

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola
Szabályozásbiológiai Program

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

PhD értekezés

Lakk Mónika

Témavezetők:

Dr. Gábrriel Róbert
egyetemi tanár

Dr. Dénes Viktória
egyetemi adjunktus

Pécs, 2014

1. Bevezetés

A kifejlődött gerinces retinában 5 főbb réteget különíthetünk el, melyeket különböző típusú sejtek építenek fel. Ez az öt réteg: a külső magvas réteg és a külső rostos réteg, a belső magvas réteg és a belső rostos réteg, valamint a ganglion sejtek rétege. A neonatális retina ugyanakkor csak 3 réteget tartalmaz: a ganglion sejtek réteget, a belső plexiform réteget és a még differenciálódó sejteket tartalmazó neuroblaszt réteget (Bagnoli és mtsai., 2003). A patkány retina ontogenezise során az eltérő sejtípusok fejlődése nem egyidejűleg következik be, így mindegyik sejtípus egy egyedi proliferációs csúccsal jellemezhető (Rapaport és mtsai., 2004). A ganglion, a horizontális sejtek és a csap bipoláris fotoreceptorok embrionálisan, míg az amakrin sejtek, a pálcika fotoreceptorok, valamint a bipoláris és Müller glia sejtek posztnatálisan mutatnak proliferációs csúcsokat (Reese és Colello, 1992; Rapaport és mtsai., 2004). Annak érdekében, hogy a retinában a megfelelő számú sejt kialakuljon, az apoptózis két hullámban következik be a fejlődés során. Főleg a neuroblaszt réteget érintő, első hullám az embrionális korban jelentkezik, míg a második a posztnatális fejlődés kezdetétől a szem kinyílásáig tart (Péquignot és mtsai., 2003). A szinaptogenezis folyamata csak a sejtek túlélését és megfelelő sejtrétegben való megjelenését követően indul meg (Bagnoli és mtsai., 2003).

A szekretin/glukagon/VIP szupercsaládba tartozó hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) két, különböző hosszúságú formában (PACAP 27 és 38) fordul elő (Miyata és mtsai., 1989). Pleiotrópikus regulátor, mely számos biológiai hatással rendelkezik, hormonként/trófikus faktorként, neurotranszmitterként, neuromodulátorként funkcionál (Vaudry és mtsai., 2009). A PACAP 3 különböző receptoron: a PAC1, VPAC1 és VPAC2-n keresztül fejt ki hatását, melyek mindegyike a G protein kapcsolt receptorok családjába tartozik (Gottschall és mtsai., 1990). A PAC1 receptornak a 3. intracelluláris hurokba beépülő, különböző aminosav kazetták alapján 6 izoformáját tudjuk elkülöníteni. Ezek a null, hip, hop1, hop2, hiphop1 és hiphop2, melyek eltérő szignálmechanizmussal rendelkeznek. A null, a hop1 és a hop2 az adenilát-cikláz (AC) és foszfolipáz-C (PLC) útvonalat, míg a hip főleg az AC útvonalat aktiválja. A hiphop1 és 2 izoformákat intermedier fenotípus jellemzi (Dickson és Finlayson, 2009).

A PACAP és receptorainak korai, embrionális expressziója arra utal, hogy szerepet tölthet be az ontogenezisben pl. stimulálja a sejtproliferációt, sejt differenciációt, sejt migrációt, valamint a szinaptogenezist és plaszticitást (Blechman és Levkowitz, 2013). Erős anti-

apoptotikus hatása következtében a neurotoxicitás kutatásának középpontjában van (Dejda és mtsai., 2008).

Az apoptózisnak 2 útvonalát írták le számos élőlényben: a plazmamembrán halálreceptorainak aktivációjával induló extrinszik, valamint a mitokondrium, vagy ER felől induló intrinszik útvonal (Wang, 2001). Az apoptotikus folyamatok kulcsmolekulái a caspase enzimek, melyek az elsőként aktiválódó iniciátor caspase-okra (pl. caspase 9, 12) és az általuk aktivált effektor caspase-okra oszthatók (caspase 3, 6, 7) (Boatright és Salvesen, 2003).

