

XXXI. OTDK Biológia Szekció

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) által regulált gének azonosítása az újszülött patkány retinában

Szabó Bence Farkas

Biológia-kémia tanári BSc

III. évfolyam



Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék

Témavezető: Dr. Dénes Viktória és Prof. Dr. Gábrriel Róbert

Pécs, 2013

Tartalomjegyzék

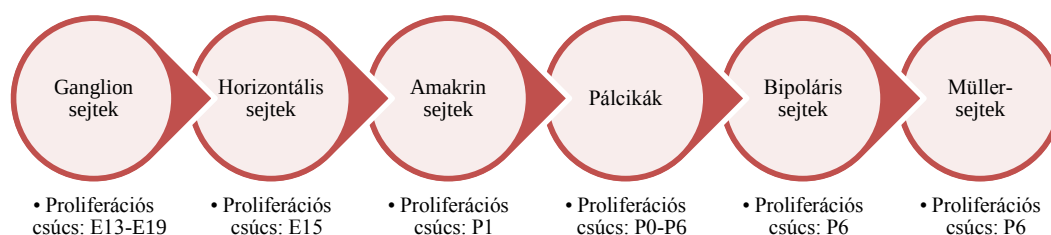
Tartalomjegyzék.....	- 1 -
1. Bevezető.....	- 3 -
1.1. A patkány retina fejlődésének összefoglalása	- 3 -
1.2. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) általános jellemzése	- 5 -
1.3 A PACAP idegrendszerben betöltött szerepe.....	- 6 -
1.4. A PACAP receptorok és előfordulásuk az emlős idegrendszerben.....	- 7 -
1.4.1 VPAC1 és VPAC2 receptorok	- 8 -
1.4.2. PAC1 receptor izoformák jellemzése	- 8 -
2. Célkitűzések	- 10 -
3. Anyag és módszer	- 11 -
3.1 Kísérleti állatok	- 11 -
3.2 Génexpressziós vizsgálatok.....	- 11 -
3.2.1 Kísérleti állatok kezelése.....	- 11 -
3.2.2 Szövet preparálás.....	- 11 -
3.2.3 RNS extrakció és RNS koncentráció meghatározása	- 11 -
3.2.4 Reverz transzkripció – cDNS szintézis	- 12 -
3.2.5 Kvantitatív real-time PCR	- 12 -
3.2.6 Dokumentáció és kiértékelés	- 14 -
3.3 Morfológiai vizsgálatok	- 14 -
3.3.1 Kísérleti állatok kezelése.....	- 14 -
3.3.2 Retina preparálás	- 14 -
3.3.3 Félvékony metszetek készítése.....	- 15 -
3.3.4 Dokumentáció és kiértékelés	- 15 -
4. Eredmények.....	- 17 -
4.1 PACAP6-38 kezelés hatására bekövetkező génexpressziós változások.....	- 17 -
4.1.1 Fibroblaszt növekedési faktorok (Fgf) mRNS szintjeinek változásai PACAP6-38 kezelés hatására.....	- 18 -
4.1.2. Növekedési differenciációs faktorok (Gdf) családjába tartozó gének mRNS szintjeinek változásai PACAP6-38 kezelés hatására	- 18 -
4.1.3. Szimmetrikus/aszimmetrikus sejtosztódásért felelős gének mRNS szintjeinek változásai PACAP6-38 kezelés hatására	- 19 -
4.1.4 Wnt1 mRNS szintjének változása PACAP6-38 kezelés hatására	- 19 -

4.1.5. Embrionális sejtvonal markerek mRNS szintjeinek változásai PACAP6-38 kezelés hatására	- 20 -
4.1.6. Proteoszóma elemek mRNS szintjeinek változásai PACAP6-38 kezelés hatására	- 20 -
4.1.7. Sejtadhéziós molekulák mRNS szintjeinek változásai PACAP 6-38 kezelés hatására	- 21 -
4.1.8. Sejt-sejt kommunikációt szabályozó gének mRNS szintjeinek változásai PACAP6-38 kezelés hatására	- 21 -
4.1.9. Sejt megújulásért felelős markerek mRNS szintjeinek változásai PACAP6-38 kezelés hatására	- 22 -
4.1.10 Retinális sejt differenciációs markerek mRNS szintjeinek változásai PACAP6-38 kezelés hatására	- 22 -
4.2 Morfológiai vizsgálatok	- 23 -
5. Eredmények értékelése	- 26 -
5.1 A PAC1 receptorok által szabályozott gének	- 27 -
5.1.1 PACAP6-38 kezelés hatására változást nem mutató gének	- 27 -
5.1.2 PACAP6-38 kezelés hatására tranziens/átmeneti változást mutató gének	- 27 -
5.1.3 PACAP6-38 kezelés hatására konzisztens változást mutató gének	- 28 -
5.1.3.1. Szekréciós faktorok expressziójának változásai	- 28 -
5.1.3.2. Embrionális sejtvonal markerek génjeinek változásai	- 29 -
5.1.3.3. Retinális sejt típusok differenciációját irányító gének változásai	- 29 -
5.2 Morfológiai vizsgálatok	- 30 -
6. Összefoglalás	- 31 -
7. Irodalom	- 32 -
8. Köszönetnyilvánítás	- 37 -

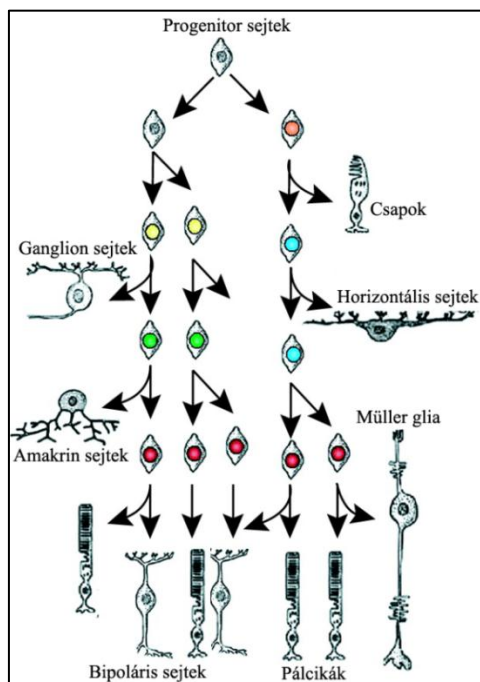
1. Bevezető

1.1. A patkány retina fejlődésének összefoglalása

A bonyolult felépítésű emlős retina kifejlődése több lépésből áll. A retinális sejtek funkcionális egységbe való rendeződése több, egymást időben átfedő folyamat eredménye (sejtosztódás, apoptózis, sejtmigráció, arborizáció, szinaptogenezis), melyek szabályozásába rengeteg intrinszik és extrinszik faktor vesz részt. A fejlődő szem ventrikuláris zónájában helyet foglaló progenitor sejtekből 7 különböző sejtípus alakul ki. A sejtípusok születése párhuzamosan történik, de mindegyik sejtípus jól jellemezhető, egyedi sejtosztódási csúccsal rendelkezik (Morrow és mtsai., 1998; Morrow és mtsai., 2008; Rapaport és mtsai., 2004; Reese és Colello, 1992). A retinát felépítő sejtfeleségeket és azok megjelenését a 1. ábra és a 2. ábra foglalja össze.

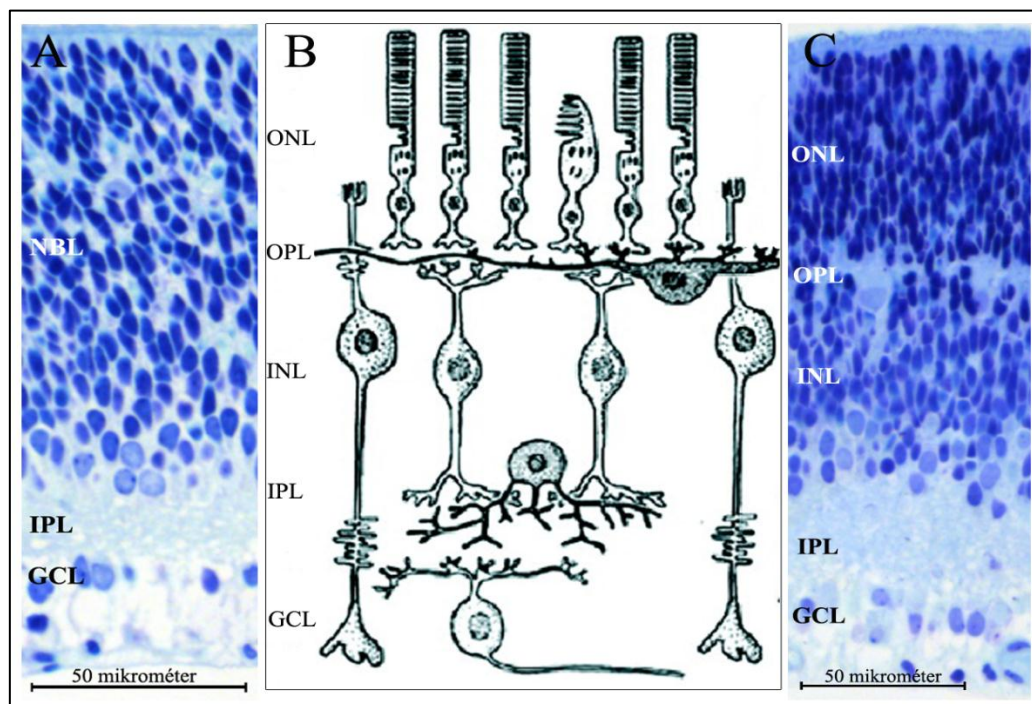


1. ábra. A patkány retina sejtípusai és proliferációs csúcsaik. E=embrionális, P=posztnatális



2. ábra. A retinális progenitor sejtek fejlődése és a differenciált sejtípusok kialakulása a retinogenezis során (Dyer, 2004).

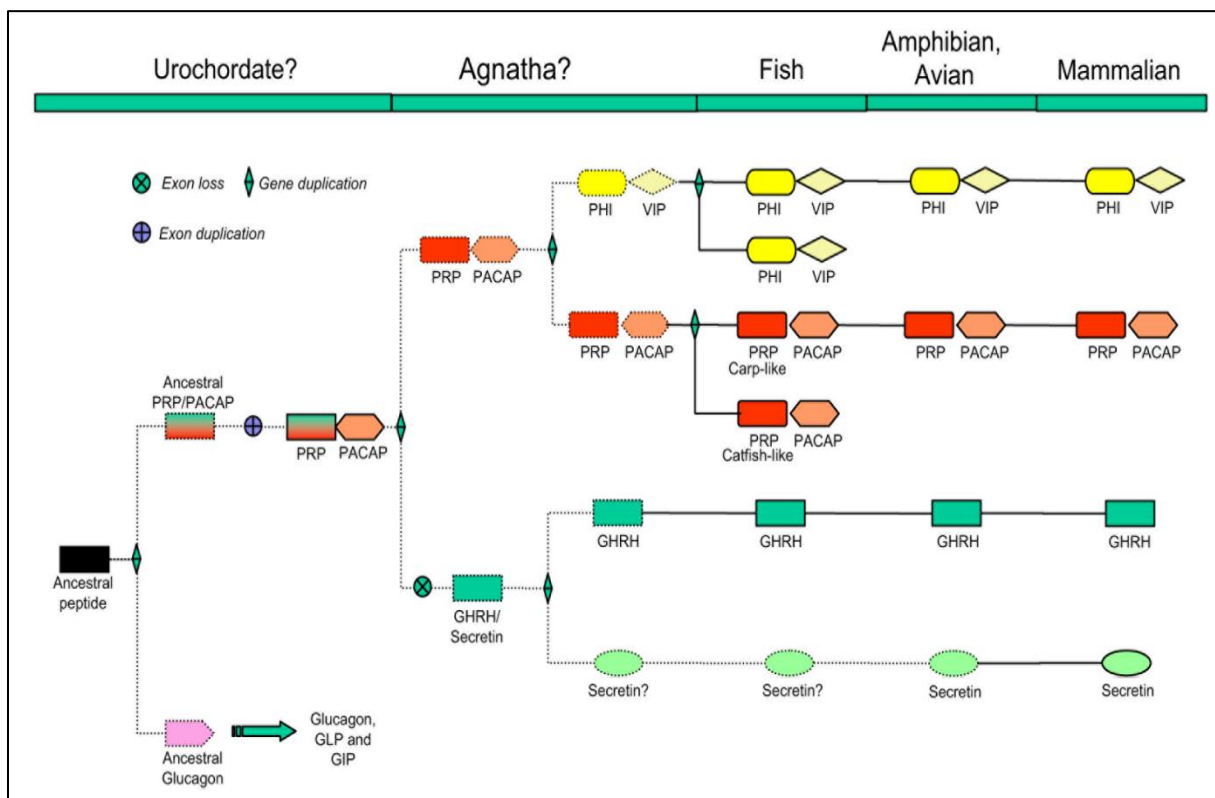
A sejttípusok kialakulásával párhuzamosan az újonnan keletkezett posztmitotikus sejtek a ventrikuláris zónából radiális és tangenciális vándorlással a neuroblaszt réteg (NBL) megfelelő területére vándorolnak (3./A ábra) (Cook és Chalupa, 2000; Reese és Galli-Resta, 2002). A megfelelő sejtszám eléréséhez a posztmitotikus sejtek egy része apoptózison megy keresztül. Az apoptózis első hulláma a megszületés előtt, az embrionális retinában megy végbe (Pequignot és mtsai., 2003). A második hullám az első posztnatális héten zajlik, P3 és P7 között. Ezzel párhuzamosan a túlélő sejtekben megindul az axonnövekedés, az arborizáció, melynek következtében kialakul a retina belső rostos rétege (IPL), valamint a külső rostos réteg (OPL) (Galli-Resta és Ensini, 1996; Perry és mtsai., 1983; Webster és Rowe, 1991). A további fejlődés során P7-nél az IPL-ben megjelennek a szinapszisok és a szinaptikus vezikulák, valamint megindul a szinaptikus jelátvitelhez szükséges receptorok, transzporterek és szinaptikus fehérjék expressziója. A retinális sejtek funkcionális egységbe való rendeződése P10 és P15 között történik meg. (Grunder és mtsai., 2000; Johnson és mtsai., 2003; Sassoe-Pognetto és Wassle, 1997; Vu és mtsai., 2000; Webster és Rowe, 1991) A felnőtt retinával megegyező morfológiai jelek már P10-nél megfigyelhetők, de a retina teljes kifejlődése P21-re fejeződik be. (Fletcher és Kalloniatis, 1997; Johansson és mtsai., 2000; Sassoe-Pognetto és Wassle, 1997) A posztnatális fejlődés végére az előbb említett folyamatok eredményeképp, a kifejlett retinában a következő rétegeket tudjuk elkülöníteni: retinális pigment epithélium (RPE), külső sejt réteg (ONL), OPL, belső sejt réteg (INL), INL és a ganglion sejt réteg (GCL) (3./B és C ábra).



