

XXXII. OTDK Biológiai Szekció

A PAC1 receptor izoformák (Hip, Hop1) expressziójának szabályozása a
patkány retina posztnatális fejlődése során

Stefanov Antónia, II. éves Biológus MSc hallgató

Pécsi Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Biológiai Intézet

Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék

Témavezető:

Dr. Dénes Viktória

egyetemi adjunktus

2015

Pécs

Tartalomjegyzék

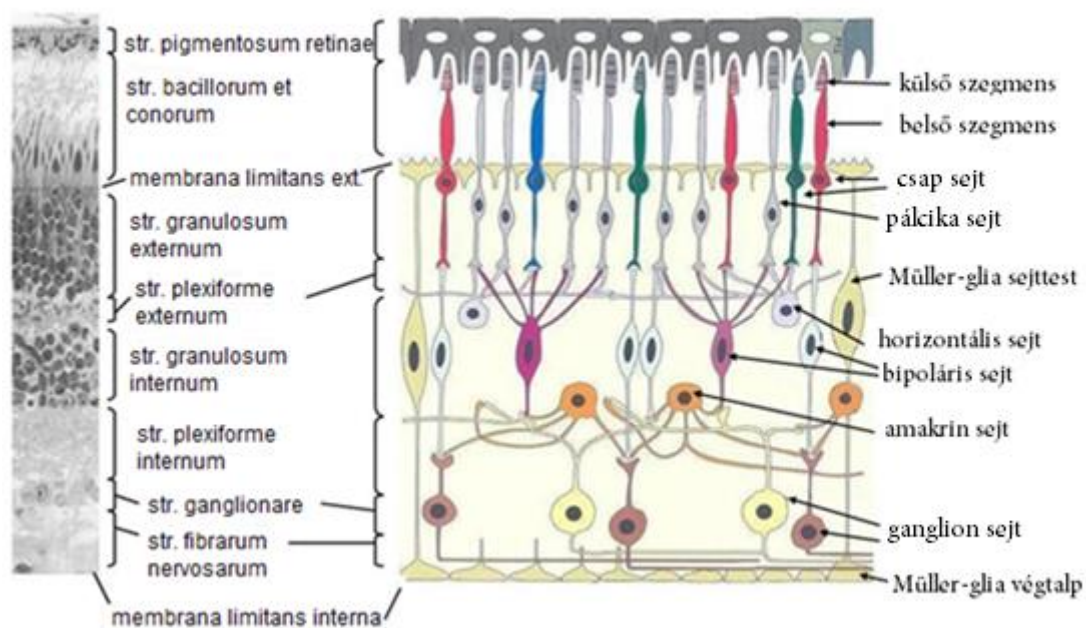
1.	Bevezetés.....	4
1.1.	Az emlős retina.....	4
1.2.	A patkány retina posztnatális fejlődése	5
1.3.	Hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) a patkány retinában.....	8
1.4.	Kutatómunkánk előzményei	10
2.	Problémafelvetés/Célkitűzés	13
3.	Anyag és módszer	14
3.1.	Állatok és szövet preparáció	14
3.2.	RNS extrakció és reverz transzkripció	14
3.3.	Kvantitatív Real-Time polimeráz láncreakció (RT-PCR)	16
3.4.	Statisztikai elemzés.....	19
4.	Eredmények.....	20
4.1.	Hip és Hop1 izoformák expressziójának változásai normál fejlődésű retinában	20
4.2.	A fény- és sötét adaptáció hatása a Hip és Hop1 izoforma expressziós mintázatra	22
4.3.	A miR137 és miR147 expressziós változásai normál fejlődésű retinában	24
4.4.	A fény és sötét adaptáció hatása a miR137 és miR147 expressziójára	27
5.	Eredmények tárgyalása	29
5.1.	A PAC1 receptor Hip és Hop1 izoformáinak funkcionális jelentősége a fejlődő patkány retinában	29
5.2.	A fény- és sötét adaptáció hatása a Hip és Hop1 mRNS expressziókra.....	30
5.3.	A miRNS-ek lehetséges szerepe a Hip és Hop1 mRNS expresszió szabályozásában	31
5.4.	Az emlős retina fejlődése során felszabaduló, a fény- és a sötét adaptáció kialakításáért felelős mediátorok.....	33
5.4.1.	Dopamin.....	33

5.4.2.	Melatonin	34
6.	Összefoglalás.....	36
7.	Hivatkozások.....	37
8.	Köszönetnyilvánítás	42
9.	Tételes szerzői hozzájárulás	43

1. Bevezetés

1.1. Az emlős retina

A retina a szemfenéken elhelyezkedő, tíz szövettani rétegből felépülő hártya, mely a központi idegrendszer kihelyezett struktúrájaként fogható fel (1. ábra). Első rétege, a *stratum pigmentosum retinae*, melyben a retina pigmenthámsejtjei bocsájtanak nyúlványokat a következő réteg, a *stratum bacillorum et conorum* fotoreceptor sejtjeinek külső szegmenséi felé. A harmadik réteg a *membrana limitans externa*, melyet a Müller-glia sejtek nyúlványai és a fotoreceptor sejtek (csapok és pálcikák) közötti adherens kapcsolatok hoznak létre. A *stratum granulosum externum*-ban a fotoreceptorok sejttestei helyezkednek el. Ezek a sejtek interneuronokkal alkotott szinaptikus kapcsolatai (horizontális és bipoláris sejtek) hozzák létre a következő réteget, a *stratum plexiforme externum*-ot. Az interneuronok sejttestei a *stratum granulosum internum*-ban helyezkednek el, közülük a bipoláris és amakrin sejtek nyúlványainak a ganglion sejtekkel alkotott szinaptikus kapcsolatai pedig a *stratum plexiforme internum*-ot alkotják. A *stratum ganglionare* a ganglion sejtek által alkotott réteg. A ganglion sejtek *nervus opticus* felé futó axonjai alkotják a retina kilencedik rétegét, a *stratum fibrarum nervosarum*-ot. Utolsó réteggként pedig a Müller-glia sejtek végtalpai által alkotott *membrana limitans interna*-t kell megemlítenünk.



1. ábra - A retina szerkezete és sejttypusai (átalakított ábra:
<http://www.bio.miami.edu/tom/courses/protected/bil265/retina.jpg>)

A retina feladata a fényinger felfogása, elektromos jellé való átalakítása és feldolgozása. A vizuális információ áramlása a retinában irányított folyamat. A jelfeldolgozás a fotoreceptor sejtekben kezdődik, majd az ingerület áttevődik a bipoláris sejtekre, végül pedig a ganglion sejtekre. Az ingerület áramlását két horizontális útvonal is szabályozza, melyben az amakrin és horizontális sejtek játszanak szerepet. A retina egyetlen ún. 'output' sejtjei a ganglion sejtek, melyek axon nyúlványai a látóidegen keresztül, egészen az agyig terjednek (*Bagnoli és mtsai., 2003*). A fent említett fiziológiai feladat betöltése mellett a gerinces retina a központi idegrendszeri kutatások széles körben elterjedt kísérleti modellje. Ennek legfőbb oka, hogy felépítése az agyhoz hasonló komplexitást mutat, mindemellett egy könnyen áttekinthető, réteges struktúrával rendelkezik (*Bagnoli és mtsai., 2003*).

