad Sci U S A., 96(16):9415-20.

Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. (2000) *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions.* Pharmacol Rev., 52(2):269-324.

Vaudry D, Falluel-Morel A, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. (2003) *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells.* J Neurosci Res., 72(3):303-16.

Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L és mtsai. (2009) *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery.* Pharmacol Rev., 61(3):283-357.

Vaudry D, Pamantung TF, Basille M, Rousselle C, Fournier A, Vaudry H, Beauvillain JC, Gonzalez BJ. (2002a) *PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis.* Eur J Neurosci., 15(9):1451-60.

Vaudry D, Rousselle C, Basille M, Falluel-Morel A, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. (2002b) *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death.* Proc Natl Acad Sci U S A., 99(9):6398-403.

Villalba M, Bockaert J, Journot L. (1997) *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway.* J Neurosci., 17(1):83-90.

Vincze E, Köves K. (2001) *[Structure, localization and physiologic role of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)].* Orv Hetil., 142(10):491-6.

Vogel-Höpker A, Momose T, Rohrer H, Yasuda K, Ishihara L, Rapaport DH. (2000) *Multiple functions of fibroblast growth factor-8 (FGF-8) in chick eye development.* Mech Dev., 94(1-2):25-36.

Wang X. (2001) *The expanding role of mitochondria in apoptosis.* Genes Dev., 15: 2922-2933.

Wang X, Ng YK, Tay SS. (2005) *Factors contributing to neuronal degeneration in retinas of experimental glaucomatous rats.* J Neurosci Res., 82(5):674-89.

Wawersik S, Purcell P, Rauchman M, Dudley AT, Robertson EJ, Maas R. (1999) *BMP7 acts in murine lens placode development.* Dev Biol., 207(1):176-88.

Webber CA, Hyakutake MT, McFarlane S. (2003) *Fibroblast growth factors redirect retinal axons in vitro and in vivo.* Dev Biol., 263(1):24-34.

Wei LC, Ding YX, Liu YH, Duan L, Bai Y, Shi M, Chen LW. (2012) *Low-dose radiation stimulates Wnt/β-catenin signaling, neural stem cell proliferation and neurogenesis of the mouse hippocampus in vitro and in vivo.* Curr Alzheimer Res., 9(3):278-89.

Wodarz A, Nusse R. (1998) *Mechanisms of Wnt signaling in development.* Annu Rev Cell Dev Biol. 14:59-88.

Yang XJ. (2004) *Roles of cell-extrinsic growth factors in vertebrate eye pattern formation and retinogenesis.* Semin Cell Dev Biol., 15(1):91-103.

10. Köszönetnyilvánítás

Egy tapasztalt és bölcs embertől azt hallottam, hogy a tudomány világába göröngyös, kavicsos és néha nehezen járható út vezet. Azt hiszem, az elmúlt évek tapasztalatai alátámasztják ezt a megállapítást. Ugyanakkor azt is hallottam, hogy a nehézségek legyőzhetőek, főleg ha nem is egy, hanem több olyan ember van, aki ebben támogat…

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek: Dr. Gábriel Róbertnek és Dr. Dénes Viktóriának. Dr. Gábriel Róbertnek mindazért, hogy idejéhez és erejéhez mérten támogatott, irányított és minden lehetőséget biztosított ahhoz, hogy dolgozatom kísérletes munkája gördülékeny lehessen.
Dr. Dénes Viktóriának, aki nem csak az egyetemen eltöltött szakdolgozói és PhD hallgatói lépéseimet irányította és felügyelte, hanem a tudományos világon kívüli életem szerves része is lett. Általa tanulhattam meg azt, hogy az élet minden területén, beleértve a tudományt is:
„ …az a legfontosabb, hogy bízzunk szárnyaink erejében!”

Továbbá szeretném megköszönni Dr. Kemény Ágnesnek, Dr. Seress László professzor úrnak és Dr. Fekete Csaba tanárúrnak, hogy laboratóriumukban helyet és eszközt biztosítottak vizsgálataink elvégzéséhez, valamint Dr. Berta Gergelynek a konfokális mikroszkópizálásban nyújtott kitartó segítségét.
Köszönöm Dr. Pollák Edit tanárnőnek dolgozatom áttekintését és építő kritikáit.
Gödri Zoltánnak a precíz korrektúrát, valamint a kísérletes munkában nyújtott segítségét. Köszönet illeti továbbá Szabó Bence Farkast a labormunkában való segítőkészségéért, valamint a Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék valamennyi dolgozóját, dolgozatom elkészülésében való támogatásukért.