3. ábra. A retina sturktúrája P5 korban (A) és P10 korban (C), valamint a retina sematikus szerkezete (B) (C ábrarészlet Nyisztor Zsolt munkája)

1.2. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) általános jellemzése

A PACAP1-38 egy 38 aminosavból álló peptid, melynek felfedezését egy japánokból és amerikaiakból álló kutatócsoport publikálta 1989-ben. A felfedezők megfigyelték, hogy patkány hipofízis sejtjeiből létrehozott sejt kultúrához adva a PACAP1-38 nagymértékben stimulálta a sejtek adenilát-cikláz (AC) aktivitását. Az AC útvonal aktiválásán keresztül a PACAP a növekedési hormon, a prolaktin és a kortikotropin hormonok szekrécióját váltotta ki (Miyata és mtsai., 1989). Az előbb leírt tulajdonságok miatt és a szerkezeti homológiából következően a PACAP1-38 a VIP/szekretin/glukagon peptid szupercsaládba került besorolásra. Későbbi kutatások kimutatták, hogy a PACAP az evolúció során igen korán, már a fejgerinchúrosokban (4. ábra) is megjelenik és szerkezetére nagyfokú konzerváltság jellemző (McRory és Sherwood, 1997; Sherwood és mtsai., 2000; Vaudry és mtsai., 2009) (5. ábra).



4. ábra. A VIP/szekretin/glükagon peptidcsalád kialakulása a filogenezis során.
Urochordate=Előgerinchúrosok, Agnatha=Állkapocs nélküliek, Fish=Halak, Amphibian=Kétéltűek,
Avian=Madarak, Mammalian=Emlősök (Vaudry és mtsai., 2009).

Human, Cattle, Sheep, Pig, Mouse, Rat, Guinea pig	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQRVKNK	100 %
Chicken	-I-----	97 %
Lizard	-----	100 %
Frog	-----I--	97%
Lungfish	-----K-----	97%
Goldfish-a	-----R-----	97%
Goldfish-b	-----R--I--	95%
Salmon	-----R--YR--	92 %
Catfish	-----R--R--FR--	89 %
Stargazer, Flounder, Halibut	-----Q-----R--R--R--	89 %
Whitefish, Grayling	-----R--YRS-	89%
Sturgeon	-----E-----R--R--	92%
Stingray	-----PK-R-SGRRVFY	89 %
Tunicate 1	-----N-----	96 % with PACAP27
Tunicate 2	-----N-----IN-L-	85 % with PACAP27

5. ábra. A PACAP aminosav szekvenciája különböző fajokban. Human=ember, Cattle=marha, Sheep=juh, Pig=sertés, Mouse=egér, Rat=patkány, Guinea pig=tengeri malac, Chicken=csirke, Lizard=gyík, Frog=béka, Lungfish=tüdőshal, Goldfish=aranyhal, Salmon=lazac, Catfish=harcsa, Stargazer=csillagvizsgálgóhal, Flounder=lepényhal, Halibut=lepényhal, Whitefish=maréna, Grayling=pér, Sturgeon=tokhal, Stingray=rája, Tunicate=zsákállat. (Vaudry és mtsai., 2009).

A PACAP széleskörű biológiai hatásokkal rendelkezik és az egész szervezetben általánosan előfordul. Befolyásolja a cirkadián ritmust és a hipofízis hormontermelését. A pajzsmirigyben fokozza a tiroxin termelést, részt vesz az ivarsejtek érési folyamatában, valamint befolyásolja a nemi mirigyek és a mellékvese hormontermelését. Az emésztőrendszer esetében szerepet kap a nyál és a gyomorsav elválasztásában, szabályozó fehérjék termelésében továbbá a bélmotilitásban. Befolyásolja a hasnyálmirigy inzulin és glukagon termelését. A légzőrendszerben bronchodilatátorként, a keringési rendszerben vazodilatátorként hat. A csontképződési folyamatokban is részt vesz. A PACAP a tumorsejtekre kifejtett szerteágazó hatásának köszönhetően a rákkutatásban is reflektorfénybe került (stimulálja vagy gátolja a sejtproliferációt, fokozza a hormontermelést, apoptózist gátol) (Vaudry és mtsai., 2009).

1.3 A PACAP idegrendszerben betöltött szerepe

A központi és környéki idegrendszer működésében a PACAP hormonnként, trofikus faktorként és neurotranszmitterként kap szerepet (Vaudry és mtsai., 2009). Elsőként erős anti-apoptotikus hatását ismerték fel, így a neurodegenerációs kutatások középpontjába került

(Dejda és mtsai., 2008). Etanol kezeléssel kialakított neurodegeneratív kórkép (axonnövekedés elmaradása, fokozott apoptózis) esetén, a kísérleti rendszerbe az alkohol mellé PACAP-ot adagolva az apoptotikus folyamatokat jelző kaszpázok szintje csökkent (Vaudry és mtsai., 2002). *Ischaemia* által kiváltott neurodegeneráció esetén a hippocampusban a PACAP csökkentette az apoptózist jelző mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) család tagjainak szintjét (Dohi és mtsai., 2002). Nátrium-glutamát által kiváltott retinadegeneráció esetén a PACAP koncentrációfüggő módon csökkentette a retina anatómiájában bekövetkezett patológiás elváltozásokat (Tamas és mtsai., 2004).

A neurodegeneratív modellekben megfigyelt hatásai mellett fontos figyelmet szentelni a PACAP intakt szervezetben betöltött fiziológiai funkcióinak. A PACAP és receptorai számos élőlényben (madár, zebradánió, patkány) expresszálódnak az ontogenezis során, ami a fejlődésben betöltött fontos szerepére enged következtetni (Alexandre és mtsai., 2011). A PACAP receptorok patkány agyban egyedi expressziós mintázattal rendelkeznek, mind az embrionális, mind a posztnatális fejlődés során (Basilie és mtsai., 1993). Számos eredmény igazolta már, hogy a PACAP hat a sejtproliferációra, a sejt differenciációra, az apoptózisra és az idegnyúlványok fejlődésére. Patkány kisagy szemcsesejtjein kimutatták, hogy a PACAP hosszantartó jelenléte fokozza az axonnövekedést és a sejtek túlélését (Vaudry és mtsai., 1998), valamint fokozza a patkány kisagyi neuroblasztjainak nyúlványképzését, ugyanakkor az apoptózisra gátlólag hat (Gonzalez és mtsai., 1997). Egerek agyi progenitor sejt kultúráitól megvonva a növekedési faktorokat, PACAP adásával emelkedik a túlélő és aktív osztódást végző sejtek száma, viszont gátolt a sejtek differenciációja (Scharf és mtsai., 2008). Patkányok perifériális szimpatikus neuroblasztjaiban a PACAP fokozza a sejtproliferációt, míg az agykérgi neuroblasztok szaporodását gátolja (Lu és mtsai., 1998). Látható, hogy a PACAP változatos feladatokat tölt be a központi idegrendszer sok területén, mégis a PACAP retina fejlődésében betöltött szerepéről nagyon kevés tudományos adat áll rendelkezésünkre. Az eddigi kutatási eredmények azt mutatják, hogy a PACAP és receptorai már a retina fejlődésének korai embrionális szakaszában megjelennek. Korai posztnatális korban receptorai jellemző anti-proliferatív hatást közvetítenek (Njaine és mtsai., 2010).

1.4. A PACAP receptorok és előfordulásuk az emlős idegrendszerben

Az emlős szervezetben előforduló PACAP receptorok a 7 transzmembrán doménnel rendelkező receptorok csoportjába tartoznak. A PACAP által kifejtett eltérő, esetenként ellentétes fiziológiás hatások, a PACAP receptorok nagyfokú diverzitásával magyarázhatók. A PACAP - a vele 68%-os homológiát mutató - VIP-el azonos affinitással kötődik a VPAC1

és VPAC2 receptorokhoz (VPAC1-R, VPAC2-R), viszont annál százszor nagyobb affinitással kötődik a PAC1 receptorhoz (PAC1-R) (Gottschall és mtsai., 1990; Harmar és mtsai., 1998; Lam és mtsai., 1990). A PACAP hatásának specifikus gátlására több antagonistát kifejlesztettek, ezek közül a leghatékonyabb és legelterjedtebb a PACAP6-38 (Robberecht és mtsai., 1992). Több kísérleti modellben sikeresen alkalmazták a PACAP hatásának blokkolására (Erhardt és mtsai., 2005; Hollosy és mtsai., 2004; Reglodi és mtsai., 2003).

1.4.1 VPAC1 és VPAC2 receptorok

A VPAC1-R jelenlétét elsősorban a tüdőben, a vékonybélben, a csecsemőmirigyben, az agykéregben és a hippocampusban írták le. A VPAC2-R a gyomorban, a nemiszervekben, a hasnyálmirigyben és a hipotalamuszban fordul elő (Usdin és mtsai., 1994). Hatásukat az AC útvonalon keresztül fejtik ki (Vaudry és mtsai., 2009). Munkacsoportunk kimutatta a VPAC1-R és a VPAC2-R expresszióját az emlős retinában, ahol a VPAC1 mRNS szintje fokozatos emelkedést mutatott a posztnatális fejlődés 15. napjáig (P15), míg a VPAC2 transzkripciója csak P15-nél emelkedett meg. Érdekes módon a receptor fehérje mennyisége nem korrelál ezzel a változással, hanem az egész posztnatális fejlődés alatt (P0-P20) azonos mértékben szintetizálódik. Ez az ellentmondásos eredmény a poszttranszlációs módosulás, illetve a receptor gyors celluláris degenerációjának folyamatával magyarázható (Lakk és mtsai., 2012).

1.4.2. PAC1 receptor izoformák jellemzése

Patkány esetében a PAC1-R 6 különböző izoformával rendelkezik, ezek: a Null, a Hip, a Hop1, a Hop2, a Hiphop1 és a Hiphop2. A különböző izoformák a harmadik intracelluláris hurok felépítésében különböznek. Ebben a pozícióban 3 fehérjekazetta különböző kombinációi alakítják ki az izoformákat, melyek eltérő szignál transzdukciós útvonalakat aktiválhatnak. A receptorok felépítését az 1. táblázat tartalmazza.

Receptor izoforma neve	Receptor izoforma felépítése
PAC1-R-null	495 AS
PAC1-R-hip	495 AS + 28 AS (hip kazetta)
PAC1-R-hop1	495 AS + 28 AS (hop1 kazetta)
PAC1-R-hop2	495 AS + 27 AS (hop2 kazetta)
PAC1-R-hiphop1	495 AS + 28 AS (hip kazetta) + 28 AS (hop1 kazetta)
PAC1-R-hiphop2	495 AS + 28 AS (hip kazetta) + 27 AS (hop2 kazetta)

1. táblázat. Az emlős szervezetben előforduló harmadik intracelluláris hurok felépítésében különböző PAC1-R izoformák. AS=aminosav

A Null, Hop1 és Hop2 izoforma, mind az AC, mind a foszfolipáz-C (PLC) útvonalat aktiválja, míg a Hip kizárólag az AC útvonalat. A Hiphop1 és Hiphop2 izoformák esetében köztes hatást tapasztalhatunk (Dickson és Finlayson, 2009). Az eddigiekben bemutatott izoformák mellett még létezik egy short és egy very short izoforma is, melyek az N-terminális felépítésében különböznek a Null izoformától és nincsenek jelen a patkány retinában (Dickson és Finlayson, 2009; Harmar és mtsai., 1998; Pantaloni és mtsai., 1996). Emiatt a PACAP hatásának pontos megértéshez - ismernünk kell, hogy a vizsgált rendszer esetében - mely PAC1-R izoformák expresszálódnak.

A korábbi irodalomban találunk adatokat arra nézve, hogy patkány retinában kimutattak PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptorokat (Bagnoli és mtsai., 2003). A PAC1 receptor esetében 4 izoforma van jelen a retinában. Ezek a Null, a Hip, a Hop1 és a Hiphop1, melyek egyedi expressziós mintázatot mutatnak a posztnatális retinafejlődés során. A Null és a Hip izoforma expressziója a fejlődés során csökken. A Hop1 izoforma expressziója nagymértékben nő, míg a Hiphop1 izoforma expressziója P10-nél mutat egy átmeneti maximumot. P1 és P5 időpont között mind a 4 izoforma előfordul a retinában, de közülük a Hip és a Hop1 mennyisége domináns (Lakk és mtsai., 2012).

2. Célkitűzések

Vizsgálataink célja az volt, hogy a PAC1 receptorok korai, posztnatális retinafejlődésben betöltött szerepéről információt szerezzünk. Ennek érdekében PAC1 receptor antagonistá *in vivo* injektálását követően:

1. Real-time PCR segítségével meghatároztuk a PAC1 receptorok által szabályozott gének expressziós változását:
 - 3 órával az injektálást követően
 - 6 órával az injektálást követően
2. Félvékony metszeteken megvizsgáltuk a retina struktúrájában bekövetkező változásokat:
 - a retina rétegeinek egymáshoz viszonyított arányában bekövetkező változásokat
 - a sejtek számában bekövetkező változásokat.

Mindezen célok kivitelezéséhez kvantitatív molekuláris biológiai és rutin szövettani technikákat alkalmaztunk.

3. Anyag és módszer

3.1 Kísérleti állatok

A kísérletekhez saját tenyészetből származó albínó Wistar patkányokat használtunk. Az állatok normál tartási körülmények között, normál takarmányon felnevelt, mindkét nembeli példányok voltak. A vizsgálatokat P1 és P5 korú állatokon végeztük.