1.2. A patkány retina posztnatális fejlődése

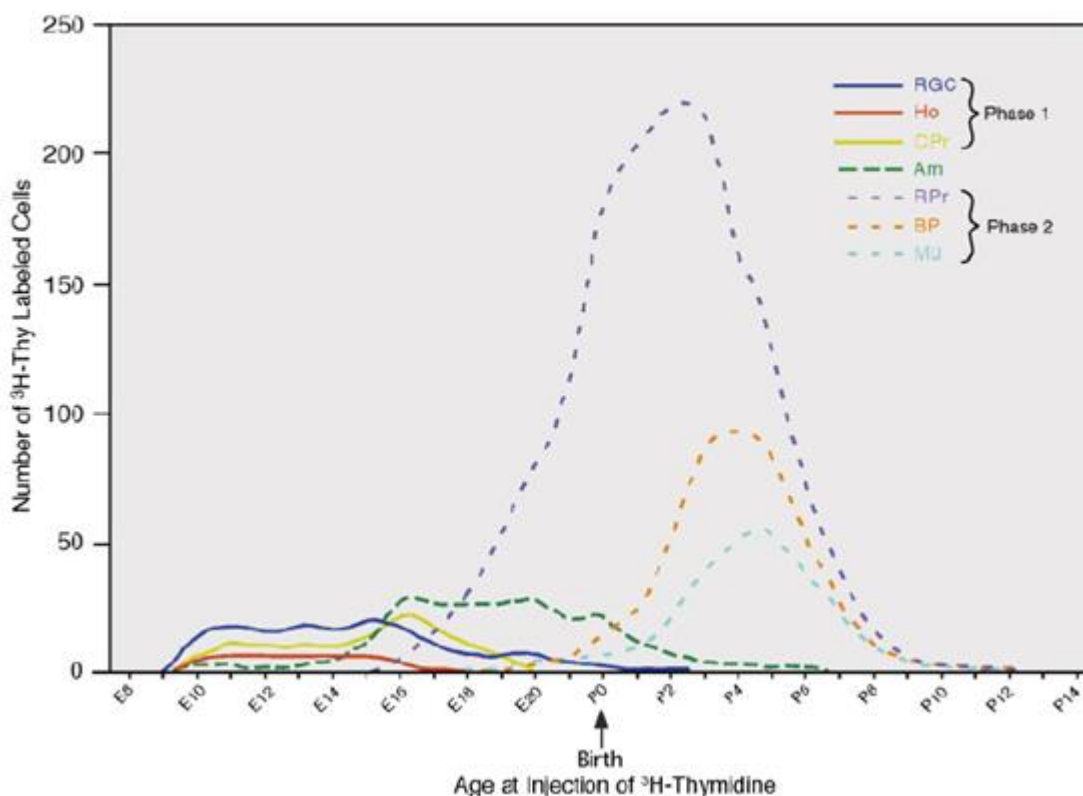
A patkány retina fejlődését számos genetikai és epigenetikai faktor összehangolt szabályozása teszi lehetővé. Az embrionális periódusban kialakul a retina progenitor sejtjeinek ideális aránya. Ezt követően a sejtek a megfelelő rétegbe vándorolnak, ott differenciálódnak, elérik végleges morfológiai jellegzetességeiket és kialakítják szinaptikus kapcsolataikat a rájuk jellemző specifikus funkciók betöltéséhez. Mindehhez azonban egy kiterjedt posztnatális fejlődési folyamatnak kell végbe mennie (*Rich és mtsai., 1997; Cook és Chalupa, 2000; Mey és Thanos, 2000; Livesey és Cepko, 2001; Reese és Galli-Resta, 2002*).

A retina fejlődése során a progenitor sejtekből a neuronok összes típusa magasabb számban és arányban alakul ki, mint amennyi a retina funkciójához kifejlett állapotban szükséges lesz. Ennek megfelelően két programozott sejthalál (PCD – programmed cell death) periódus különíthető el egymástól a gerinces retinában (*Bähr, 2000*). Az első PCD hullám a korai fejlődési szakaszban – egér embrióban a 15-17. napok (E15-E17) között – játszódik le, a retina sejtjeinek proliferációjával és migrációjával egy időben (*Frade és mtsai. 1997*), majd egy második is részt vesz a legéletképesebb sejtek szelekciójában a későbbi, szinaptogenezis körüli időszakban (*Perry és Cowey, 1982; Perry és mtsai. 1983*). Patkányban a retinális ganglion sejtek teljes populációjának ~50%-a elpusztul az első posztnatális hét során, röviddel a működési terület elfoglalását követően (*Perry és mtsai. 1983*).

A retina progenitor sejtjeinek proliferációja embrionális korban kezdődik és több proliferációs csúcs jelenik meg az első posztnatális hét végéig, végül a 10. posztnatális nap (P10) körül fejeződik be (*Rapaport és mtsai. 2004*). Szabályozásában – többek között – egy fontos intrinsic faktor, az átalakító növekedési faktor β (TGF β - transforming growth factor β) vesz részt. Ezt a citosztatikus TGF β szignált a retinális neuronok alakítják ki a második

posztnatális hét kezdetéig, létrehozva ezzel a mitotikus nyugalmi periódust a retinában (Close és mtsai. 2005).

A retina sejtjeinek képződése két szakaszra bontható a proliferálódó sejttípusok és annak függvényében, hogy a retina fejlődésének korai vagy kései stádiumában jelennek-e meg (2. ábra).



2. ábra – A retinális sejttípusok proliferációs görbéi a fejlődés során (Rapaport és mtsai. 2004)

Jelmagyarázat: RGC – retinális ganglion sejtek; Ho – horizontális sejtek; CPr – csap fotoreceptorok; Am – amakrin sejtek; RPr – pálcika fotoreceptorok; BP – bipoláris sejtek; Mü – Müller-glia sejtek; Phase 1: a proliferáció első fázisa; Phase 2: a proliferáció második fázisa.

A proliferáció első fázisában (Phase 1) létrejövő sejtek – retinális ganglion sejtek (RGC), horizontális sejtek (Ho), csap fotoreceptorok (CPr) – korán jelennek meg a retinában (E9), a proliferáció viszonylag rövid időt ölel fel (E9-P2,5). A második fázis (Phase 2) sejtjei – pálcika fotoreceptor (RPr), bipoláris sejtek (BP), Müller-glia sejtek (Mü) – később jelennek meg a retinában (E15) és a proliferáció egészen a második posztnatális hét végéig kitart (P12). Az amakrin sejtek (Am), proliferációjukban átmenetet képeznek az első és második fázis között (Rapaport és mtsai., 2004).