Az L-glutamát fontos szerepet játszik a retina normál fiziológiai folyamataiban, azonban emelkedett koncentrációban képes excitotoxikus sejthalált, apoptózist indukálni (Otori és mtsai., 1998; Chen és mtsai., 2001). Ennek következtében széles körben alkalmazzák az L-glutamátot, vagy nátriumsóját (nátrium-glutamátot, MSG) neurodegenerációs modellek létrehozásában (Choi és Rothman, 1990).

2. Problémafelvetés és célkitűzések

1. Jól definiált az irodalomban a PACAP, MSG indukálta retinális degenerációkban *in vivo* érvényesülő anti-apoptotikus hatása (Tamás és mtsai., 2004). Azonban a hatás háttérében álló, PACAP által aktivált jelátviteli útvonalak azonosítása neonatális patkány retinában tisztázásra vár. Ezért a kísérletek során szeretnénk 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; Njaine és mtsai., 2010). Mindezek ellenére a posztnatális fejlődés során megjelenő PAC1 receptor és izoformáinak leírása patkány retinában, valamint ezek expressziós mintázatának meghatározása hiányos. Ezért célul tűztük ki a patkány retinában expresszálandó PAC1 receptor izoformák azonosítását és expressziójuk mennyiségi változásainak meghatározását a posztnatális fejlődés során:

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

3. Szintén bizonyított a PACAP sejtproliferációra, sejt differenciációra és sejt növekedésre 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 összejt PCR array használatával,
- b. a PCR array eredményének pontosítása további gének vizsgálatával és azok expressziós mintázatának leírásával, valamint a génexpressziós változások fehérjeszinten történő megerősítése,
- c. a retina struktúrájában, valamint a retinális sejt populációkban, PACAP kezelés hatására bekövetkező változások detektálása P0-P5 fejlődési stádiumban.

3. Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok, kezelések, szövetpreparálás

A kísérletekhez albínó Wistar patkányok használtunk. A kezelések során az állatok egyik csoportja szubkután (s.c) MSG-t, vagy 0,9%-os fiziológiás sóoldatot, valamint intravitrealisan (i.v) 0,5 µg/µl PACAP-ot (100 pmol), 20-100 nmol AC-blokkolóként használt DDA-t, 5-10 µmol foszfatidilkolin-specifikus PLC inhibitor D609-et, 5-10 nmol foszfatidilinozitol-specifikus PLC inhibitor ET-18-OCH₃-at, illetve 100 pmol adenilát-cikláz aktivátorként ismert forskolint kaptak különböző kombinációban. A másik kísérleti csoport i.v kezelésként 100 pmol PACAP1-38-at, míg a kontroll csoport s.c és i.v 0,9%-os fiziológiás sóoldatot kapott. A retinákat az egyes kísérleti felállásnak megfelelő időpontokban távolítottuk el és RNS vagy protein extrakciót végeztünk a szövetekből.

RNS extrakció, reverz transzkripció, polimeráz lánc reakció (PCR), kvantitatív RT-PCR

A teljes RNS kivonást és tisztítást RNeasy Plus Mini Kit segítségével végeztük. A reverz transzkripció során 2 µg RNS-t használtunk a cDNS szintéziséhez. A PCR specifitásának növelése érdekében touchdown-PCR-t alkalmaztunk, melyek során a 25 µl-es reakcióelegyekbe 4 µl cDNS-t, 50 nM forward primert, 50 nM reverz primert és megfelelő mennyiségű Maxima Hot Start Master Mix-et mértünk össze.

Az RT-PCR reakciók futtatását SteponePlus RT-PCR gépen végeztük, melyekben a reakciómixek 2-3 µg cDNS mintát, 5 µM forward primert, 5 µM reverse primert és SYBR PCR Master Mix-et tartalmaztak. Az utóbbi technikánál minden mintából 3, párhuzamos

reakciót futtattunk. A normalizáció érdekében, endogén kontrollként RPL13a-t és LacD-t használtunk. A génexpressziós különbségeket $\Delta\Delta C_t$ módszer segítségével határoztuk meg. A változásokat minden gén esetében a kontroll mintákban mért értékekhez viszonyítottuk.