3.2 Génexpressziós vizsgálatok

3.2.1 Kísérleti állatok kezelése

A kezelés megkezdése előtt a P1 korú állatokat Forane-nal (Abbott Laboratories Ltd., Queenborough) altattuk. Az egyik csoport (3-4 állat) egyszeri alkalommal $5\mu\text{l}$ $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (2,5 nmol) koncentrációjú fiziológiás sóoldatban oldott PACAP6-38-at (SZTE-ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet, Szeged) kapott üvegtestbe injektálva (intravitrealisan). A kontroll csoport (3-4 állat) ugyanezzel a módszerrel, ugyanekkora térfogatú fiziológiás sóoldatot kapott. Az intravitrealis injektálást Hamilton fecskendő és 31G-s tű segítségével kivitelezttünk.

3.2.2 Szövet preparálás

Mind a kísérleti, mind a kontroll csoport egyedei esetében 3 vagy 6 órával a kezelést követően végeztük a retinák izolálását. Az egyedeket Forane segítségével elaltattuk, majd dekapitáltuk. Ezután a szemeket eltávolítottuk és dietilén-pirokarbonáttal (DEPC) RNáz mentesített foszfát puffer és fiziológiás sóoldat elegyében (PBS, pH=7,2; 0,9% NaCl) helyeztük. A retinákat ezt követően eltávolítottuk a szemből és szárazjégen fagyasztottuk.

3.2.3 RNS extrakció és RNS koncentráció meghatározása

A minták homogenizálását 21G-s tű és fecskendő segítségével, illetve QIAshredder (QIAGEN) alkalmazásával végeztük. A teljes RNS kinyerését RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) segítségével végeztük, mely egyben alkalmas volt a genomikus DNS eltávolítására is. Az így nyert oldatok RNS koncentrációját spektrofotométerrel (Eppendorf Biophotometer plus) mértük meg 260 nm-en. A fehérjeszennyezés megállapításához az abszorbanciát 280 nm-en, is megmértük. A 260/280 arány minden esetben 2,0 körül mozgott.

3.2.4 Reverz transzkripció – cDNS szintézis

Reakciónként 2 µg RNS mintát használtunk fel 75 µl-es reakció végtérfogat esetén. A reakciókhoz 7,5 µl 10x RT puffert (Thermo Scientific), 3 µl 5 µM oligodT-t (Thermo Scientific), 1,5 µl 0,1M DTT-t (Sigma Aldrich), 3 µl 2,5 mM dNTP-t (Thermo Scientific), 1,5 µl 50 unit/µl H⁻ Revert Aid reverz transzkriptázt (Thermo Scientific), valamint a 75 µl-es végtérfogat eléréséhez szükséges RNáz mentes desztillált vizet (Thermo Scientific) mértünk össze. A cDNS szintézis a 2. táblázatban található program szerint történt.

1. lépés	2. lépés	3. lépés	4. lépés	5. lépés
65°C	25°C	37°C	50°C	80°C
5 perc	10 perc	10 perc	20 perc	3 perc

2. táblázat. A reverz transzkripció programja

3.2.5 Kvantitatív real-time PCR

A génexpresszió meghatározásához a kontroll mintákat (minimum 3 állat) egyenlő arányban összekevertük, hogy kiküszöböljük az egyedi varianciákat. Minden gén esetében 3 párhuzamos reakciót, úgynevezett triplikátumot állítottunk be. A reakcióelegyek végtérfogata 20 µl volt. Összetétele: 3 µl cDNS minta, 6 µl RNáz mentesített desztillált víz (Thermo Scientific), 0,5 µl forward primer (0,1mM), 0,5 µl reverse primer (0,1mM), 10 µl 2x SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific). A reakciókat StepOnePlus Real-Time PCR rendszer (Applied Biosystems) segítségével futtattuk. A PCR programot a 3. táblázat tartalmazza.

1. lépés	•95°C •10 perc •DNS polimeráz aktiváció
2. lépés	•94°C •15 másodperc •polimeráz láncreakció során képződött kettős szálú DNS molekulák denaturációja
3. lépés	•54-60°C •20 másodperc •primerek leköötődése a cDNS-hez (annealing)
4. lépés	•72°C •20 másodperc •DNS polimerizáció és a kettős szálú DNS szakaszok létrejötte (extenzió)
Ismétlés 2.-4.	•a második lépéstől a negyedik lépésig a folyamat negyvenszer ismétlődött, amely biztosította a DNS exponenciális felszaporítását

3. táblázat. A kvantitatív real-time PCR programja

A vizsgált szekvencia mennyiségének időbeli változását SYBR Green módszer segítségével vizsgáltuk. A SYBR Green festéket - a kettős szálú DNS molekulába való beépülését követően - 497 nm-es fénnel megvilágítva, 520 nm-es fényt emittál. A fényemissziót az extenzió szakaszában mérve és a ciklus függvényében ábrázolva görbét kapunk, mely nagy pontossággal reprezentálja a DNS polimerizáció során keletkező termék mennyiségének időbeli változását. A real-time PCR-hoz használt primereket a 4. táblázat tartalmazza.

Forward primerek	Szekvencia	Reverz primerek	Szekvencia
R_Acan_F	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC	R_Acan_R	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC
R_Btrc_F	TTGATGACAAGTACATCGTTTCTG	R_Btrc_R	CAGGTACTTGTGTTCCACACCT
R_Cd44_F	GGTGGTTTCGACACTGTGACT	R_Cd44_R	CCACTGTCTTGATTTCCACTT
R_Shh_F	GGACCGCAGCAAGTATGG	R_Shh_R	GCCACGGAGTTCTCTGCT
R_Fgf2_F	TCTTCCTGCGCATCCATC	R_Fgf2_R	GCTTGGAGCTGTAGTTTGACG
R_Fgf4_F	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC	R_Fgf4_R	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC
R_Fgf8_F	CAGGTCCTGGCCAACAAG	R_Fgf8_R	GTATCGGTCTCCACAATGAGC
R_Fgf9_F	CGGTACTATCCAGGGAACCA	R_Fgf9_R	CAGGCCCACTGCTATACTGAT
R_Gja1_F	AGCCTGAACTCTCATTTTTCTT	R_Gja1_R	CCATGTCTGGGCACCTCT
R_Gjb1_F	GAGAAGAGCGACCGATGC	R_Gjb1_R	GTGAGGGAGGGGTTGGAT
R_Bmp9_F	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC	R_Bmp9_R	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC
R_Msx1_F	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC	R_Msx1_R	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC
R_Mash1_F	CTGGGAATGGACTTTGGAAG	R_Mash1_R	TGACGTCGTTGTCAAGAAACA
R_Math5_F	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC	R_Math5_R	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC
R_NeuroD1_F	GCAGAAGGCAAGGTGTCC	R_NeuroD1_R	TTTGGTCATGTTTCCACTTCC
R_Neurog1_F	CTCGGGGAGCACCCCTTAC	R_Neurog1_R	CAGGTATCCCTCCCCTCTTTA
R_Nanog_F	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC	R_Nanog_R	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC
R_Oct4_F	CCTGCAGCAGATCACTAGCAT	R_Oct4_R	CACTCGAACCACATCCCTCT
R_Dlx1_F	GGGACTCACACAGACTCAGGT	R_Dlx1_R	CCTTGCTTCATCAGCTTCTTG
R_Dlx2_F	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC	R_Dlx2_R	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC
R_Chx10_F	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC	R_Chx10_R	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC
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_MMP7_F	ATGCCAGGAACAGAGACGAG	R_MMP7_R	CATGAGTGGCAACAAACAGG
R_MMP9_F	TCCGCAGTCCAAGAAGATTT	R_MMP9_R	AGCCTAGCCCCAACTTATCC
R_Skp1_F	CGCCTGAGGAGATTCGTAAA	R_Skp1_R	CACACCACTGGTTCTCTTTGC
R_L1CAM_F	CCCATGAAAGACGAGACCTT	R_L1CAM_R	TGCCTAGGGGTTTGATGTCT
R_Gjd2_F	GTGGCAGTGGTGGGAGCAA*	R_Gjd2_R	TGCTGTGCGCAGCCCAGAT*
R_Gjc1_F	GGGTCTTCTCCTCCCCGCTTT*	R_Gjc1_R	GCCAGTCCCCGAGGACCAAA*
R_RPL13a_F	CTCATGAGGTCGGGTGGAAGTA	R_RPL13a_R	TGGGTTTCACACCAAGAGTCC

4. táblázat A kvantitatív real-time PCR során használt primerek szekvenciái. Pirossal a belső kontrollként használt primer. (A csillaggal jelölt primerek Dr. Völgyi Béla és Kovács-Öller Tamás ajándékai)

3.2.6 Dokumentáció és kiértékelés

Az eredmények kiértékeléséhez a StepOnePlus PCR rendszerhez mellékelt StepOne szoftvert használtuk. Endogén kontroll (RPL13a) alkalmazásával a $\Delta\Delta CT$ módszer segítségével határoztuk meg a kontroll mintákhoz képest bekövetkező expressziós változásokat. A cycle threshold értékek (ciklusküszöb, CT) leolvasását követően, a következő képlettel tudtuk meghatározni a $\Delta\Delta CT$ értékeket:

$$CT_{KE,VG}-CT_{VE,VG}-CT_{VE,EK}-CT_{KE,EK}=\Delta\Delta CT \quad (1)$$

$CT_{KE,VG}$ =a kontroll egyed vizsgált gén esetében mért ciklusküszöb

$CT_{VE,VG}$ =a vizsgált egyed vizsgált gén esetében mért ciklusküszöb

$CT_{VE,EK}$ =vizsgált egyed endogén kontroll gén esetében mért ciklusküszöb

$CT_{KE,EK}$ =kontroll egyed endogén kontroll gén esetében mért ciklusküszöb

Az így kapott $\Delta\Delta CT$ értékeket a következő egyenletbe helyettesítve kaptuk meg az expressziós változásokat:

$$\text{Fold change (expressziós változás)}=2^{\Delta\Delta CT} \quad (2)$$

Az 1-es egyenlet alapján, a kontroll minták esetében a gének $\Delta\Delta CT$ értéke mindig 0. Ezt behelyettesítve a 2-es egyenletbe 1-et kapunk, így az ábrázolt expressziós változás értéke azt mutatja meg számunkra, hogy egy génnek az mRNS terméke a kontroll egyedhez képest hányszorosára nőtt vagy hányad részére csökkent. Az expressziós változások statisztikai analizisét független minták T próbájával végeztük.

3.3 Morfológiai vizsgálatok

3.3.1 Kísérleti állatok kezelése

Minden kezelés előtt az állatokat Forane-nal altattuk. A kísérleti állatok az egyik szemükbe intravitrealisan 5 μ l 2 μ g/ μ l (2,5 nmol) PACAP6-38-at, másik szemükbe 5 μ l fiziológiás sóoldatot kaptak. A kísérlet ilyen módon önkontrollos lett. A kezelést kétszer végeztük el, P1 és P3 korban.

3.3.2 Retina preparálás

A retinák preparálását - a két kezelést követően - P5 korban végeztük el. Az egyedeket Forane segítségével elaltattuk, majd dekapitáltuk. Ezután a szemeket eltávolítottuk és a

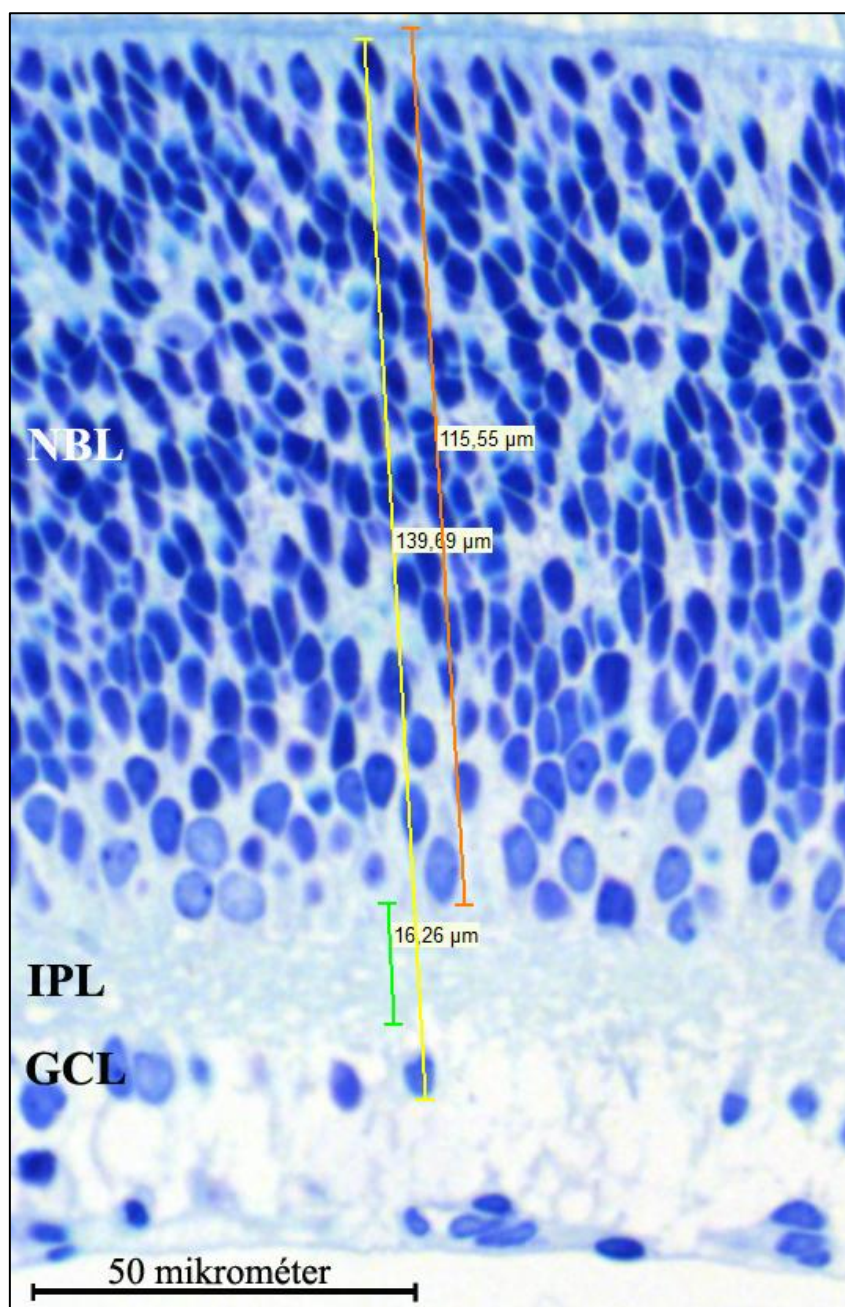
szaruhártyát, szemlencsét eltávolítva szemserleg preparátumot készítettünk. A szemserlegeket 4% paraformaldehidet és 1% glutár-aldehidet tartalmazó oldatba helyeztük, melyben egy éjszakán át, 4°C-on fixálódtak.