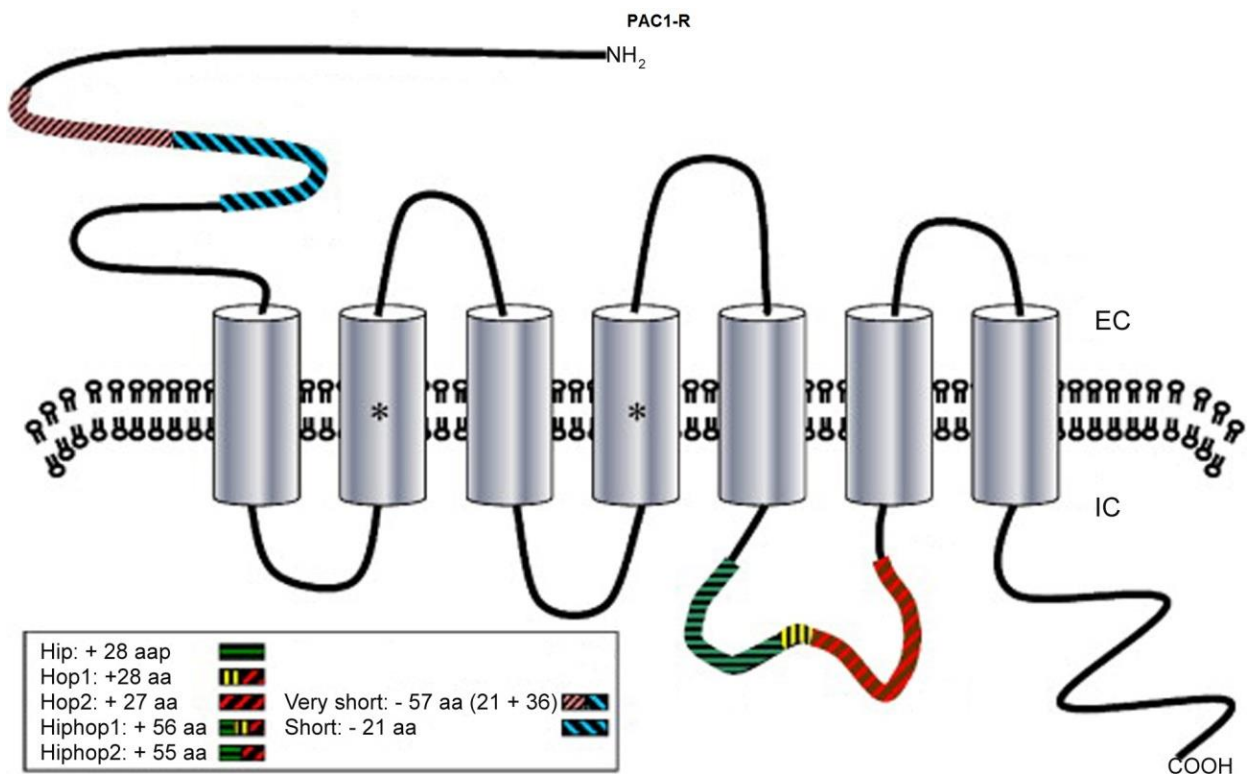
A patkány retina sejtípusai tehát meghatározott sorrendben jelennek meg a neurogenesis során, de a dolgozat szempontjából kiemelt figyelmet érdemel az utolsó két sejtípus proliferációjának sorrendje. Eleinte a Müller-glia sejtek proliferációja úgymond megelőzi a bipoláris sejteket, ez az állapot azonban a citogenesis során többször felcserélődik. Ennek a jelenségnek a hátterében valószínűleg az áll, hogy ez a két sejtípus a patkány retinában közel szimultán módon proliferálódik (*Rapaport és mtsai. 2004*).

A második posztnatális hét elején (P10-P12) befejeződik a citogenesis és a sejtek a végleges helyükre érkezve befejezik morfológiai fejlődésüket. Ebben az időszakban indul be a szinaptogenesis, mely során a differenciálódott sejtek kialakítják szinaptikus kapcsolataikat a megfelelő sejtekkel. A retina fejlődése során a horizontális szinaptikus kapcsolatok megelőzik a vertikálisak kialakulását (*Blanks és mtsai., 1974*). A rendelkezésre álló adatok alapján a patkány retinában a szinaptogenesis P12 körül tetőzik a belső rostos rétegben (IPL – inner plexiform layer) (*Wässle, 1991*), mely megelőzi a szem kinyílását. Bár a ganglion sejtek dendrit átrendeződése születés előtt megkezdődik (*Horsburgh és Sefton, 1987*), a szemnyílást megelőzően a legintenzívebb ez a folyamat (*Yamasaki és Ramoa, 1993*). Az afferens bipoláris sejtektől származó ribbon szinapszisok azonban csak késői posztnatális korban fejezik be fejlődésüket (*Horsburgh és Sefton, 1987*). A korai posztnatális fejlődés során jelenlévő szinaptikus specializációk az IPL-ben (*Wässle, 1991*), valamint a P2-nél megjelenő szinaptikus vezikulum fehérjék (*Dhingra és mtsai., 1997*) arra engednek következtetni, hogy a neurotranszmitterek talán már ebben a fejlődési szakaszban is felszabadulnak, illetve szerepet kapnak akár szinaptikus, akár parakrin regulátorokként (*Bagnoli és mtsai., 2003*). Látszólag tehát a retina ún. mikrokörnyezete a szem kinyílása előtt elengedhetetlen a neuronok nyúlványainak megfelelő növekedéséhez és a szinaptikus kapcsolatok kialakításához. A legtöbb neuroaktív anyag a késői prenatális vagy korai posztnatális időszakokban figyelhető meg, mikor az IPL szinaptogenetikai folyamatai még alig indultak be. A neurotranszmitterek többsége már az előtt expresszálódik, hogy a retinális sejtkapcsolatok képesek lennének a jeltovábbításra, ezért feltételezhető, hogy a retinális neuroaktív anyagok a korai fejlődési stádiumokban a retina fejlődésbiológiájának szabályozásában kapnak szerepet. Például, a kolinerg amakrin sejtek már a késői embrionális/korai posztnatális időszakban is detektálhatók (*Koulen, 1997*), valamint az említett periódusban a gamma-amino-vajsav (GABA) és N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorok is jelen vannak a patkány retinában (*Koulen és mtsai., 1996*).

1.3. Hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) a patkány retinában

A PACAP – hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid – egy elsőként a hipotalamuszból izolált, az adenilát-cikláz (AC) enzim aktivitásának szabályozásában szerepet játszó polipeptid (Miyata és mtsai., 1989; Arimura, 2007), mely a VIP/szekretin/glukagon/GHRH szupercsalád tagja (Zhou és mtsai., 2002). Az emlős szervezetben egy 38 (PACAP-38) és egy 27 (PACAP-27) aminosav hosszúságú formában expresszálódik (Zhou és mtsai., 2002).