Fehérjék mennyiségi változásainak analízise

A fehérje kivonása során hipotóniás, vagy radioimmunprecipitációs assay (RIPA) lízis puffert használtunk. A mintákat standardizáltuk, beállítva a koncentrációjukat 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -es értékre. Az előkészített fehérjemintákat 4-12% NuPAGE gradiens, illetve 10, 12% poliakrilamid gélen futtattuk meg, majd a fehérjéket PVDF membránra transzferáltuk. A proteineket specifikus primer- és torma peroxidáz-konjugált másodlagos antitestekkel jelöltük a megfelelő hígításban. Normalizációs kontrollként anti- β -tubulin és anti-GAPDH antitesteket használtunk. A kemilumineszcens szignált Western Lightning Chemiluminescence Plus reagensek segítségével, FluorChem Q Imaging System gépben detektáltuk. A mennyiségi összehasonlításhoz AlphaView Q Software-t alkalmaztunk.

Morfológiai változások detektálása

A szemserlegek kipreparálását, fixálását (4%-os PFA + 1% glutár-aldehid), víztelenítését és műgyantába való beágyazását követően félvékony metszeteket (2-5 μm) készítettünk ultramikrotóm segítségével. A metszeteken - toluidin-kék festést követően - morfometriai méréseket végeztünk.

Immuncitokémiai vizsgálatok során a retinákat 4%-os PFA oldatban fixáltuk, majd ezt követően 10-12 μm vastagságú kriosztátos metszeteket vagy teljes retina preparátumot készítettünk. A változást szenvedett sejtpopulációk azonosítására specifikus sejtmakereket használtunk (Calbindin: horizontális sejt, Chx10: bipoláris sejt, HPC-1: amakrin sejt). Az immunjelölés során a penetrációnövelés és blokkolás után specifikus primer antitestekkel inkubáltunk. Az antigén/antitest reakciót fluoreszcens festékekkel jelölt másodlagos antitestek (anti-egér-IgG-448; anti-birka-IgG-568) segítségével tettük láthatóvá. A mintákat Olympus FV-1000 konfokális lézer szkennings fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

4. Eredmények és megvitatásuk

PACAP által aktivált szignáltranszdukciós útvonalak

Vizsgálatainkban a posztnatális 1. napon (P1) végeztük el a kezeléseket. Kutatócsoportunk korábbi eredményei kimutatták, hogy 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), ezért a PACAP hatását és az apoptotikus enzimek szintjét

ebben a kísérleti időpontban vizsgáltuk meg. Eredményeink kimutatták, hogy az i.v PACAP1-38 meggátolta a s.c injektált MSG excitotoxikus hatását, ugyanis az aktív caspase 3 és 9 szintje a kontrollban mért érték alá csökkentett. Az AC inhibitor, DDA 20 és 100 nmol koncentrációban történő együttes alkalmazása a PACAP1-38-al hasonló eredményt mutatott, nem változtatta meg az apoptotikus enzim kontrollhoz viszonyított mennyiségét. Tehát az AC útvonal kiiktatása ellenére a PACAP ki tudta fejteni anti-apoptotikus hatását.

A protein-kináz A (PKA) mennyiségének vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az i.v PACAP1-38 1, 3, illetve 6 órával a kezeléseket követően sem tudta szignifikánsan megemelni az aktív PKA szintjét. A ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szintben bekövetkező változások vizsgálata során kimutattuk, hogy a cAMP szint 1 órával a kezeléseket követően szignifikánsan megemelkedett mind a fiziológias sóoldat/forskolin, mind a MSG/forskolin együttes adása esetén, mely pozitív kontrollként bizonyítja a kezelés hatékonyságát. Ugyanakkor a fiziológias sóoldat/PACAP1-38, valamint az MSG/PACAP1-38 kombinációja során a cAMP szintje nem haladta meg a kontrollban mért értékeket. A többi vizsgálati időpontban (2h, 3h, 4h, 5h) lényeges változásokat egyik kezelés esetében sem tapasztaltunk.

A következő kísérletekben különböző koncentrációjú és típusú PLC blokkolót használtunk, hogy kiderítsük a PACAP esetleges aktiváló hatását a PLC útvonalra. A foszfatidilinozitol-specifikus PLC inhibitor ET-18-OCH₃ nem tudta kivédeni a PACAP anti-apoptotikus hatását, ugyanakkor a foszfatidilkolin-specifikus PLC inhibitor D609CAS hatásosnak bizonyult. A PACAP1-38 és D609CAS 10 és 5 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.

Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a 100 pmol PACAP alkalmazása esetén az AC/cAMP/PKA útvonal nem, csak a PLC kapcsolt kaszkád aktiválódik a PACAP anti-apoptotikus hatásának kifejtésében, MSG indukálta neurodegeneráció esetén.

A PAC1 receptor és izoformáinak azonosítása és génexpressziós változása a fejlődés során

A vizsgálatokhoz újszülött (P0), valamint P1, P3, P5, P10, P15 és P20 napos patkányok kezeletlen retináit távolítottunk el az állatokból. A touchdown-PCR futtatások segítségével 4 PAC1 izoforma: a null, hip, hop1, hiphop1 jelenlétét bizonyítottuk.

A relatív mennyiségi változások meghatározását lehetővé tevő RT-PCR futtatások során először olyan primert alkalmaztunk, mely minden PAC1 splice variáns kimutatására alkalmas. A PAC1 receptor transzkripció szintje, a P1 napon mért kismértékű növekedés kivételével lényeges változást egyik időpontban sem mutatott.

Kísérleteink következő csoportjában az egyes izoformák önmagukhoz viszonyított változását detektáltuk a fejlődés különböző időpontjaiban. 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. A hop1 variáns expressziója ezzel szemben a fejlődés P5 napjáig lényeges növekedést nem tapasztaltunk, azonban az ezt követő időpontokban markáns, statisztikailag szignifikáns emelkedést detektáltunk egészen a P20 stádiumig. A hiphop1 esetében egyéni expressziós profilt figyeltünk meg, ugyanis a P10 napon mért nagymértékű, de nem szignifikáns növekedés kivételével változást nem tudtunk kimutatni.

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 értéként.

Az eredmények azt mutatták, hogy a fejlődés kezdeti szakaszában (P0 és P1) a hip izoforma expresszálódik a legnagyobb mennyiségben. Ez a jelenség a P10 stádium környékére megváltozik, ugyanis a hop1 izoforma felváltja a hip-et. A hop1 statisztikailag szignifikáns növekedést mutatott a későbbi (P15 és P20) fejlődési időpontokban is. A null izoformához képest a hiphop1 lényeges változást egyik stádiumban sem mutatott.

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 western blott futtatáson három sávot különíthettünk el. A legfelső sávban, a legnagyobb mérettel (75 kDa) rendelkező izoforma, a hiphop1 valószínűsíthető. A hiphop1-nél kisebb hip és hop1 splice variánsok azonos protein mérettel rendelkeznek, így a második sávban voltak megfigyelhetőek. A legkisebb aminosav hosszúsággal jellemezhető Null izoforma a harmadik sávban, jóval a 75 kDa alatt jelentkezett. A futtatások során normalizációs kontrollként a 37 kDa-nál detektálható GAPDH-et használtuk.

Eredményeink génexpressziós és fehérjeszinten is kimutatták, hogy a PAC1 receptor izoformák specifikus expressziós mintázatot vesznek fel a fejlődés során, mely jelzi a folyamat irányításában betöltött szerepüket.

PACAP1-38 kezelés hatására bekövetkező morfológiai változások

A morfológiai vizsgálatokat 5 napos retinákon végeztük el, melyek P1 és P3 korban i.v PACAP1-38 kezelést kaptak. 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. A morfometriai vizsgálataink azonban kimutatták, hogy a két időpontban megismételt i.v PACAP1-38 injekció hatására az NBL vastagságában növekedés következett be a teljes retina vastagságához viszonyítva. A három egyedben mért értékekből számolt átlagos növekedés 2,65 % volt. Ugyanakkor az NBL-re vonatkozó mérésekkel ellentétesen az IPL vastagságában átlagosan 2,69 %-os csökkenést tudunk detektálni. A metszeteken végzett sejtszámolás eredményei azt mutatták, hogy a kétszeres PACAP1-38 kezelést kapott egyedekben (n=3) az átlag sejtszáma $13,17 \pm 1,3$ db/100 μ m, míg a kontrollokban mért sejtek átlaga $15,02 \pm 1,51$ db/100 μ m volt. Ez a változás szignifikáns, 14,05%-os csökkenést jelent.