3.3.3 Félvékony metszetek készítése

A paraformaldehidből a mintákat kivéve ötször 10 percig mostuk PBS-ben (pH=7,2; 0,1M). A szemserlegeket 15-15 perces lépésekben 30%-os, 50%-os, 70%-os és 90%-os felszálló alkohol soron vittük végig, majd háromszor 20 perces 100%-os alkoholban történő inkubációval fejeztük be a víztelenítést. A mintákat propilén-oxidban (Sigma-Aldrich) kétszer 15 percet derítettük, majd propilén-oxid - műgyanta (Durcupan ACM, Sigma-Aldrich) 1:1 térfogatarányú elegyében újabb 3 órán át inkubáltuk. A szövetminták ezt követően szobahőmérsékleten egész éjszakára tiszta műgyantába kerültek. A következő napon a mintákat friss műgyantával feltöltött blokktartókba helyeztük és 56°C-on, termosztátban másfél napon át hagytuk polimerizálódni. A szemserlegek beágyazásánál mindig ugyanazt az irányelvet követtünk, azaz 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 beágyazott mintákból ultramikrotóm 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.

3.3.4 Dokumentáció és kiértékelés

A metszeteket Mirax Desk szkennelrel (Carl Zeiss, Németország) digitalizáltuk és a továbbiakban az adatok kezelését a Panoramic viewer (3Dhistech) szoftver segítségével végeztük. A digitális anyagon morфомetriás méréseket végeztünk. A morфомetriai mérések elvégzésekor mindig a centrális retinákat hasonlítottuk össze a kontroll és kezelt szemben. A mérések során lemértük a teljes retina vastagságát (ez a külső és belső határoló membrán távolságát jelentette, OLM-ILM), az NBL vastagságát és az IPL vastagságát (6. ábra). Minden szem esetében legalább 10 metszeten végeztük el a méréseket, amelyek legalább 30 μm távolságra estek egymástól. Meghatároztuk az IPL és az NBL teljes retina vastagsághoz viszonyított arányát és ezeket az értékeket hasonlítottuk össze az antagonistával kezelt szem és a fiziológiás sóoldattal kezelt szem esetében. A szignifikancia megállapítását független minták T-próbájával végeztük el.



6. ábra. Morfometriai mérések P5 patkány retinán. Sárga vonal OLM-ILM távolság, narancsszínű vonal NBL vastagsága, zöld vonal IPL vastagsága.

4. Eredmények

4.1 PACAP6-38 kezelés hatására bekövetkező génexpressziós változások

Vizsgálataink során 32 gén expressziójának változását vizsgáltuk. Ezeket a géneket az 5. táblázat tartalmazza, funkcionális csoportokba foglalva. Vizsgálatainkat a fejlődő retina egy olyan stádiumában végeztük, amelyben a sejtek nagy része még multipotens, összejszerű állapotban van. Ezért a vizsgált géneket a neurális és nem-neurális szövetek fejlődésében legjelentősebb szerepet betöltő génekből válogattuk ki, az irodalmi adatokra támaszkodva.

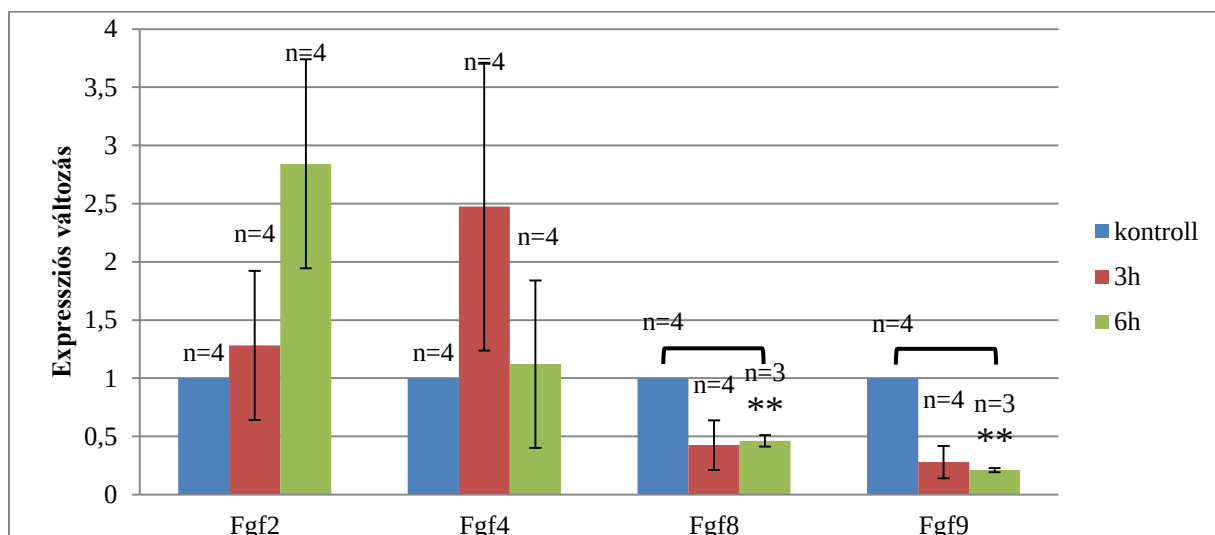
Funkció	Vizsgált gének	Rövidített elnevezés
Proteoszóma komplex elemei	S-phase kinase-associated protein	Skp1
	Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase	Btrc
Szimmetrikus/aszimmetrikus sejtosztódásért felelős gének	Sonic hedgehog	Shh
Sejt megújulásért felelős markerek	Neurogenin 1	Neurog1
Citokinek és növekedési faktorok	Fibroblast growth factor 2, 4, 8, 9	Fgf2, Fgf4, Fgf8, Fgf9
	Bone morphogenetic protein 9	Bmp9
	Growth differentiation factor 3	Gdf3
Sejtdhéziós molekulák	Aggrecan	Acan
	Cd44	Cd44
	Matrix metalloproteinase 7, 9	Mmp7, Mmp9
	L1 cell adhesion molecule	L1CAM
Sejt-sejt kommunikációt szabályozó gének	Gap junction protein, alpha 1, beta 1, delta2, gamma1	Gja1, Gjb1, Gjd2, Gjc1
Embrionális sejt vonal 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 sejt differenciációs markerek	Distal-less homeobox 1, 2	Dlx1, Dlx2
	Visual system homeobox 2	Chx10
	Orthodenticle homeobox 2	Otx2
	Neurogenic differentiation 1	NeuroD1
	Atonal homolog 7	Math5
	Achaete-scute complex homolog 1	Mash1

5. táblázat. Vizsgált gének neve és konvencionális rövidítésük.

Követve az elfogadott irányelveket a génexpresszió kontroll egyedhez viszonyított kétszeres növekedését vagy felére csökkenését tekintettük változásnak.

4.1.1 Fibroblaszt növekedési faktorok (Fgf) mRNS szintjeinek változásai PACAP6-38 kezelés hatására

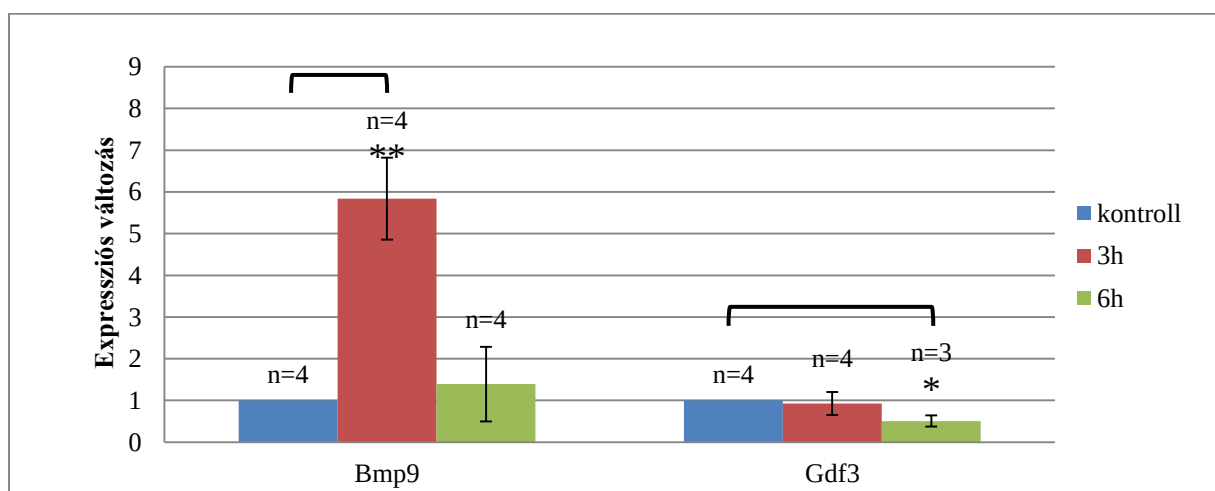
Az Fgf-ek közül 3 óra elteltével egyedül az Fgf4 mutatott egy nem szignifikáns növekedést. A 6 órai méréseknél az Fgf2 ($2,84 \pm 1,79$) mRNS szintje mutatott egy markáns, de statisztikailag nem szignifikáns emelkedést, az Fgf4 ($1,12 \pm 1,44$) szintje nem változott, míg az Fgf8 ($0,46 \pm 0,1$) és az Fgf9 szintje ($0,21 \pm 0,04$) szignifikánsan csökkent a kontroll mintákhoz képest (7. ábra).



7. ábra. Az Fgf-ek génexpressziós változása a kezelést követő harmadik és hatodik órában. *= $P \leq 0,1$; **= $P \leq 0,05$

4.1.2. Növekedési differenciációs faktorok (Gdf) családjába tartozó gének mRNS szintjeinek változásai PACAP6-38 kezelés hatására

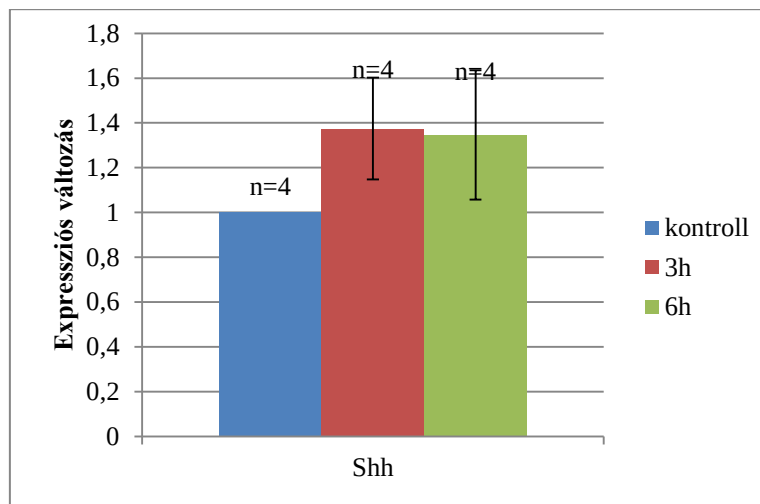
A Gdf-ek közül 3 óra elteltével a Bmp9 ($5,84 \pm 1,97$) szintje nőtt, a Gdf3 ($0,93 \pm 0,55$) szintje nem változott. Hat óra elteltével a Bmp9 ($1,39 \pm 1,79$) szintje nem változott a Gdf3 ($0,51 \pm 0,27$) szintje pedig csökkenést mutatott a kontroll mintához képest (8. ábra).



8. ábra. A Gdf-ek génexpressziós változása a kezelést követő harmadik és hatodik órában. *= $P \leq 0,1$; **= $P \leq 0,05$;

4.1.3. Szimmetrikus/aszimmetrikus sejtosztódásért felelős gének mRNS szintjeinek változásai PACAP6-38 kezelés hatására

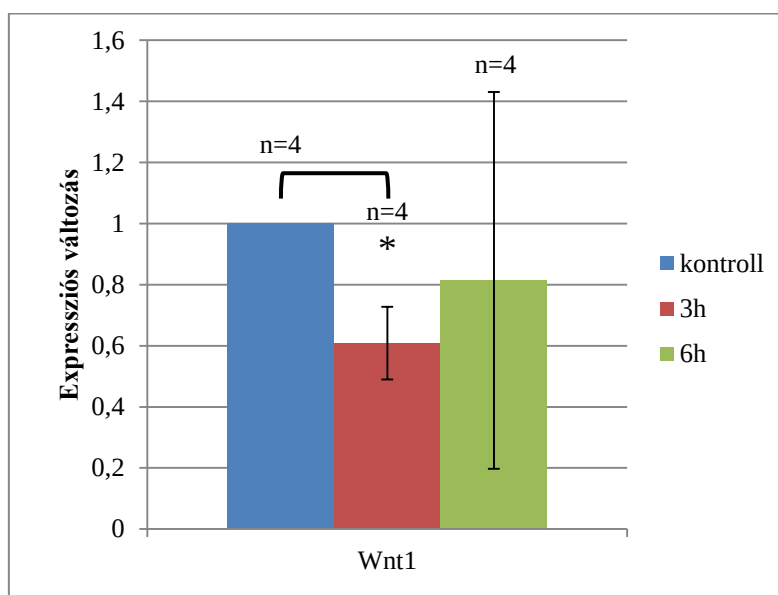
A neurális szövetek fejlődésének tanulmányozásakor kihagyhatatlan a Hedgehog család legelterjedtebb tagja, az Shh. Eredményeink azt mutatták, hogy a PACAP6-38 injektálás nem változtatta meg az Shh expressziós szintjét (9. ábra).