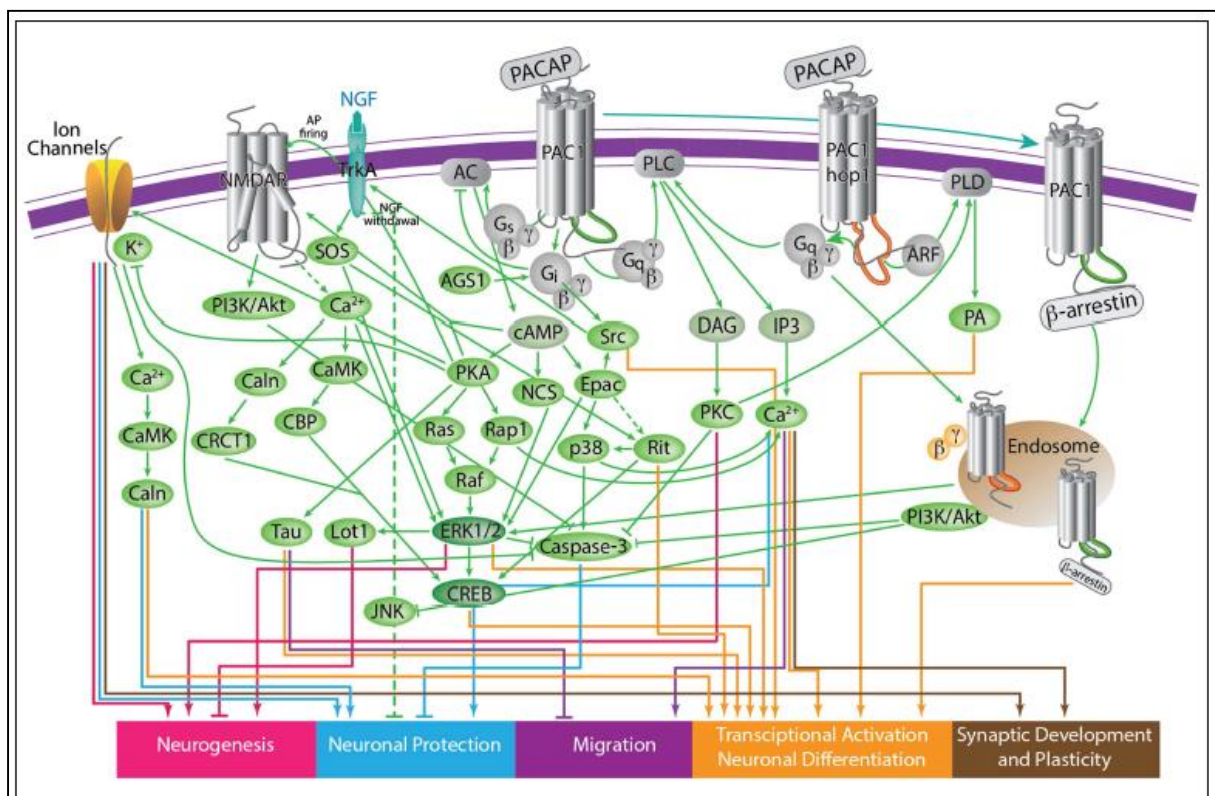
A PACAP hatásai G-protein kapcsolt, metabotróp receptorokon keresztül fejeződnek ki, melyeknek három típusát sikerült ezidáig izolálni: VPAC1, VPAC2 és PAC1 receptorokat. A PAC1 receptornak további izoformái különböztethetők meg patkányban, a receptor extracelluláris és harmadik intracelluláris hurok régiójába beépülő, illetve onnan kivágódó, különböző hosszúságú aminosav kazettáknak megfelelően. Az alternatív splicing eredményeként létrejövő izoformákat a **3. ábra** foglalja össze (Zhou és mtsai., 2002, Dickson és Finlayson, 2009).



3. ábra - A PAC1 receptor splice-variánsai (Dickson és Finlayson, 2009)

A PAC1 receptor közvetett kapcsolatban áll többek között az AC és foszfolipáz C (PLC) jelátviteli útvonalakkal. Az AC aktiválása megemeli a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szintjét a sejtben, valamint aktiválja a protein-kináz A-t (PKA), mely ezt követően

bekapcsolja a mitogén aktivált protein-kináz (MAPK) útvonalat. A MAPK útvonal azonban aktiválódhat AC-től függetlenül is. A PLC aktiválása Ca^{2+} felszabadulást eredményez, miközben aktiválja a protein-kináz C-t (PKC). Az itt említett, PAC1 receptor által irányított jelátviteli mechanizmusok azonban eltérőek lehetnek a különböző sejtípusokban, az expresszált receptor izoformától, illetve az aktuális PACAP koncentrációtól és egyéb faktorok jelenlététől függően (Waschek 2002, Vaudry és mtsai., 2009, Shioda és mtsai., 2006). A PAC1 receptorokhoz köthető szignalizációs útvonalakat a **4. ábra** foglalja össze.



4. ábra - A PAC1 szignalizációs útvonalak és a PACAP neurogenézisben betöltött szerepkörének összefoglalása (Blechman és Levkowitz, 2013)

A PACAP, pleiotrópikus hatású hormonként számos élettani folyamat szabályozásában részt vesz. Jelen dolgozatban laboratóriumunk érdeklődési körének megfelelően a PACAP retinára kifejtett hatásai kiemelt helyet kapnak. Számos irodalmi adat áll rendelkezésre a PACAP és a glutamát komplex kölcsönhatásairól, melyek során a fényinger elvezetésének és a retina cirkadián ritmusának szabályozásában is részt vesznek (Köves és mtsai., 2000, Hannibal és Fahrenkrug 2004, Son és mtsai., 2007). A PACAP retinoprotektív hatása számtalan kutatómunka tárgyát képezi. A PACAP jótékony hatása igazolt a retina excitotoxikus sérülései, az ischemia vagy UV-fény által előidézett neurodegenerációk és számos retinopátia esetében is (Atlasz és mtsai., 2010). A neuroprotektív hatás jelen tudásunk szerint a PAC1

receptorokon keresztül fejeződik ki (Somogyvári-Vigh és Reglődi, 2004, Ohtaki és mtsai., 2008, Shioda és mtsai., 2006). A napjainkban rendelkezésre álló eredmények alapján tehát feltételezhető, hogy a PACAP egy fontos neuroprotektív ágens, mely központi szerepet kaphat a retina számos rendellenességének gyógyításában, illetve megelőzésre irányuló terápiák kifejlesztésében.

A patkány embrionális fejlődése során a PACAP mRNS elsőként az E20 napon expresszálódik detektálható szinten (Skoglosa és mtsai., 1999), amely jelzi, hogy a PACAP az idegrendszer fejlődésére is hatással van (4. ábra). A különböző szignalizációs útvonalak függvényében befolyásolhatja a proliferációt, migrációt, differenciációt és szinaptogenezist (Blechman és Levkowitz, 2013).