Köszönet és hála páromnak és családomnak, de legfőképpen Édesanyámnak és Édesapámnak, akik egész életemben minden döntésemben támogattak és önzetlenül segítettek álmaim megvalósításában. Remélem, egyszer majd igazán meghálálhatom nekik mindazt, amit értem tettek!

Hála és köszönet legyen a Fentvalónak az elmúlt évek minden nehézségéért, minden könnyéért és minden örömért!

11. Saját publikációs lista

MTMT közlemény és idéző összefoglaló táblázat

Lakk Mónika adatai (2014.10.16.)

Közlemény típusok	Száma		Hivatkozások[1]	
Teljes tudományos közlemények[2]	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikk	5	---	---	---
nemzetközi szakfolyóiratban	---	5	8	10
hazai kiadású szakfolyóiratban idegen nyelven	---	0	0	0
hazai kiadású szakfolyóiratban magyar nyelven	---	0	0	0
II. Könyvek	0	---	---	---
a) Könyv, szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
b) Könyv, szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	[3]---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény folyóiratban vagy konferenciakötetben	1	---	---	---
Idegen nyelvű	---	1	0	0
Magyar nyelvű	---	0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I.-IV.)	6	---	8	10
További tudományos művek[4]	---	1	0	0

Összesített impakt faktor	19,0	---	---	---
Idézetek száma[5]	---	---	8	10
Hirsch index[5]	2	---	---	---

Oktatási művek				
Felsőoktatási tankönyv	0	---	---	---
Idegen nyelvű	---	0	0	0
Magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv része idegen nyelven	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv része magyar nyelven	---	0	0	0
További oktatási művek	0	---	0	0

Oltalmi formák	0	---	0	0

Alkotás	0	---	0	0

Ismeretterjesztő művek				
Könyvek	0	---	0	0
További művek	0	---	0	0

Közérdekű és nem besorolt művek	0	---	0	0

Absztrakt	10	---	0	0

Egyéb szerzőség	0	---	0	0
Idézők disszertációban, egyéb típusban	0	---	0	0

Megjegyzések:

A táblázat számai hivatkozások is. A számra kattintva a program listázza azokat a műveket, amelyeket a cellában összeszámlált.

--- : Nem kitölthető cella

[1] A hivatkozások a disszertáció és egyéb típusú idézők nélkül számolva. A disszertáció és egyéb tipusú idézők összesítve a táblázat végén találhatók.

[2] Teljes tudományos közlemény ebben az adatbázisban:
- Folyóiratcikk : szakcikk/tanulmány, összefoglaló cikk, rövid közlemény, sokszerzős vagy csoportos szerzőségű közlemény, forráskiadás, recenzió/kritika, műkritika, esszé
- Könyv: szakkönyv, monográfia, kézikönyv, tanulmánykötet, forráskiadás, kritikai kiadás, műhelytanulmány, atlasz
- Könyvrészlet: szaktanulmány, fejezet, esszé, forráskiadás, recenzió/kritika, műkritika, műtárgyleírás,
térkép, műhelytanulmány része
- Konferenciaközlemény: folyóiratban, könyvben, egyéb konferenciakötetben megjelent legalább 3 oldal terjedelemben
- Oltalmi formák: szabadalmak, mintaoltalmak (részletek)

[3] Szerkesztőként nem részesedik a könyv idézéséből

[4] Ide értve a teljes közlemények listájában nem szereplő publikációkat, a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent műveket és minden olyan tudományos művet, ami a I.-IV. sorokban nem került összeszámlálásra.

[5] A disszertációk és egyéb tipusú idézők nélkül számolva (részletek)

I. A disszertáció alapjául szolgáló publikációk

Dénes V, **Lakk M**, Czotter N, Gábriel R. (2011) A precise temporal dissection of monosodium glutamate-induced apoptotic events in newborn rat retina *in vivo*. Neurochemical Research. IF: 2.240

Lakk M, Szabó B, Völgyi B, Gábriel R, Dénes V. (2012) Development-related splicing regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors in the retina. IOVS. IF: 3.441

Dénes V, Czotter N, **Lakk M**, Berta G, Gábriel R. (2014) PAC1-expressing structures of neural retina alter their PAC1 isoform splicing during postnatal development. Cell Tissue Res. IF: 3.333

II. Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia előadások és poszterek

Dénes V, **Lakk M**, Gábriel R. (2009) Dissection of apoptotic events and pathways induced by MSG in newborn rat retina. 12th Conference of Hungarian Neuroscience Society (MITT), Budapest, Hungary.