Immuncitokémiai vizsgálatok során a változást szenvedett sejtpopulációk azonosítására specifikus sejtmarkereket használunk. A horizontális sejtek festésére alkalmas calbindin jelöléseknél azt tapasztaltuk, hogy a kezelt mintákban a sejtek arborizációja alulfejlett és a nyúlványok rövidebbek. Ezzel szemben a kontrollban megfigyelhető, gazdag nyúlványrendszer nemcsak horizontális, hanem vertikális irányba is kiterjedt. Az arborizáció csökkenésével párhuzamosan a sejtek száma megemelkedett a PACAP kezelt mintákban.

Az amakrin sejtek jelölésére alkalmas HPC-1 antitesttel végzett vizsgálatok esetében a sejtszalag vastagságában figyeltünk meg különbséget. A kezelt retinákban a HPC-1 pozitív terület az IPL határán szélesebb sáv formájában jelent meg a kontroll mintákhoz képest. A migráló és az INLben rendeződő bipoláris sejtek, valamint az NBL határán lévő progenitor sejtek jelölésére szolgáló Chx-10 antitesttel végzett vizsgálatok során a kezelt mintákban lévő Chx-10 pozitív progenitor sejtek számának növekedését figyeltük meg. A migráló sejtek száma ugyanakkor alacsonyabb volt a kezelt mintákban.

Az eredmények arra engednek következtetni, hogy a PACAP a horizontális és amakrin sejtek képződését serkenti, míg a GCL-ben sejtszám csökkenést idéz elő. Összegezve a fenti eredményeket, bizonyítottuk, hogy a PACAP jelentős hatással bír a posztnatális fejlődésre a retinális sejtek számának és differenciációjának szabályozása által.

PACAP1-38 kezelés hatására bekövetkező expressziós változások

A vizsgálatokhoz P1 korú állatokat használtunk. A retinák eltávolítását a PACAP1-38 kezelést követő 3., 6., 12., valamint 24. órában végeztük el. A vizsgált géneket - az irodalmi

adatokra hivatkozva - a neurális és nem-neurális szövetek fejlődésében legjelentősebb szerepet betöltő génekből válogattuk ki.

A szimmetrikus/aszimmetrikus sejtosztódásért (Dhh) felelős gének, valamint a sejtadhéziós molekulák (Acan, Cd44, L1CAM) egy időpontban sem mutattak expressziós változást, míg a proteoszóma komplex elemei közül a Cull1, valamint a sejtmegejülésért felelős marker Neurog1 csak egy vizsgálati időpontban mutatott kismértékű expressziós változást. Ezen eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a PACAP kezelés nem befolyásolja a sejtadhéziót, valamint a sejtek kommunikációját és migrációját.

A fibroblaszt növekedési faktorok közül vizsgált Fgf1 expressziós szintje a 6, valamint a 12 órás kezelések során egy fokozatos növekedési mintázatot mutatott. Ezt a változást fehérjeszinten is tudtuk detektálni, ugyanis a protein mennyiségében mind 12, mind 24 óra elteltével emelkedést figyelhattunk meg.

A neuronok túlélését és differenciációját szabályozó gének közül a Bmp4, Bmp9 és Gdf3 expresszióját vizsgáltuk meg. A Bmp4 esetében a kontrollhoz hasonló értéket detektáltunk 3 órával a kezeléseket követően, míg a 6 és 12 órás vizsgálatokban fokozatos, statisztikailag szignifikáns növekedést mutatott. 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 esetében 3, valamint 12 óra elteltével tudunk szignifikáns növekedést detektálni, míg 6 óra elteltével nagymértékű csökkenést mutatott. A fehérje mennyiségében a génexpresszióhoz hasonló változásokat tapasztaltunk, 12 óra elteltével csökkenést, míg 24 óra elteltével lényeges növekedést figyeltünk meg.

A sejt-sejt kommunikációt szabályozó gének közül a Gjb1 transzkripciója mutatott mindhárom időpontban lényeges emelkedést, ugyanakkor a Gjb1 protein mennyisége egyik vizsgálati időpontban sem mutatott számottevő változást.