Számos adat támasztja alá a PACAP és receptorainak korai jelenlétét a retinában, illetve annak különböző rétegeiben. Egy friss – PAC1 transzgénikus egereken végzett – kutatás eredményei szerint a retinogenezishez és a normál látó funkciók kialakulásához elengedhetetlen a PACAP szignalizáció (Lang és mtsai. 2010). Fénymikroszkópos és ultrastruktúrális vizsgálatok alapján PACAP immunpozitív sejtek láthatók az interneuronális és ganglion sejtes rétegben, valamint a belső rostos és idegrostos rétegek is pozitív jelölést mutatnak (Izumi és mtsai. 2000, Seki és mtsai. 2000a). A PAC1 receptor expressziója is kimutatható a neonatális patkány retinában és az immuncitokémiai jelölés bizonyítja jelenlétét konkrétan a neuroblast rétegben (Silveira és mtsai. 2002). Részletes lokalizációs vizsgálatok adatai alapján a PAC1 mRNS expressziója eltérő erősségű az egyes retinális rétegekben: erős expressziót mértek a ganglion sejtes, a belső sejtes és az idegrostok alkotta rétegekben, míg a külső- és belső rostos, a külső sejtes és a fotoreceptorok külső szegmenseit tartalmazó rétegekben gyengébb expressziós szinteket mutattak ki (Seki és mtsai. 1997, 2000b).

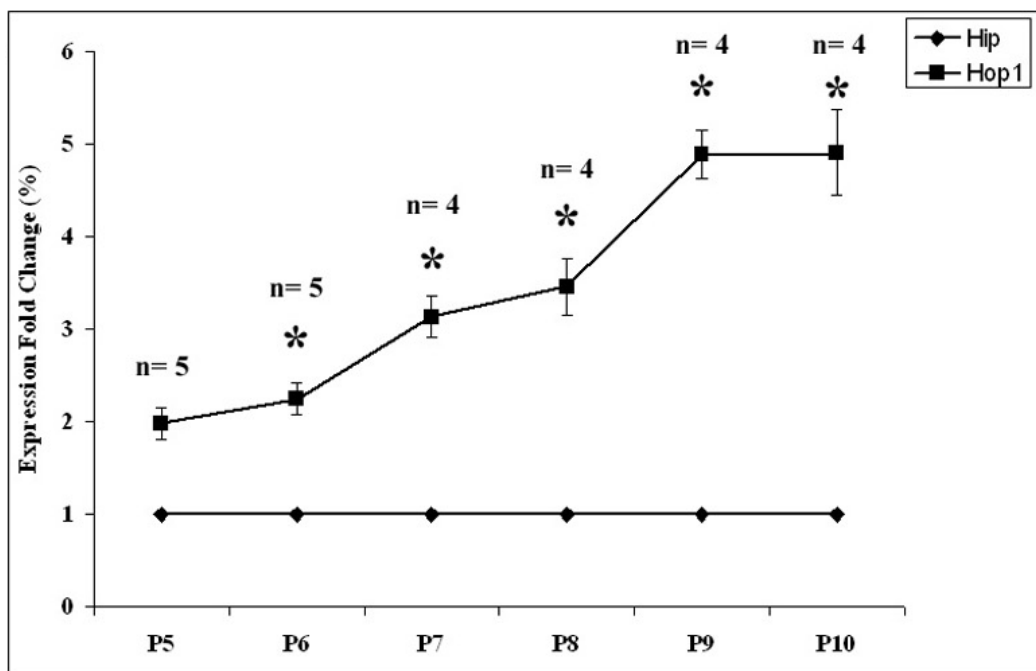
Ebből kiindulva a PACAP, neuroaktív anyagként minden bizonnyal szerepet kap a retina embrionális, majd posztnatális fejlődésének szabályozásában.

1.4. Kutatómunkánk előzményei

Munkacsoportunk előzetes eredményei alapján a PAC1 receptor izoformák közül négy (Null, Hip, Hop1, Hiphop1) expresszálódik a posztnatális patkány retinában, expressziós profiljuk pedig az adott izoformára jellemző eltéréseket mutat P0 és P20 között. A vizsgált időintervallumban a Hip és Hop1 izoformák expressziós szintje volt a legmagasabb, de a Hip expressziója folyamatos csökkenő tendenciát mutatott P5 és P20 között, míg a Hop1 expressziója éppen ellenkezőleg változott. Ezek alapján feltételezhető, hogy a retina

fejlődésének második posztnatális hetében a receptor izoformák egy komplex splicing reguláció hatása alatt állnak (*Lakk és mtsai., 2012*).