9. ábra. Szimmetrikus/aszimmetrikus sejtosztódásért felelős gének génexpressziós változásai a kezelést követő harmadik és hatodik órában $^* = P \leq 0,1$; $^{**} = P \leq 0,05$

4.1.4 Wnt1 mRNS szintjének változása PACAP6-38 kezelés hatására

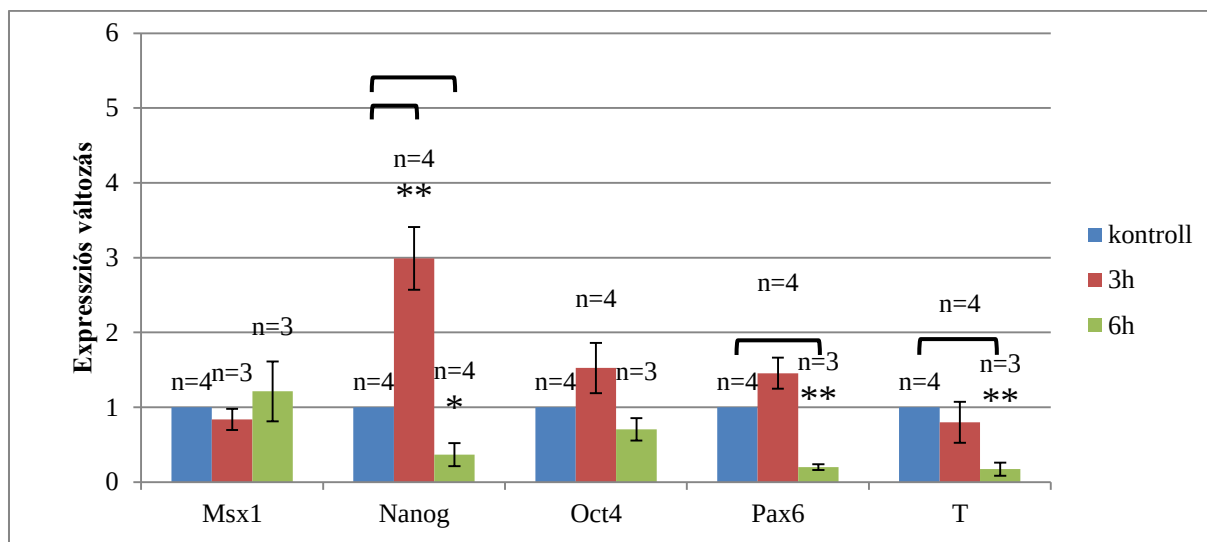
A fejlődés irányításában kulcsszerepet játszó regulátor molekula a Wnt1. Három órával a kezelést követően a Wnt1 ($0,61 \pm 0,24$) szintje kismértékben csökkent, 6 órával a kezelést követően nem tapasztaltunk változást (10. ábra).



10. ábra. Wnt1 génexpressziós változásai a kezelést követő harmadik és hatodik órában. $^* = P \leq 0,1$; $^{**} = P \leq 0,05$

4.1.5. Embrionális sejtvonal markerek mRNS szintjeinek változásai PACAP6-38 kezelés hatására

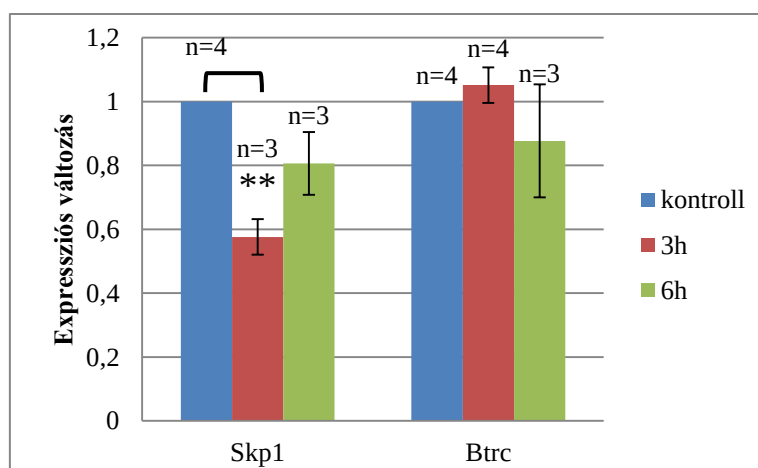
Úgy tűnik, hogy az őssejtek pluripotenciáljáért és önmegújító képességért felelős gének expresszióját szintén befolyásolja a PACAP6-38 kezelés. 3 órával a kezelést követően csak a Nanog ($2,99 \pm 0,84$) expressziós szintje emelkedett szignifikánsan. Azonban 6 órával a kezelést követően a Nanog ($0,37 \pm 0,31$), a Pax6 ($0,2 \pm 0,07$) és a T ($0,17 \pm 0,18$) szintje szignifikáns csökkenést mutatott. Az Msx1 szintje nem változott a vizsgált időpontokban (11. ábra).



11. ábra. Az Embrionális sejtvonal markerek génexpressziós változásai a kezelést követő harmadik és hatodik órában. *= $P \leq 0,1$; **= $P \leq 0,05$

4.1.6. Proteoszóma elemek mRNS szintjeinek változásai PACAP6-38 kezelés hatására

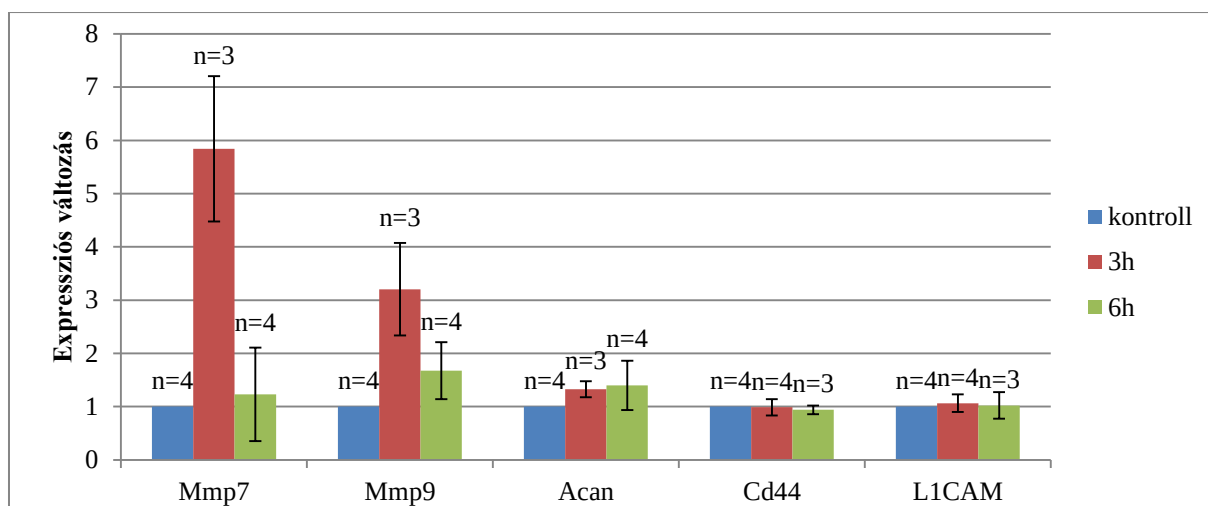
A proteoszóma két fontos eleme az Skp1 és a Btrc. Három órával a kezelést követően az Skp1 szintje kis mértékben, de szignifikánsan csökkent, míg a Btrc szintje nem változott. Hat óra elteltével egyik gén expressziója sem változott (12. ábra).



12. ábra. Proteoszóma elemek génexpressziós változásai a kezelést követő harmadik és hatodik órában. *= $P \leq 0,1$; **= $P \leq 0,05$

4.1.7. Sejtdhéziós molekulák mRNS szintjeinek változásai PACAP 6-38 kezelés hatására

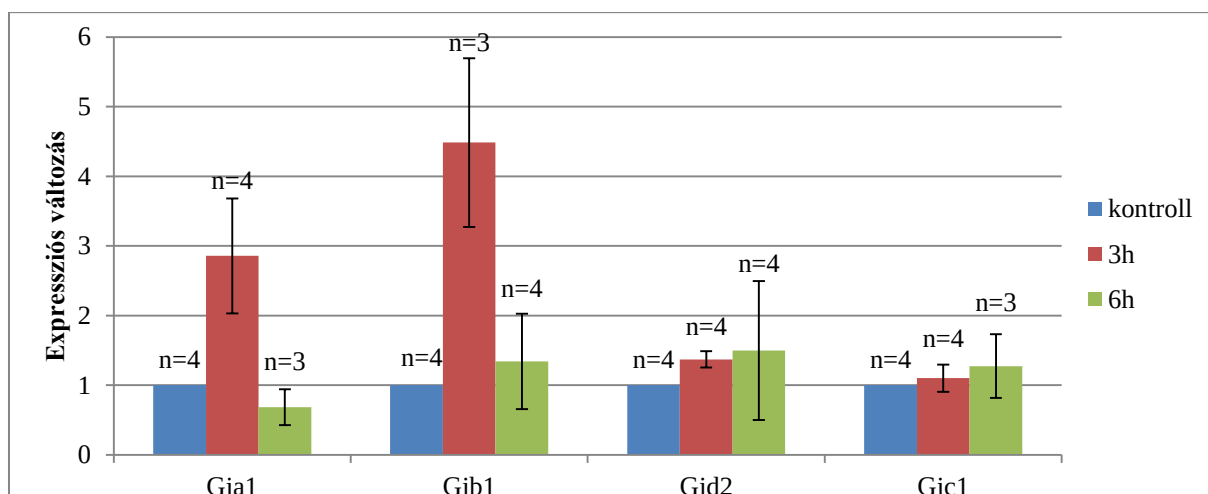
A sejtdhézióért, migrációért felelős gének esetében a PACAP receptorok blokkolása, 3 órával a kezelést követően az Mmp7 ($5,84 \pm 2,73$) és Mmp9 ($3,2 \pm 1,73$) szintjének növekedését eredményezte, habár ez a növekedés nem volt statisztikailag szignifikáns. A többi gén expressziója nem változott ebben az időpontban. Hat órával a kezelést követően sem az Mmp-k, sem az Acan, sem a Cd44, sem az L1CAM esetén nem tapasztaltunk változást (13. ábra).



13. ábra. A sejtdhéziós molekulák génexpressziós változásai a kezelést követő harmadik és hatodik órában. *= $P \leq 0,1$; **= $P \leq 0,05$

4.1.8. Sejt-sejt kommunikációt szabályozó gének mRNS szintjeinek változásai PACAP6-38 kezelés hatására

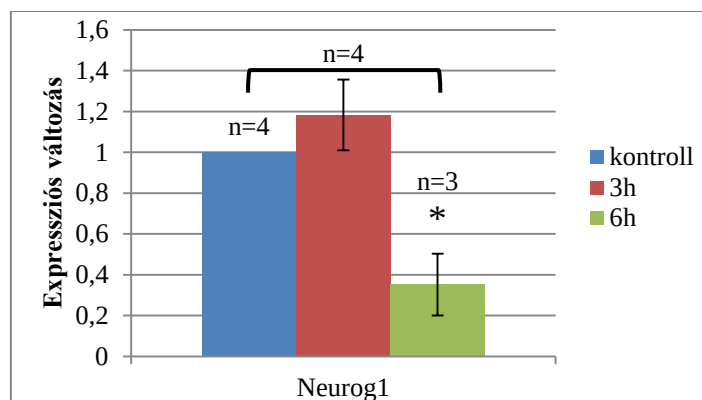
Ezen gének esetében, 3 óra elteltével, a Gja1 ($2,86 \pm 1,45$) és a Gjb1 ($4,49 \pm 2,42$) mutatott növekvő tendenciát, a többi gén nem változott. Hat óra elteltével pedig egyik gén expressziója sem változott (14. ábra).



14. ábra. Sejt-sejt kommunikációt szabályozó gének génexpressziós változásai a kezelést követő harmadik és hatodik órában. *= $P \leq 0,1$; **= $P \leq 0,05$

4.1.9. Sejt megújulásért felelős markerek mRNS szintjeinek változásai PACAP6-38 kezelés hatására

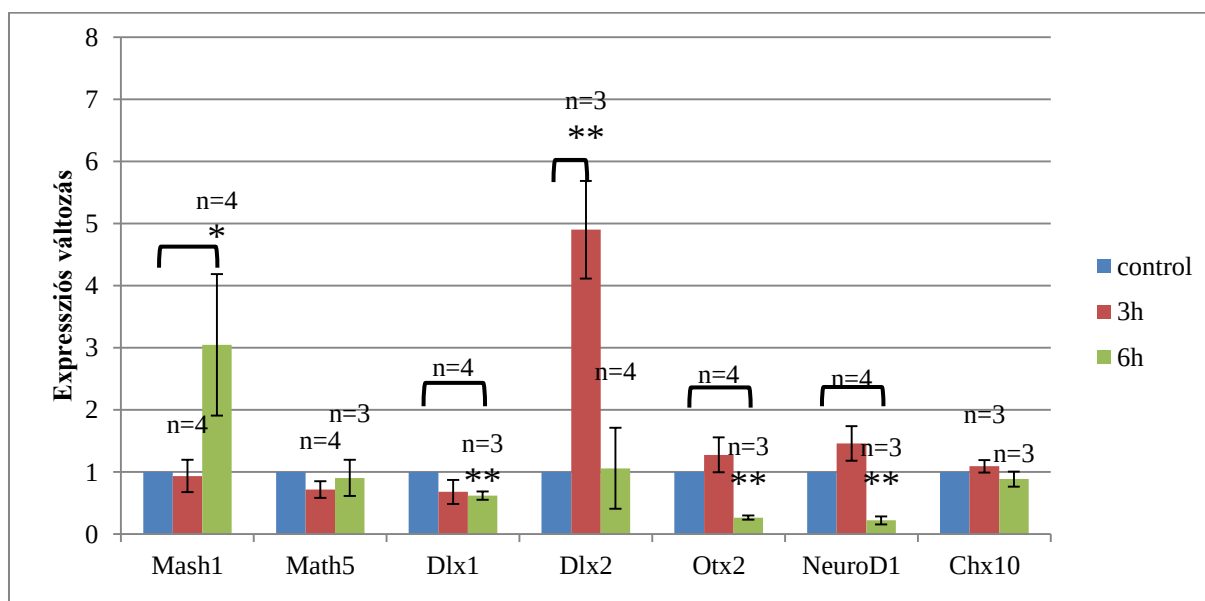
A Neurog1 ($0,35 \pm 0,3$) expressziós szintje 3 órával a kezelést követően nem változott, majd 6 órával a kezelést követően a szintje erősen lecsökkent (15. ábra).