A PACAP1-38 az embrionális sejt vonal markerekre is hatást gyakorolt. A transzkripciós faktorként ismert Nanog gén már 3 órával a kezeléseket követően markáns növekedést mutatott, amelyet a 6 órás mintákban egy erőteljes csökkenés követett. A T gén hasonló változásokat produkált a 3 és 6 órás vizsgálatokban, ugyanakkor a 12 órás kezelések esetében expressziós szintje jóval a kontroll érték fölé emelkedett.

Az ontogenetikus folyamatokban esszenciális szereppel bíró szignálmolekula, a Wnt1 expressziója a PACAP1-38 injekciót követő mindhárom vizsgálati időpontban lényeges emelkedést mutatott. Ugyanakkor fehérjeszinten csak a 12 órás kezelések során figyeltünk meg emelkedést.

A retinális sejtdifferenciációs markerek fontos részét képezik a vizsgált géneknek, ugyanis lényeges szerepet töltenek be a sejtek elköteleződésében és differenciálódásában. Az elvégzett kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a Mash1 expressziójában kismértékű, de szignifikáns növekedés következett be 3, valamint 12 óra elteltével. A ganglion sejtek differenciációját jelző Math5 esetében a 6 és 12 órás vizsgálatokban tudunk növekedést detektálni. Az expresszióban mértékhez hasonlóan, fehérjeszinten mind a 12 órás, mind a 24 órás kezelések során lényeges mennyiségi növekedést mutatott. A Dlx2 3 és 12 órával a PACAP1-38 injekciót követően mutatott nagymértékű, szignifikáns emelkedést. A két időpont között azonban lényeges csökkenés volt megfigyelhető az mRNA expressziójában. A 12 órás kezelésekben a fehérje mennyisége közel azonos volt a kontrollban mértékhez, míg a 24 órás mintákban számottevő növekedést detektáltunk. Az Otx2 gén expressziója 6 és 12 óránál is növekedést mutatott. A Dlx1, NeuroD1 és Chx10 esetében egyik vizsgálati időpontban sem tudunk változást mérni.

Eredményeinkből egyértelműen látszik, hogy a PACAP1-38 kezelés hatására a sejtproliferációt elősegítő (Fgf1, Bmp4, Gdf3), pluripotens állapotot fenntartó (Nanog, T, Wnt1), valamint a ganglionsejtek differenciációjáért felelős faktorok (Math5, Dlx2) nemcsak génszinten, hanem fehérjeszinten is emelkedést mutatnak. A szekretált morfogénekre (pl: Fgf1, Bmp4, Gdf3, Wnt1) gyakorolt hatás arról árulkodik, hogy a PACAP nemcsak közvetlenül azokra a sejtekre fejti ki hatását, melyek PAC1 receptorral rendelkeznek, hanem képes közvetett úton is hatást gyakorolni más, esetleg PAC1 receptorral nem rendelkező sejtekre.

5. Felhasznált irodalom

- 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.
- 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, Salvesen GS. (2003) *Mechanisms of caspase activation*. *Curr Opin Cell Biol.*, 15: 725-731.
- 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.
- Choi DW, Rothman SM. (1990) *The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death*. *Annu Rev Neurosci.*, 13:171-82.
- 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.
- Dickson L, Finlayson K. (2009) *VPAC and PAC receptors: From ligands to function.* *Pharmacol Ther.*, 121(3):294-316.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- Péquignot 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.
- 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.
- Reese BE, Colello RJ. (1992) *Neurogenesis in the retinal ganglion cell layer of the rat.* *Neuroscience*, 46(2):419-429.
- 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.
- 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.
- 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.
- Wang X. (2001) *The expanding role of mitochondria in apoptosis.* *Genes Dev.*, 15: 2922-2933.

I. A disszertáció alapjául szolgáló publikációk

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

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

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

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

Lakk M, Szabó B, Gödri Z, Gábrriel R, Dénes V. 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, 2013. (poszter)

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

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

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

Dénes V, **Lakk M**, Berta G, Gábrriel R. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) a novel secretagogue in the postnatal retinal development affects horizontal and bipolar cell differentiation. 9th FENS Forum of Neuroscience, Milan, 2014. (poszter)

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**, Gábrriel R, Berta G, Dénes V. Multiple consequences of blocking PAC1 receptors in the newborn mammalian retina. FENS Featured Regional Meeting, Prague, 2013. (poszter)

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

Összesített impakt faktor: 19

Független idézetek száma: 8