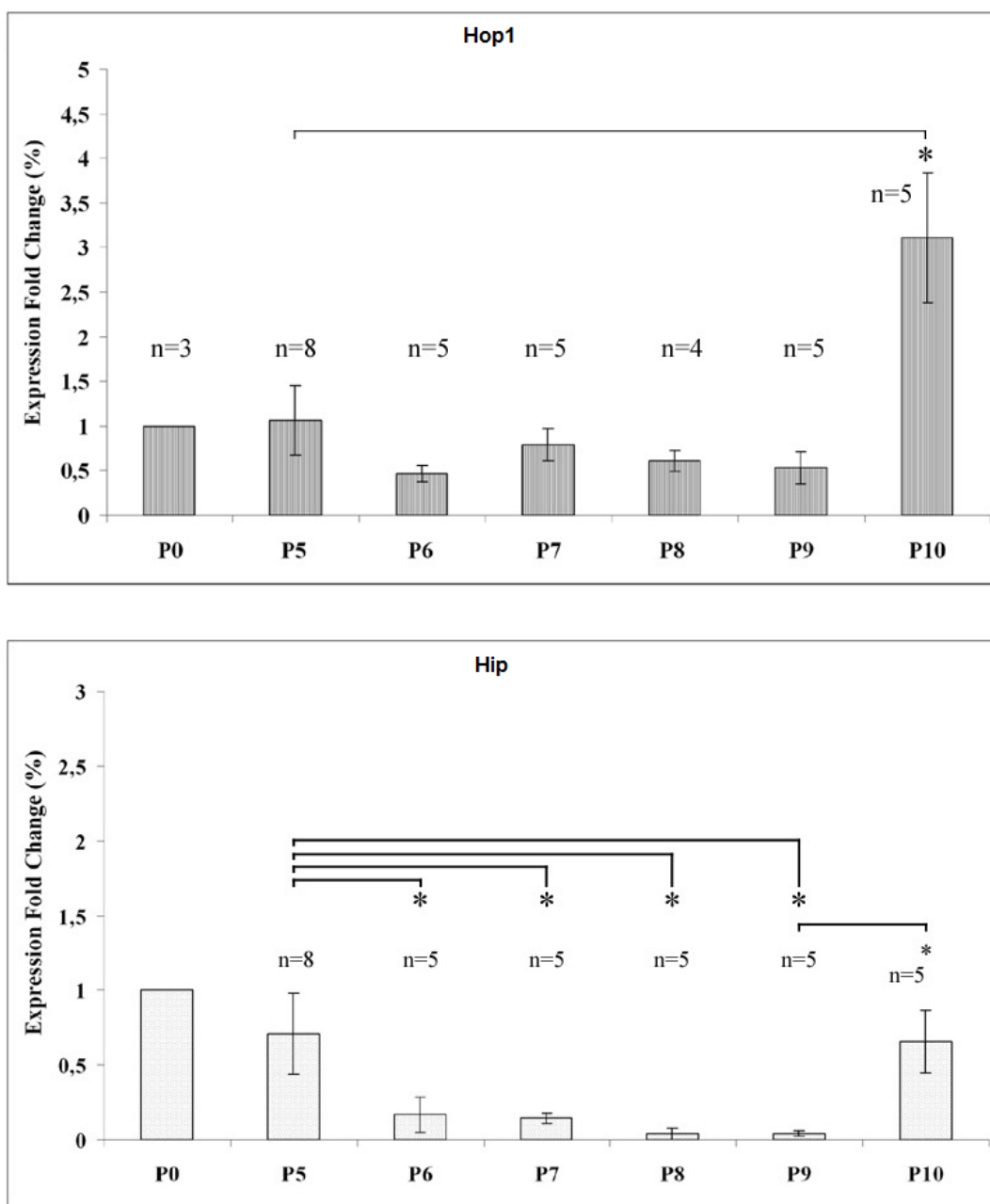
A felvetett hipotézis igazolásának reményében munkacsoportunk célul tűzte ki, hogy az említett két izoforma expressziós szintjeit egy erre irányuló vizsgálat keretein belül komplexebb módon hasonlíthassa össze, valamint, hogy a két izoforma közötti dominancia váltás pontos időszakát meghatározhassa. RT-PCR vizsgálataik eredményei (**5. ábra**) azt mutatják, hogy P5-nél körülbelül kétszer annyi Hop1 mRNS detektálható, mint amennyi Hip. Az első statisztikailag is szignifikáns különbség a két izoforma expressziós szintje között P6-nál volt mérhető, de P10-ig folyamatosan emelkedett a Hop1 mRNS expressziós dominanciája. Megjegyzendő, hogy az említett RT-PCR kísérletsorozatban a Hop1 mRNS expressziós szintjét viszonyították a Hip mRNS-éhez, az utóbbit használva referenciaként (*Dénes és mtsai., 2013*).



5. ábra - Hip/Hop1 izoformák aránya a posztnatális fejlődés 5. és 10. napja között (*Dénes és mtsai., 2013*)

A Hop1 mRNS expressziós dominanciája mögött három esemény állhat. Egyfelől lehetséges, hogy a Hip mRNS expressziós szintje csökken drasztikusan, másfelől fennállhat a Hop1 expresszió emelkedése is, de lehetséges az is, hogy a két izoforma viszonya a két említett esemény kombinációjaként alakult ki. További vizsgálataikban erre is választ kapva (**6. ábra**), P0 mintákat referenciaként felhasználva azt tapasztalták, hogy a Hop1 expressziós szintje alig változik P5 és P9 között, P10-nél azonban szintje kiugróan megemelkedik, míg a

Hip szintje az adott időszakban folyamatosan csökken, bár érdekes módon, a Hop1-hez hasonlóan, P10-nél expressziós szintje megemelkedik (Dénes és mtsai., 2013).



6. ábra - A Hip és Hop1 expressziós szintek változása P5 és P10 között (Dénes és mtsai., 2013)

2. Problémafelvetés/Célkitűzés

A PAC1 receptor említett Hip és Hop1 izoformája a patkány retina posztnatális fejlődésének második hetében nagy mennyiségben átíródik, expressziója jól detektálható. Ezek az adatok alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a PACAP szerepet kap a retina fejlődési folyamatában. A második posztnatális héten továbbá megváltozik a Hip/Hop1 receptorok dominanciaviszonya. A Hip izoforma expressziós szintje ez idő alatt folyamatosan csökken, P9-nél alig detektálható, a Hop1 izoforma jelenléte viszont a teljes időszak alatt stabil. Mivel a két izoforma különböző szignalizációs útvonalakat képes aktiválni, a Hip/Hop1 dominancia váltás nyomán azt feltételezhetjük, hogy a retina posztnatális fejlődésének ebben az időszakában a PACAP az eddigétől eltérő hatást fejthet ki a fejlődő sejtekre. A PAC1 receptor izoformák expresszióját befolyásoló külső, illetve belső faktorok azonosítása és a sejtekben zajló alternatív splicing szabályozásának megértése további kutatómunka tárgyát képezi.

Jelen dolgozatban célul tűztük ki:

- hogy fényt derítsünk a Hip és Hop1 receptor izoformák dominanciaváltásának hátterében álló mechanizmusokra;
- hogy megállapítsuk, hogy a folyamatos fényinger, illetve annak hiánya, miként befolyásolja a két receptor izoforma expressziós mintázatát;
- hogy beazonosítsuk az izoformák kifejeződését esetlegesen szabályozó mikroRNS (miRNS) szekvenciákat;
- és kimutassuk azok expressziós szintjének lehetséges korrelációját a Hip és Hop1 receptor izoformákéval normál-, fény- és sötét adaptált fejlődési körülmények között.

3. Anyag és módszer

3.1. Állatok és szövet preparáció

A kísérletekhez albinó Wistar patkányokat használtunk, P5 és P10 kor között. Három kísérleti csoportot hoztunk létre. Első csoportunk normál fejlődési körülmények között nevelkedett, azaz biztosítottuk a 12 órás sötét/fény ciklust. A második csoportba tartozó állatok 24 órás konstans megvilágításba kerültek (fényadaptált, LA), míg a harmadik csoport 24 órás fény deprivációnak volt kitéve (sötét adaptált, DA). A sötét adaptált állatok retináját vörös fényenél preparáltuk, elkerülve ezzel a retina ingerlését. A retinák disszekciója minden esetben ugyanabban a napszakban történt, hogy kiküszöböljük a PAC1 receptor mRNS-ének lehetséges cirkadián ritmusából adódó expressziós eltéréseit.

A kísérletek alatt az állatokkal való bánásmód és a kísérleti eljárások megfeleltek a Pécsi Tudományegyetem etikai követelményeinek (BA02/2000-6/2006). Az állatokat a kísérlet megkezdése előtt minden esetben izoflurán (Forane; Abbott Laboratories Ltd., Queenborough, UK) inhalációval altattuk, s csak ezt követően dekapitáltuk. A szemek eltávolítása után a retinák preparációját dietil-pirokarbonát (DEPC) kezelt foszfát pufferelt fiziológias sóoldatban (PBS) végeztük el.