Dénes V, **Lakk M**, Gödri Z, Gábriel R. (2010) Further investigation of MSG induced apoptotic events and the pharmacological time window of PACAP treatment in newborn rat retina. IBRO International Workshop, Pécs, Hungary.

Lakk M, Dénes V, Szabó B, Völgyi B, Gábriel R. (2011) Expression of PACAP receptors (PAC1, VPAC1, VPAC2) during postnatal rat retina development. FAME, Pécs, Hungary.

Lakk M, Dénes V, Gábriel R. (2012) If not adenylate cyclase then phospholipase C: activation of multiple pathways by PACAP to block MSG-induced excitotoxicity. IBRO International Workshop, Szeged, Hungary.

Lakk M, Szabó B, Gödri Z, Gábriel R, Dénes V. (2013) Genes affected by intravitreal administration of PACAP 1-38 and PACAP 6-38 in newborn rat retina. 14th Conference of Hungarian Neuroscience Society (MITT), Budapest, Hungary.

Lakk M, Gödri Z, Gábriel R, Dénes V. (2013) Genes affected by intravitreal administration of PACAP 1-38 in newborn rat retina. II. Interdisciplinary Doctoral Conference, Pécs, Hungary.

Lakk M, Gábriel R, Dénes V. (2013) Intravitreal injection of PACAP1-38 exerts dramatic developmental effects on the newborn rat retina. FENS Featured Regional Meeting, Prague, Czech Republic.

Lakk M, Gábriel R, Dénes V. (2013) A PAC1 receptorhoz kapcsolt jelátviteli útvonalak analízise és a PAC1 izoformák génexpressziós változása a retina ontogenezise során. 18. Magyar Látás Szimpózium, Pécs, Magyarország.

III. Egyéb tudományos közlemények

Dhimolea E, Denes V, **Lakk M**, Aziz-Zaman S, Pilchowska M, Geck P. (2013) Male cell chimerism in the female breast and its quantitative biology in tissue integrity and cancer. International Journal of Cancer. IF: 5.007

Denes V, **Lakk M**, Makarovskiy A, Jakso P, Szappanos S, Graf L, Mandel L, Karadi I, Geck P. (2014) Metastasis blood test by flow cytometry: In vivo cancer spheroids and the role of hypoxia. International Journal of Cancer. IF: 5.007

IV. Egyéb konferencia poszterek

Szabó B, **Lakk M**, Gábriel R, Berta G, Dénes V. (2013) Multiple consequences of blocking PAC1 receptors in the newborn mammalian retina. FENS Featured Regional Meeting, Prague, Czech Republic.

Dénes V, Czotter N, **Lakk M**, Berta G, Gábriel R. (2013) PAC1 expressing structures of the neural retina alter their PAC1 isoform splicing during postnatal development. FENS Featured Regional Meeting, Prague, Czech Republic.

Doktori értekezés benyújtása és nyilatkozat a dolgozat eredetiségéről

Alulírott
név:.....Lakk Mónika.....
születési név:.....Lakk Mónika.....
anyja neve:.....Csonka Katalin.....
születési hely, idő.....Várpalota, 1987.05.14.....
A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid anti-apoptotikus és ontogenetikus hatása a posztnatális patkány retinában.....
című doktori értekezésemet a mai napon benyújtom a(z)
.....PTE TTK, Biológiai Doktori Iskola.....
Doktori Iskola
.....
Témavezető(k) neve
:…….Dr. Gábriel Róbert és Dr. Dénes Viktória.....

Egyúttal nyilatkozom, hogy jelen eljárás során benyújtott doktori értekezésemet
- korábban más doktori iskolában (sem hazai, sem külföldi egyetemen) nem nyújtottam be,
- fokozatszerzési eljárásra jelentkezésemet két éven belül nem utasították el,
- az elmúlt két esztendőben nem volt sikertelen doktori eljárásom,
- öt éven belül doktori fokozatom visszavonására nem került sor,
- értekezésem önálló munka, más szellemi alkotását sajátomként nem mutattam be, az irodalmi hivatkozások egyértelműek és teljesek, az értekezés elkészítésénél hamis vagy hamisított adatokat nem használtam.

Dátum: Pécs, 2014. október 22.

.....
doktorjelölt aláírása