15. ábra. Sejt megújulásért felelős markerek génexpressziós változásai a kezelést követő harmadik és hatodik órában. *= $P \leq 0,1$; **= $P \leq 0,05$

4.1.10 Retinális sejt differenciációs markerek mRNS szintjeinek változásai PACAP6-38 kezelés hatására

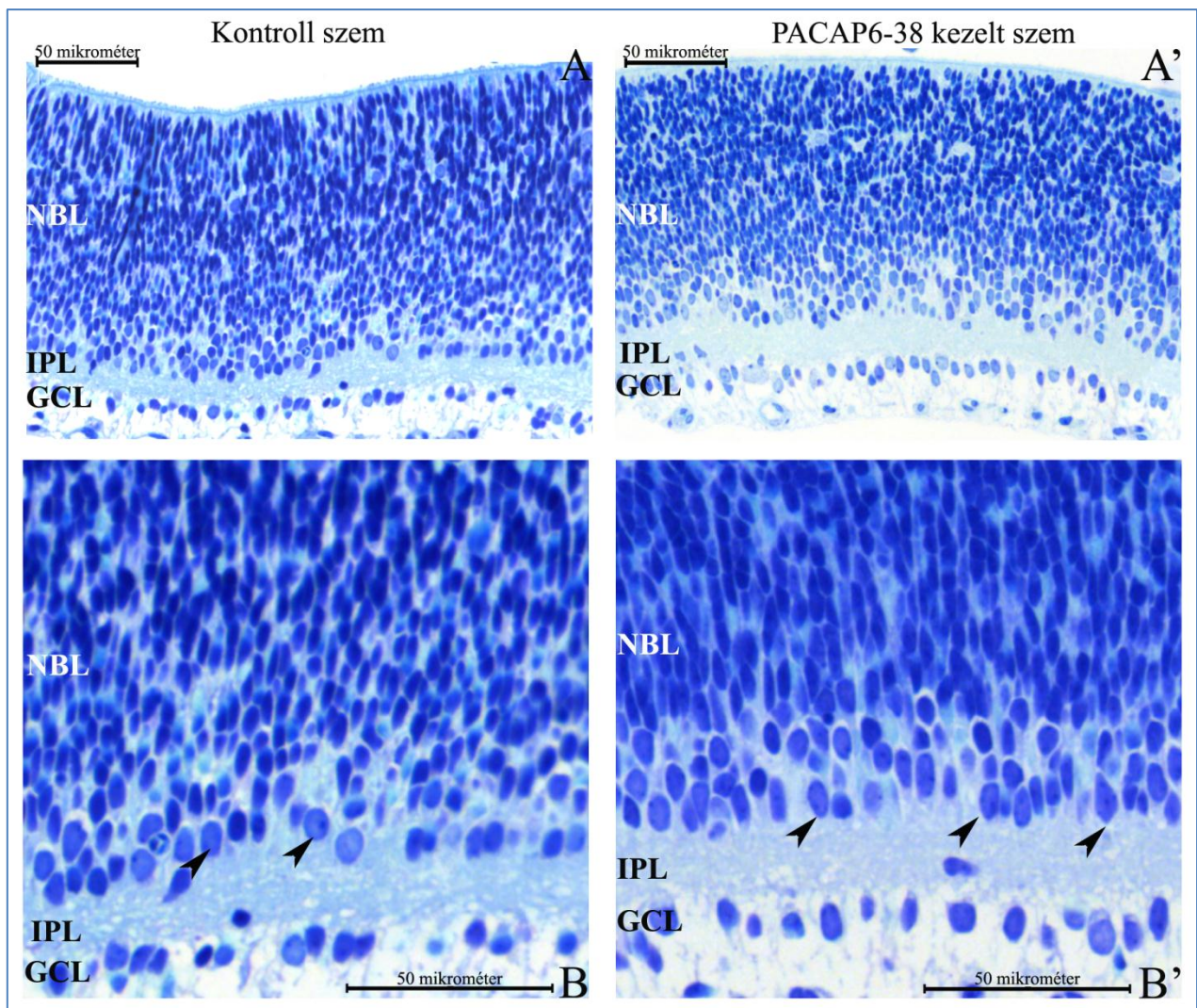
A retinális sejt típusok kialakulásáért felelős transzkripció faktorok egy nagyon fontos csoportját jelentik az általunk vizsgált géneknek. A kezelést követő 3. órában csak a Dlx2 ($4,9 \pm 1,57$) szintje nőtt, a többi gén mRNS szintje nem változott. Hat óra elteltével azonban a Dlx1 ($0,62 \pm 0,13$) szintje kis mértékben csökkent, az Otx2 ($0,26 \pm 0,07$) és a NeuroD1 ($0,22 \pm 0,12$) szintje erőteljesen csökkent, míg a Mash1 ($3,05 \pm 2,28$) esetében jelentős emelkedést tapasztaltunk (16. ábra).



16. ábra. A retinális sejt differenciációs markerek génexpressziós változásai a kezelést követő harmadik és hatodik órában. *= $P \leq 0,1$; **= $P \leq 0,05$

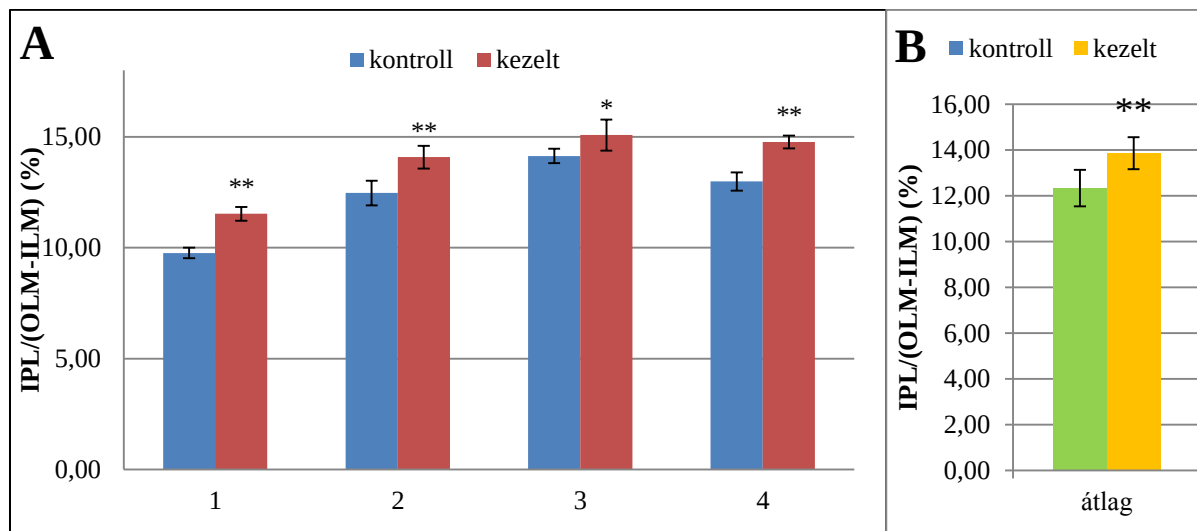
4.2 Morfológiai vizsgálatok

A 17. ábra A-A' képein megfigyelhető, hogy a PACAP6-38 kezelés drasztikusan nem változtatta meg a retina szerkezetét. A kontroll retinán megfigyelhető az NBL, az IPL és a GCL rétege (17./A). Összehasonlítva ezzel a PACAP6-38-al kezelt retinát láthatjuk az említett rétegek épségét (17./A'). Mindazonáltal az IPL vastagsága a kezelt szemben növekedett a teljes retinavastagsághoz viszonyítva. Az NBL proximális részén megfigyelhető, halványabban festődő, nagy magvú sejtek (17./B, nyílhegyek) száma nőtt a kezelt retinában (17./B', nyílhegyek). Ezeknek a sejteknek köszönhetően a kezelt retinában az INL fejlődési állapota előrehaladottabb.



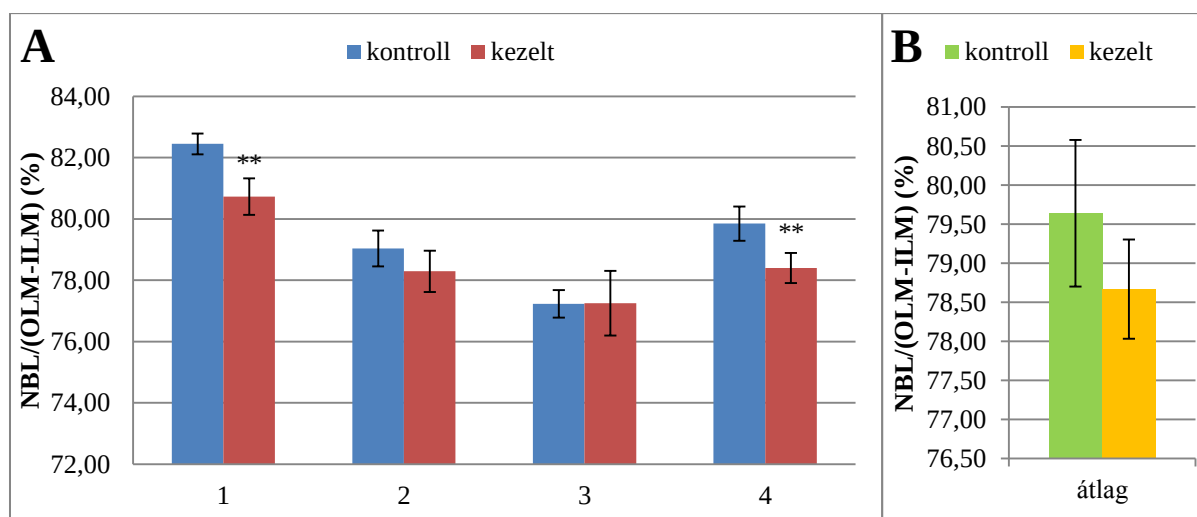
17. ábra. A kétszeri PACAP6-38 kezelés hatására bekövetkező morfológiai változások P5 retinában.

A morfometriai vizsgálatok során megmértük a teljes retinavastagságot és ehhez viszonyítottuk az NBL és a fejlődő IPL rétegek vastagságát. A mérések eredményeként elmondhatjuk (18. ábra), hogy az IPL vastagsága minden esetben szignifikánsan nőtt a PACAP6-38 peptiddel kezelt retinákban a kontroll egyedekhez képest. A növekedés átlagosan 12,4%-os volt.



18. ábra. Az IPL vastagságának változása PACAP6-38 kezelés hatására, az egyes egyedekben (A) és ezek átlagolt értékei (B). *= $P \leq 0,1$; **= $P \leq 0,05$

A neuroblaszt réteg mérési eredményei nem voltak ennyire következetesek. Két állat esetében az NBL változásának szignifikáns csökkenése volt tapasztalható, míg 2 állat esetében nem okozott változást a PACAP6-38 kezelés (19. ábra).



19. ábra. Az NBL vastagságának változása PACAP6-38 kezelés hatására, az egyes egyedekben (A) és ezek átlagolt értékei (B). *= $P \leq 0,1$; **= $P \leq 0,05$

A harmadik vizsgált paraméter, melyben különbség mutatkozott a ganglion sejtszám volt (6. táblázat). A kontroll csoportban a ganglion sejtek száma átlagosan $11,34 \pm 1,69/100\mu\text{m}$, a kezelt csoportban pedig $13,11 \pm 1,63/100\mu\text{m}$. Méréseink azt bizonyítják, hogy a PACAP6-38 kezelt szemekben 15,6%-al nő a ganglion sejtek száma.

	Kontroll szem (db ganglion sejt/100 μm ±szórás)	Kezelt szem (db ganglion sejt/100 μm ±szórás)
1. állat	10,21±1,1	12,73±1,5
2. állat	13,17±1,3	13,35±0,61
3. állat	11,02±1,21	13,15±2,19
átlag	11,34±1,69	**13,11±1,63
Kontrollhoz viszonyított növekedés:		15,6%

6. táblázat. A ganglion sejtek számának változása PACAP6-38 kezelés hatására. *=P≤0,1; **=P≤0,05

5. Eredmények értékelése

A PACAP1-38 hatás vizsgálatának egyik lehetséges útja receptorának blokkolása, mely legkönnyebben egy szelektív antagonistával kivitelezhető. PACAP esetében az N-terminálison található 6 aminosav felel a PAC1-R aktiválásért. A PACAP1-38 N-terminálisának hasításával létrehozott PACAP6-38 antagonistá az agonistával közel megegyező mértékben kötődik receptoraihoz, de a jelátviteli útvonal aktiválása elmarad (Robberecht és mtsai., 1992). Az irodalomban több adatot találunk a PACAP6-38 antagonistá alkalmazására, azonban az alkalmazott dózisok nem adnak használható támpontot (7. táblázat).