3.2. RNS extrakció és reverz transzkripció

A szövet lizátumot 21G injekciós tűn történő átszívásokkal készítettük el. Totál RNS esetében RLT Plus puffert, miRNS esetében Quiazol reagenst adtunk a retinákhoz. A lizátum homogenizációjához QIAshredder oszlopot használtunk (Qiagen, Valencia, CA, US). A totál RNS extrakciót és tisztítást RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) használatával végeztük, míg a miRNS izoláláshoz miRNeasy Mini Kitet alkalmaztunk (Qiagen). A teljes procedura – mely magába foglalta a genomikus DNS eliminációját – a gyártó utasításai szerint zajlott.

Az RNS koncentrációk meghatározásához BioPhotometer Plus (Eppendorf, Hamburg, Germany) készüléket használtunk, mellyel 260 nm-en mértünk OD (optical density) értéket. A minták tisztaságát a 260/280 nm közötti abszorpciós ráta alapján határoztuk meg, mely minden esetben 1,8 vagy annál magasabb érték volt. Az RNS extraktumokat további felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

Totál RNS esetén 2 µg RNS-t konvertáltunk cDNS-sé reverz transzkripcióval. Az 50 µl-es reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 10 µl 5X RT puffer, 2 µl 5 µM oligo(dT) primer, 2 µl 2,5 µM dNTP keverék, 1 µl 0,1 µM DTT, 1 µl RevertAid H minus Reverz Transzkriptáz (ThermoScientific, Waltham, Mass, USA), 2 µg totál RNS és kiegészítő

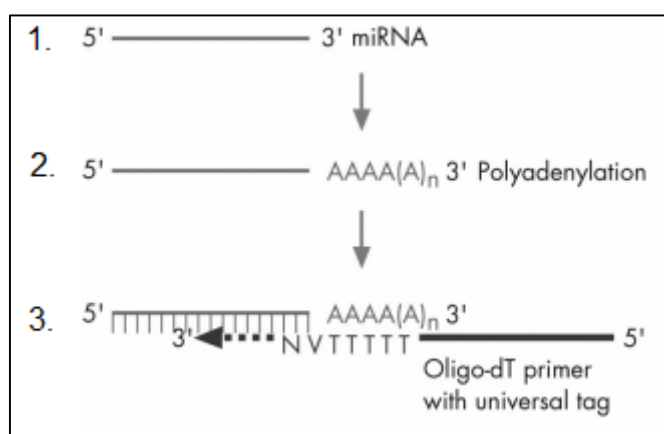
mennyiségű, RNáz mentes víz. A reverz transzkripciót PTC-200-as (Peltier Thermal Cycler; MJ Research) PCR készülék segítségével végeztük el az alábbi program alapján:

- 65 °C – 5 min
- 25 °C – 10 min
- 37 °C – 20 min
- 42 °C – 50 min
- 85 °C – 3 min

miRNS esetén 500 ng-ot írtunk át cDNS-sé, miScript RT Kitet alkalmazva (Qiagen). A 20 µl-es reakció elegy a következő összetevőket tartalmazta: 4 µl 5X HiSpec puffer, 2 µl 10X Nucleics Mix, 2 µl RT Mix, 500 ng miRNS és kiegészítő mennyiségű, RNáz mentes víz. A reakciót szintén PTC-200-as PCR készülékkel hajtottuk végre az alábbi programon:

- 37 °C – 60 min
- 95 °C – 5 min

A miRNS-ek a természetben előforduló, 22 nukleotid hosszúságú, nem kódoló RNS-ek, melyek a mRNS-ektől eltérően, nem esnek át poliadeniláción normál körülmények között. Ezért az érett miRNS-ek reverz transzkripciójának első lépésében a poly(A) polimeráz egy adenzin monofoszfátok sorozatából álló végződést illeszt a miRNS 3' végére. Az oligo dT primer ehhez a végződéshez hibridizálva iniciálja a reverz transzkripciót. Esetünkben a poliadeniláció és a reverz transzkripció egymással párhuzamosan lezajló folyamat, egyazon reakcióelegyben (7. ábra).



7. ábra – A miRNS reverz transzkripció elve és lépései (miScript PCR System Handbook)

3.3. Kvantitatív Real-Time polimeráz láncreakció (RT-PCR)

3.3.1 TaqMan alapú RT-PCR

A Hip és Hop1 mRNS-ek egymáshoz viszonyított expressziós változásainak felderítéséhez RT-PCR-t alkalmaztunk, mely során szekvencia specifikus fluoreszcens festékekkel jelölt próbákat használtunk (**1. táblázat**). Annak érdekében, hogy a két receptor izoforma expressziós szintjeit egymástól függetlenül vizsgálhassuk bevezettünk egy endogén kontrollt. A glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) egy állandóan és nagy mennyiségben, a retinában is expresszálódó enzim, melynek kifejeződésére nincsenek hatással kísérleti beállításaink, ezért megfelelő viszonyítási alapként szolgált a valós receptor expressziós szintek megállapításához. Referenciaként egy P5 korú, normál fejlődésű állatból származó mintát jelöltünk ki. A mintákból minden esetben három párhuzamos reakciót futtattunk és vizsgáltunk. A 20 µl-es reakció elegyek összetételét az **2. táblázat** mutatja be. A felhasznált reagenseket a LifeTechnologies cég (Grand Island, USA) biztosította.

Név	Hossz	Szekvencia	5' modifikáció	3' modifikáció
Hop1 próba	28	CTACTTCAGCTGCGTGCAGAAATGCTAC	56-FAM	ZEN/BFQ
Hip próba	24	TTTCCTACGGCTGGCCCGCTCCAC	TAMRA NHS észter	IBFQ
GAPDH próba	27	TATGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGAC	5MAXN	3IAbkFQ
Hop-TAQa	17	CATGGGAGGCAACGAGT		
Hiphop12b	25	CACAAGTCTTTCCCTCTTGCTGACG		
GAPDH _a	22	ACAGCAACTCCCATTCTTCCAC		
GAPDH _b	20	GCAACTGAGGGCCTCTCTCT		

1. táblázat - TaqMan próbák és primerek szekvenciái

PCR MM	Mennyiség/ cső
2xTaqMan Fast Advanced Master Mix	10 µl
5 µM forward primer	0,5 µl
5 µM reverse primer	0,5 µl
12,5 µM Hip próba	0,2 µl
12,5 µM Hop1 próba	0,2 µl
12,5 µM GAPDH próba	0,2 µl
cDNS	3 µl
dH ₂ O	5,6 µl

2. táblázat - TaqMan PCR Master Mix összetétele

Az RT-PCR reakciókat StepOnePlus (Applied Biosystems) készüléken futtattuk, a **3. táblázatban** feltüntetett program szerint:

	Hőmérséklet	Idő	Ciklus szám
Denaturáció	95 °C	1 min	1
Denaturáció	95 °C	10 sec	40
Primer leköttetés (annealing)	57 °C	20 sec	
Extenzió	60,5 °C	20 sec	

3. táblázat - A TaqMan PCR program beállításai

Az expressziós különbségek megállapításához ΔC_T módszert alkalmaztunk. A C_T (cycle threshold) azaz ciklusküszöb az az érték, melynél a vizsgált gén detektálható számú amplikonban van jelen a PCR reakció során. Ezért minél kisebb a C_T érték, annál nagyobb mennyiségben expresszálódik az adott gén. A ΔC_T értéket a vizsgált gén endogén kontrollhoz történő normalizációjával számíthatjuk ki. Az expressziós különbségek megállapításához 2-t a ΔC_T kitevőjű hatványra emeljük ($2^{\Delta C_T}$ = Expression fold).