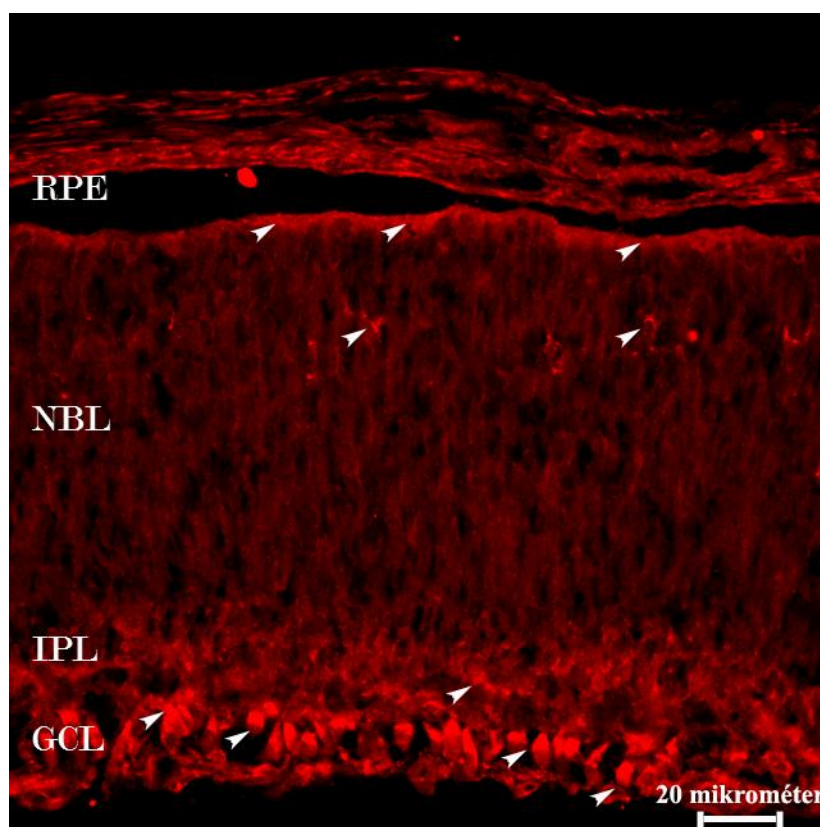
Rendszer	Beadott PACAP6-38 anyagmennyisége (nmol)	Irodalmi hivatkozás
Csirke neuroblaszt sejtkultúra	2-4	(Erhardt és mtsai., 2005)
Csirke embrió in vivo injekció	5	(Holloosy és mtsai., 2004)
Patkány szisztémásan injektálva	0,25	(Reglodi és mtsai., 2003)
Patkány intravitreálisan injektálva szembe	1	(Atlasz és mtsai., 2009)

7. táblázat. Különbözö kísérleti rendszereken végzett PACAP6-38 kezelés.

A retina tekintetében a PACAP6-38-al végzett *in vivo* kezelésekröl csak olyan adatok állnak rendelkezésünkre, melyek mesterségesen beadott, nagy dózisú PACAP1-38 receptoráról való kizorítását szolgálja. A mi esetünkben egy olyan PACAP6-38 mennyiséget kellett meghatározni, ami képes blokkolni a retinában endogén módon jelenlévö PACAP1-38-at. Ezért a kezeléseket próbaképpen 1,25 nmol és 2,5 nmol PACAP6-38 injektálásával végeztük. Mivel ez utóbbi dózis hatása bizonyult markánsabbnak, ezért ezeket a kezeléseket ismételtük és ezek eredményeit értékeltük.

Kutatócsoportunk előzetes eredményei között szerepel a PAC1-R immunreaktív struktúrák kimutatása P1 patkány retinában (20. ábra). Ezen eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a PACAP6-38 kezelésre a következő sejtek reagálhatnak: ganglionsejtek, NBL egy specifikus sejtpopulációja és az RPE. Mivel az immunhisztokémia érzékenysége limitált, ezért nem zárható ki, hogy más idegi elemek is expresszálnak PAC1 receptort, csak az expresszió mértéke a detektálhatóság szintje alatt marad. Ezt a feltevést erősíti az a tény, hogy kutatócsoportunk kimutatott PAC1-R immunreaktivitást az amakrin sejteken is, a posztnatális fejlődés egy későbbi szakaszában (P7). Korábbi eredményeink

alapján az is ismeretes, hogy a fejlődés, ezen korai időszakában a PACAP6-38 a PAC1-R négyféle izoformájának hatását tudja gátolni (Null, Hip, Hop1, Hiphop1).



20. ábra. PACAP immunreaktív struktúrák P1 patkány retinában. Nyíl = PACAP immunreaktív struktúra.

5.1 A PAC1 receptorok által szabályozott gének

5.1.1 PACAP6-38 kezelés hatására változást nem mutató gének

A génexpresszió kontroll egyedhez viszonyított kétszeres növekedését vagy felére csökkenését tekintettük változásnak. Így eredményeink alapján ennek a kritériumnak a következő gének nem feleltek meg: Math5, Fgf4, Shh, Msx1, Oct4, Btrc, Mmp7, Mmp9, Acan, Cd44, L1CAM, Gja1, Gjb1, Gjc1, Gjd2, Chx10. Ezen eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a PACAP receptor nem befolyásolja a sejt-sejt kapcsolatok kialakulását, a sejtmigrációt és a sejtosztódást.

5.1.2 PACAP6-38 kezelés hatására tranziens/átmeneti változást mutató gének

Az általunk vizsgált gének közül számos esetben tapasztaltuk, hogy az expressziójuk csak a 3. órában mutatott változást. Az ilyen tranziens változást mutató géneket kizártuk a megvitatásból, mert nagy valószínűséggel az ilyen rövid idejű emelkedés/csökkenés nem nyilvánul meg fehérje szinten, vagy ha mégis, annak fiziológiai jelentősége

megkérdőjelezhető. Ennek bizonyításához további vizsgálatok elvégzése szükséges (western blott analízis). Ebbe a csoportba tartozik a Bmp9, a Wnt1, az Skp1 és a Dlx2.

5.1.3 PACAP6-38 kezelés hatására konzisztens változást mutató gének

Ebbe a csoportba tartozó gének a PACAP6-38 kezelést követő 6. órában legalább kétszeres növekedést vagy felére való csökkenést mutattak a kontroll csoporthoz képest. Ide tartozik a Mash1, az Otx2, a Neurod1, a Neurog1, a Nanog, a Pax6, a T, a Gdf3, az Fgf8, az Fgf2 és az Fgf9. Ezt a 11 gént 3 funkcionális csoportba soroltuk:

1. Szekréciós faktorok (Gdf3, Fgf8, Fgf9, Fgf2)
2. Embrionális sejtvonal markerek (Pax6, T, Nanog)
3. Retinális sejt differenciációs markerek (Mash1, Otx2, Neurod1, Neurog1)

Az expressziós változások irányát a 8. táblázat foglalja össze.

	Embrionális állapot fenntartása	Sejtdifferenciáció	Trofikus faktorok
Pozitív hatás (Upregulation)		Mash1	Fgf2
Negatív hatás (Downregulation)	Pax6 T Gdf3 Nanog	NeuroD1 Otx2 Neurog1	Fgf8 Fgf9

8. táblázat. Génexpressziós változások összefoglaló táblázata

5.1.3.1. Szekréciós faktorok expressziójának változásai

A vizsgált gének ezen csoportja parakrin szignál molekulákat foglal magában (Ornitz és Itoh, 2001). A szekretált FGF molekulák hatásukat fibroblaszt növekedési faktor receptorokon (FGFR-ek) keresztül fejtik ki. Az FGF2 eltérő affinitással, de képes bármelyik FGF receptorhoz bekötni. Az FGF2 hatására a fotoreceptorok differenciációja valósul meg (Kinkl és mtsai., 2002; Li és mtsai., 2001), de az FGF2 jelenléte szükséges a ganglion sejtréteg megfelelő fejlődéséhez is (Desire és mtsai., 1998). Kifejlett patkány retinánál az optikus ideg átvágását követően az FGF2 fokozta a ganglion sejtek túlélését (Sievers és mtsai., 1987). Az általunk kapott eredmények, így arra engednek következtetni, hogy a PACAP6-38-al kezelt retinában a fotoreceptorokká való differenciáció fokozódik, illetve a ganglion sejtréteg fejlődése is módosul - valószínűleg több ganglion sejt jelenik meg a PAC1-R blokkolását követően. Az FGF9 legnagyobb affinitással az INL és a GCL sejteiben található

FGFR3 receptorhoz kötődik. Az FGF9 a ganglionsejtek túléléséért felel (Kinkl és mtsai., 2002; Kinkl és mtsai., 2003). Méréseink szerint a PACAP6-38 kezelés erőteljes csökkenést válthat ki az Fgf9 szintben, ami ennek a védő funkciónak a megszűnését jelentheti.

A Gdf3 szintén egy parakrin faktor. Az embriogenezis során a sejtek multipotens állapotának fenntartásáért felel, de konkrétan a retinára vonatkozó adatokkal viszont nem rendelkezünk (Levine és Brivanlou, 2006). Valószínűsíthető, hogy ez a faktor a fejlődő retinában a progenitor sejtek multipotens állapotát tartja fenn. A Gdf3 lecsökkent szintjéből a multipotens állapot megszűnésére következtethetünk.

5.1.3.2. Embriionális sejtvonal markerek génjeinek változásai

Az ide tartozó gének közül a Pax6 transzkripció faktor szerepe a retinában sokrétű. Expressziója fenntartja a sejtek multipotens állapotát. Az ontogenezis során bekövetkező változása viszont a különböző sejt differenciációs markerek termelődését válthatja ki, mely a sejt differenciáció megindításához vezet (Marquardt és mtsai., 2001). A Pax6 expressziójának csökkenéséből a multipotens állapot megszűnését valószínűsíthetjük. A Nanog transzkripció faktor a retinogenezis során a multipotens állapot fenntartásáért felel, hiányában pedig sejt differenciáció következik be (Firsova és mtsai., 2008). A Nanog szintjének csökkenése PACAP6-38 hatására a sejteket a differenciáció irányába indítja el. Ennek a két faktornak a konzisztens csökkenéséből arra következtethetünk, hogy a PAC1-R blokkolásának eredményeképpen az őssejt állapot megszűnik és a differenciáció folyamata megindul.

5.1.3.3. Retinális sejt típusok differenciációját irányító gének változásai

Ebbe a csoportba sorolt gének egyrészt a transzkripció faktorok basic helix-loop-helix (bHLH) csoportjába tartoznak (Mash1, NeuroD1, Neurog1), másrészt a homeobox gének képviselői (Otx2). Bizonyított, hogy a Mash1 megnövekedett expressziója esetén a bipoláris sejtek száma nő (Cepko, 1999). A PACAP6-38 hatására bekövetkező Mash1 szint pozitív irányú változása valószínűleg a bipoláris sejtek számának emelkedését eredményezi. Az Otx2 nélkülözhetetlen a fotoreceptor réteg kialakulásában. Hiányában a differenciálódó fotoreceptor sejtek amakrin sejtekké alakulnak (Nishida és mtsai., 2003). Emellett az Otx2 jelenléte szükséges az RPE kialakulásához is, hiányában nem jönnek létre pigmentált sejtek, hanem helyettük a neurális retinára jellemző sejtek jelennek meg (Martinez-Morales és mtsai., 2003). PACAP6-38 kezelés hatására az Otx2 szintje csökkent. Ez a változás az amakrin sejtek számának növekedéséhez vezethet, valamint módosulhat az RPE fejlődése. 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 szükséges a pálcikák életben maradásához (Morrow és mtsai., 1999). Vizsgálatainkban a

NeuroD1 csökkenését tapasztaltuk, ami így növelheti a keletkező Müller- és bipolaris sejtek számát, illetve befolyásolhatja a fotoreceptor réteg összetételét. A Neurog1 részt vesz a RPE kialakításában valamint jelenléte szükséges a fotoreceptor réteg kialakulásához hiányában a fotoreceptorok száma csökken (Li és mtsai., 2010; Yan és mtsai., 2009). PACAP 6-38 kezelés hatására a Neurog1 szintje csökkent, ami a fotoreceptorok számának csökkenését és az RPE fejlődésének módosulását jelezheti számunkra.

5.2 Morfológiai vizsgálatok

Az NBL alsó részén, az IPL szomszédságában megjelenő kerek magvú, halványan festődő sejtek alapján megállapíthatjuk, hogy az INL differenciáltsága fokozódik PACAP6-38 kezelés hatására. Ezt a megfigyelést összekapcsolva a génexpressziós eredményeinkkel - ahol a Mash1 szintje nőtt, míg az Otx2 és a NeuroD1 szintje csökkent - a kerek magvú sejtek az INL bármelyik sejttypusát (amakrin sejtek, bipolaris sejtek, Müller-sejtek) képviselhetik. Morfometriai vizsgálataink kimutatták az IPL vastagságának növekedését, amely az INL-ben található sejtek differenciációjának fokozódásával magyarázható. Ugyanis ezen sejtek nyúlványrendszerei nagyobb részben az IPL-ben foglalnak helyet, differenciálódásuk során pedig nagymértékben növekszik a nyúlványok mennyisége és mérete.

A GCL-ben sejtszám emelkedést mértünk. A GCL fejlődésére az FGF2 és az FGF9 ellentétes módon hat, a morfológiai eredmények alapján viszont feltehetően, az FGF2 protektív/proliferatív hatása bizonyul erősebbnek, így a két faktor eredő hatásaként a ganglion sejtek számának növekedése következik be. Ezek a megfigyelések összességükben azt mutatják számunkra, hogy a retina struktúráltsága nő PACAP6-38 kezelés hatására. A génexpressziós vizsgálatok alapján a fotoreceptorok és az RPE fejlődése is módosulhat, azonban az eddigi morfológiai vizsgálatainkkal ezt a feltevést se megerősíteni se cáfolni nem tudjuk. Az egyes sejttypusok pontos mibenlétéről és egymáshoz viszonyított arányának változásáról tett kijelentések viszont csak spekulatív jellegűek. Bizonyításukhoz specifikus sejtmarkerek alkalmazásával végzett vizsgálatok szükségesek, melyek elvégzése jövőbeni terveink között szerepel.

6. Összefoglalás

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló peptidet (PACAP) egy japán-amerikai kutatócsoport fedezte fel 1989-ben. A felfedezést követő vizsgálatok kiderítették, hogy a PACAP hormonként, neurotransmitterként és neuroprotektív molekulaként is funkcionál az élő szervezetben. Az idegrendszer ontogenezise során betöltött szerepe vitathatatlan mind a pre,- és posztnatális időszakban. A PACAP által szabályozott folyamatok közé tartozik a progenitor sejtek proliferációja, az apoptózis és az arborizáció fokozása. Hatásait három PACAP receptor közvetíti: PAC1, VPAC1, VPAC2. Retinára vonatkozó adatok hiányossága miatt célkitűzésünk az volt, hogy fényt derítsünk a PAC1 receptorok korai posztnatális retina fejlődésében betöltött szerepére, azonosítsuk a PAC1 receptor által szabályozott géneket és megfigyeljük a PAC1 receptorok blokkolása következtében kialakult morfológiai változásokat.

Egy napos Wistar patkányok szemébe intravitreálisan vagy 2,5 nmol PAC1 receptor antagonistát (PACAP6-38) vagy fiziológias sóoldatot injektáltunk. A retinák eltávolítása 3 illetve 6 órával a kezelést követően történt. A kontrolhoz viszonyított génexpressziós különbségeket kvantitatív real-time PCR segítségével határoztuk meg. A morfológiai vizsgálatokhoz a kísérleti állatokat 1 és 3 napos korban kezeltük, a szemek kipreparálását 5 napos korban végeztük el. A retinákból félvékony metszeteket készítettünk, majd a változások kvantifikálását morfometriai mérésekkel végeztük el.

A génexpressziós vizsgálatok eredményeként a 32 vizsgált génből 16 mutatott változást a PAC1-R antagonista hatására. A vizsgálatok azt mutatják, hogy a PACAP6-38 kezelés növelte a fibroblaszt növekedési faktor-2, ugyanakkor csökkentette az Fgf8 és 9 expresszióját, valamint növekedési differenciációs faktor-3 szintjét. A kezelés hatására csökkent a sejtek multipotens állapotát fenntartó gének expressziója (Pax6, Nanog, T), de változott bizonyos retinális sejtípusok differenciálódásáért felelős faktorok (Mash1, Otx2, NeuroD1, Neurog1) expressziója is. A morfológiai vizsgálatok azt mutatják, hogy a kezelt retinában 12,4%-al növekedett a belső rostos réteg vastagsága, differenciáltabbá vált a belső sejtes réteg és 15,6%-al emelkedett a ganglionsejtek száma. Konklúzióként levonhatjuk, hogy a PACAP, PAC1 receptorokon keresztül közvetlenül és - növekedési faktorokon keresztül - közvetett módon módosítja a retina morfogenezisét. A PAC1 receptorok gátlása az összejt állapotról való továbblépést indukálja - a ganglionsejtek és a belső rostos réteg valamennyi sejtjének fejlődését előremozdítva - felgyorsítja a szövet érését.

7. Irodalom

Alexandre, D., Alonzeau, J., Bill, B.R., Ekker, S.C., and Waschek, J.A. (2011). Expression analysis of PAC1-R and PACAP genes in zebrafish embryos. *Journal of molecular neuroscience* : MN 43, 94-100.

Atlasz, T., Szabadfi, K., Reglodi, D., Kiss, P., Tamas, A., Toth, G., Molnar, A., Szabo, K., and Gabriel, R. (2009). Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its fragments on retinal degeneration induced by neonatal monosodium glutamate treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1163, 348-352.

Bagnoli, P., Dal Monte, M., and Casini, G. (2003). Expression of neuropeptides and their receptors in the developing retina of mammals. *Histology and histopathology* 18, 1219-1242.

Basille, M., Gonzalez, B.J., Leroux, P., Jeandel, L., Fournier, A., and Vaudry, H. (1993). Localization and characterization of PACAP receptors in the rat cerebellum during development: evidence for a stimulatory effect of PACAP on immature cerebellar granule cells. *Neuroscience* 57, 329-338.

Cepko, C.L. (1999). The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates. *Current opinion in neurobiology* 9, 37-46.

Cook, J.E., and Chalupa, L.M. (2000). Retinal mosaics: new insights into an old concept. *Trends in neurosciences* 23, 26-34.

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

Desire, L., Head, M.W., Fayein, N.A., Courtois, Y., and Jeanny, J.C. (1998). Suppression of fibroblast growth factor 2 expression by antisense oligonucleotides inhibits embryonic chick neural retina cell differentiation and survival in vivo. *Developmental dynamics* : an official publication of the American Association of Anatomists 212, 63-74.

Dickson, L., and Finlayson, K. (2009). VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacology & therapeutics* 121, 294-316.

Dohi, K., Mizushima, H., Nakajo, S., Ohtaki, H., Matsunaga, S., Aruga, T., and Shioda, S. (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevents hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *Regulatory peptides* 109, 83-88.

Dyer, M.A. (2004). Mouse models of childhood cancer of the nervous system. *Journal of clinical pathology* 57, 561-576.

Erhardt, N.M., Haines, L.R., Pearson, T.W., and Sherwood, N.M. (2005). Inhibition of PACAP activity by a receptor antagonist results in changes in cell cycle and apoptotic proteins in chick neuroblasts. *Journal of molecular neuroscience* : MN 27, 107-123.

Firsova, N.V., Markintantova Iu, V., Smirnova Iu, A., Panova, I.G., Sukhikh, G.T., Zinov'eva, R.D., and Mitashov, V.I. (2008). [Identification of the OCT4-pg1 retrogene and NANOG gene expression in the human embryonic eye]. *Izvestiia Akademii nauk Seriia biologicheskaiia / Rossiiskaia akademiia nauk*, 134-138.

Fletcher, E.L., and Kalloniatis, M. (1997). Localisation of amino acid neurotransmitters during postnatal development of the rat retina. *The Journal of comparative neurology* 380, 449-471.

Galli-Resta, L., and Ensini, M. (1996). An intrinsic time limit between genesis and death of individual neurons in the developing retinal ganglion cell layer. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 2318-2324.

Gonzalez, B.J., Basille, M., Vaudry, D., Fournier, A., and Vaudry, H. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience* 78, 419-430.

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

Grunder, T., Kohler, K., and Guenther, E. (2000). Distribution and developmental regulation of AMPA receptor subunit proteins in rat retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 41, 3600-3606.

Harmar, A.J., Arimura, A., Gozes, I., Journot, L., Laburthe, M., Pisegna, J.R., Rawlings, S.R., Robberecht, P., Said, S.I., Sreedharan, S.P., *et al.* (1998). International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacological reviews* 50, 265-270.

Hollosy, T., Jozsa, R., Jakab, B., Nemeth, J., Lengvari, I., and Reglodi, D. (2004). Effects of in ovo treatment with PACAP antagonist on general activity, motor and social behavior of chickens. *Regulatory peptides* 123, 99-106.

Johansson, K., Bruun, A., deVente, J., and Ehinger, B. (2000). Immunohistochemical analysis of the developing inner plexiform layer in postnatal rat retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 41, 305-313.

Johnson, J., Tian, N., Caywood, M.S., Reimer, R.J., Edwards, R.H., and Copenhagen, D.R. (2003). Vesicular neurotransmitter transporter expression in developing postnatal rodent retina: GABA and glycine precede glutamate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 518-529.

Kinkl, N., Hageman, G.S., Sahel, J.A., and Hicks, D. (2002). Fibroblast growth factor receptor (FGFR) and candidate signaling molecule distribution within rat and human retina. *Molecular vision* 8, 149-160.

Kinkl, N., Ruiz, J., Vecino, E., Frasson, M., Sahel, J., and 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. *Molecular and cellular neurosciences* 23, 39-53.

- Lakk, M., Szabo, B., Volgyi, B., Gabriel, R., and Denes, V. (2012). Development-Related Splicing Regulates Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Receptors in the Retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 53, 7825-7832.
- Lam, H.C., Takahashi, K., Ghatei, M.A., Kanse, S.M., Polak, J.M., and Bloom, S.R. (1990). Binding sites of a novel neuropeptide pituitary-adenylate-cyclase-activating polypeptide in the rat brain and lung. *European journal of biochemistry / FEBS* 193, 725-729.
- Levine, A.J., and Brivanlou, A.H. (2006). GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos. *Development* 133, 209-216.
- Li, C.-M., Khosla, J., Hoyle, P., and Sannes, P.L. (2001). Transforming Growth Factor- β 1 Modifies Fibroblast Growth Factor-2 Production in Type II Cells*. *CHEST Journal* 120, S60-S61.
- Li, X., Ma, W., Zhuo, Y., Yan, R.T., and Wang, S.Z. (2010). Using neurogenin to reprogram chick RPE to produce photoreceptor-like neurons. *Investigative ophthalmology & visual science* 51, 516-525.
- Lu, N., Zhou, R., and 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. *Journal of neuroscience research* 53, 651-662.
- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F., and Gruss, P. (2001). Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* 105, 43-55.
- Martinez-Morales, J.R., Dolez, V., Rodrigo, I., Zaccarini, R., Leconte, L., Bovolenta, P., and Saule, S. (2003). OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. *The Journal of biological chemistry* 278, 21721-21731.
- McRory, J., and Sherwood, N.M. (1997). Two protochordate genes encode pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and related family members. *Endocrinology* 138, 2380-2390.
- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R.R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M.D., and Coy, D.H. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and biophysical research communications* 164, 567-574.
- Morrow, E.M., Belliveau, M.J., and Cepko, C.L. (1998). Two phases of rod photoreceptor differentiation during rat retinal development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18, 3738-3748.
- Morrow, E.M., Chen, C.M., and Cepko, C.L. (2008). Temporal order of bipolar cell genesis in the neural retina. *Neural development* 3, 2.
- Morrow, E.M., Furukawa, T., Lee, J.E., and Cepko, C.L. (1999). NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. *Development* 126, 23-36.
- Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I., and Furukawa, T. (2003). Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nature neuroscience* 6, 1255-1263.

Njaine, B., Martins, R.A., Santiago, M.F., Linden, R., and Silveira, M.S. (2010). Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide controls the proliferation of retinal progenitor cells through downregulation of cyclin D1. *The European journal of neuroscience* 32, 311-321.

Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome biology* 2, REVIEWS3005.

Pantaloni, C., Brabet, P., Bilanges, B., Dumuis, A., Houssami, S., Spengler, D., Bockaert, J., and 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. *The Journal of biological chemistry* 271, 22146-22151.

Pequignot, M.O., Provost, A.C., Salle, S., Taupin, P., Sainton, K.M., Marchant, D., Martinou, J.C., Ameisen, J.C., Jais, J.P., and Abitbol, M. (2003). Major role of BAX in apoptosis during retinal development and in establishment of a functional postnatal retina. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 228, 231-238.

Perry, V.H., Henderson, Z., and Linden, R. (1983). Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *The Journal of comparative neurology* 219, 356-368.

Rapaport, D.H., Wong, L.L., Wood, E.D., Yasumura, D., and LaVail, M.M. (2004). Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *The Journal of comparative neurology* 474, 304-324.

Reese, B.E., and Colello, R.J. (1992). Neurogenesis in the retinal ganglion cell layer of the rat. *Neuroscience* 46, 419-429.

Reese, B.E., and Galli-Resta, L. (2002). The role of tangential dispersion in retinal mosaic formation. *Progress in retinal and eye research* 21, 153-168.

Reglodi, D., Kiss, P., Tamas, A., and Lengvari, I. (2003). The effects of PACAP and PACAP antagonist on the neurobehavioral development of newborn rats. *Behavioural brain research* 140, 131-139.

Robberecht, P., Gourlet, P., De Neef, P., Woussen-Colle, M.C., Vandermeers-Piret, M.C., Vandermeers, A., and Christophe, J. (1992). Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of PACAP(6-38) as a potent antagonist. *European journal of biochemistry / FEBS* 207, 239-246.

Sassoe-Pognetto, M., and Wassle, H. (1997). Synaptogenesis in the rat retina: subcellular localization of glycine receptors, GABA(A) receptors, and the anchoring protein gephyrin. *The Journal of comparative neurology* 381, 158-174.

Scharf, E., May, V., Braas, K.M., Shutz, K.C., and Mao-Draayer, Y. (2008). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) regulate murine neural progenitor cell survival, proliferation, and differentiation. *Journal of molecular neuroscience : MN* 36, 79-88.

Sherwood, N.M., Krueckl, S.L., and McRory, J.E. (2000). The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocrine reviews* 21, 619-670.

Sievers, J., Hausmann, B., Unsicker, K., and Berry, M. (1987). Fibroblast growth factors promote the survival of adult rat retinal ganglion cells after transection of the optic nerve. *Neuroscience letters* 76, 157-162.

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

Usdin, T.B., Bonner, T.I., and Mezey, E. (1994). Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology* 135, 2662-2680.

Vaudry, D., Basille, M., Anouar, Y., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (1998). The neurotrophic activity of PACAP on rat cerebellar granule cells is associated with activation of the protein kinase A pathway and c-fos gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* 865, 92-99.

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

Vaudry, D., Rousselle, C., Basille, M., Falluel-Morel, A., Pamantung, T.F., Fontaine, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 6398-6403.

Vu, T.Q., Payne, J.A., and Copenhagen, D.R. (2000). Localization and developmental expression patterns of the neuronal K-Cl cotransporter (KCC2) in the rat retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 1414-1423.

Webster, M.J., and Rowe, M.H. (1991). Disruption of developmental timing in the albino rat retina. *The Journal of comparative neurology* 307, 460-474.

Yan, R.T., He, L., and Wang, S.Z. (2009). Pro-photoreceptor activity of chick neurogenin1. *Investigative ophthalmology & visual science* 50, 5567-5576.

8. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni Dr. Dénes Viktóriának a mindenre kiterjedő témavezetést, valamint végtelen türelmét, ami nélkül ez a dolgozat nem születhetett volna meg. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Gábrriel Róbertnek, hogy lehetőséget adott a tanszék munkájába való bekapcsolódáshoz és hogy hasznos tanácsokkal látott el a morfológiai vizsgálatok kivitelezéséhez. Lakk Mónikának és Gödri Zoltánnak szeretném megköszönni a kísérletes munkában nyújtott segítségüket. A félvékony metszetek elkészítésénél nyújtott segítségéért szeretnék köszönetet mondani Dr. Pollák Editnek. Dr. Fekete Csabának köszönöm, hogy rendelkezésemre bocsátotta a StepOnePlus QPCR gépet és hasznos tanácsokkal látott el a PCR reakciók kivitelezésénél. Dr. Kiszler Gábornak köszönöm, hogy bemutatta nekem a Panoramic viewer program minden lehetőségét. Végül szeretnék köszönetet mondani a Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék minden munkatársának, aki valamilyen módon segített, hogy ez a dolgozat megszülethessen.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Szabó Bence Farkas a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- a kísérleti állatok kezelését,
- a szövet preparálást,
- az RNS extrakciót és RNS koncentráció meghatározást
- reverz transzkripció reakciók összeállítását,
- a kvantitatív real-time PCR reakciók összeállítását,
- a PCR reakciókhoz tartozó dokumentációt és kiértékelést
- a szövetminták fixálását és beágyazását
- a félvékony metszetek készítését
- a metszetek digitalizálását
- a metszeteken végzett morфомetriai méréseket és kiértékelésüket

végeztem el.

.....

aláírás

Pécs, 2013 január 9.