Mivel minden egyes mintában mindegyik receptor izoforma expresszióját a GAPDH szintjéhez viszonyítottuk, megkaptuk a két izoforma közötti expressziós különbséget is, illetve a különböző korú retinák közötti különbségek is kirajzolódtak.

3.3.2 SybrGreen alapú RT-PCR

A PCR reakciókhoz szükséges miRNS szekvenciákat a miRBase adatbázis segítségével azonosítottuk be, kiválasztva a szekvenciájuk alapján legnagyobb valószínűséggel Hip illetve Hop1 mRNS-re specifikus miRNS-eket. Hip esetében a miR137-es (ACG GGU AUU CUU GGG UGG AUA AU), míg Hop1 esetében a miR147-es (GUG UGC GGA AAU GCU UCU GCU A) szekvenciákra esett a választásunk. A Hip és Hop1 miRNS primerek szekvenciáit a **4. táblázat** tartalmazza. Referenciaként ugyan azt a P5 korú mintát használtuk fel, mint a mRNS-ek esetében, de ebben a vizsgálatban az alkalmazott endogén kontroll az U6 volt. Az U6 snRNS (snRNS= small nuclear RNS) azért bizonyul jó endogén kontrollnak, mert számos élőlényben megtalálható és szekvenciája alig mutat variabilitást, az evolúció során szigorúan konzerválódott. A 20 µl-es reakció elegyek összetételét az **5. táblázat** sorolja fel.

Név	Primer szekvencia
miR-137-5p	ACGGGTATTCTTGGGTGGATAA
miR-147	GTGTGCGGAAATGCTTCTGCTA
rtU6	CGGCAGCACATATACTAAAATTGG

4. táblázat – A kísérletekben vizsgált miRNS-ek és primerek szekvenciái

MasterMix	Mennyiség/cső
QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 µl
Univerzális primer (reverse)	1 µl
Forward primer	0,5 µl
cDNS	2 µl
dH ₂ O	6,5 µl

5. táblázat – A SybrGreen PCR reakció elegyek összetétele

A reakció futtatásához a következő programot állítottuk össze (**6. táblázat**):

	Hőmérséklet	Idő	Ciklus szám
Denaturáció	95 °C	10 min	1
Denaturáció	95 °C	10 sec	50
Primer leköttődés (annealing)	55 °C	20 sec	
Extenzió	72 °C	20 sec	

6. táblázat - A SybrGreen alapú PCR program

3.3.3 Adataink kiértékelése

Eredményeink analizálásához a StepOne szoftver v2.3-as verzióját alkalmaztuk. A gén expressziós változásokat a $\Delta\Delta C_T$ módszerrel számoltuk ki, melyben a minták C_T értékei alapján a következő összefüggés alapján határoztuk meg a $\Delta\Delta C_T$ értékeket:

Egyenlet:

$$(C_{Tref,goi} - C_{Tmi,goi}) - (C_{Tref,U6} - C_{Tmi,U6}) = \Delta\Delta C_T$$

Jelmagyarázat:

- $C_{Tref,goi}$ = a referencia minta vizsgált génjéhez (goi = gene of interest) tartozó ciklusküszöb
- $C_{Tmi,goi}$ = a vizsgált minta vizsgált génjéhez tartozó ciklusküszöb
- $C_{Tref,U6}$ = a referencia minta endogén kontrolljához (U6) tartozó ciklusküszöb
- $C_{Tmi,U6}$ = a vizsgált minta endogén kontrolljához (U6) tartozó ciklusküszöb

Az expressziós változások megállapításához a $2^{\Delta\Delta C_T}$ műveletet végeztük el. Mivel az egyenlet alapján a referencia minták $\Delta\Delta C_T$ értéke 0, az expressziós változás mindig azt fogja kifejezni, hogy a vizsgált minták expressziója a referencia mintához képest hányszorosára nőtt, illetve csökkent.

3.4. Statisztikai elemzés

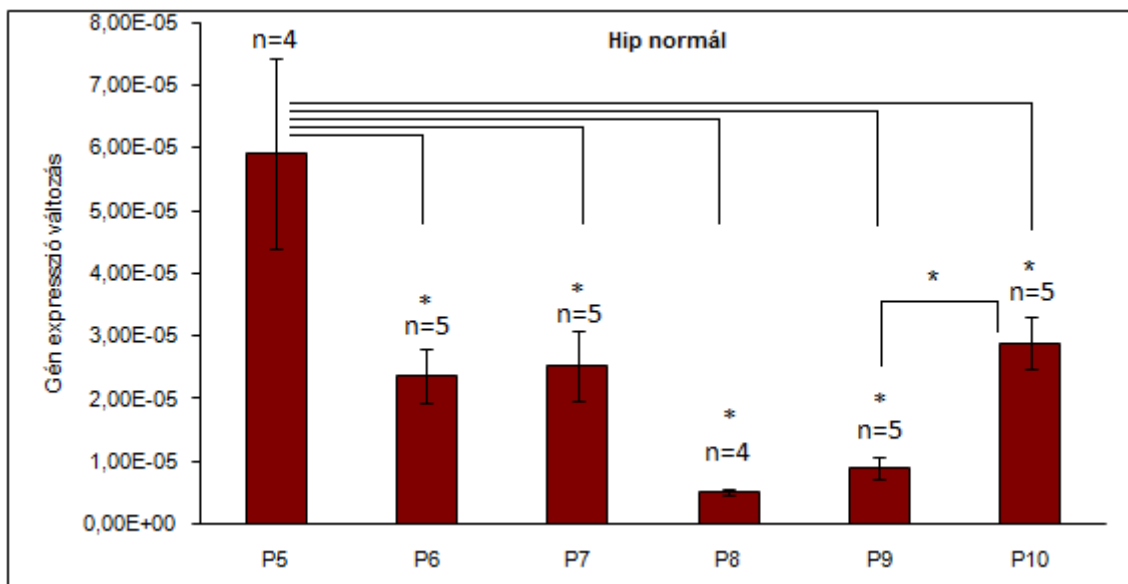
A gén expressziók közötti statisztikai szignifikanciát egy-utas ANOVA analízissel és Post-Hoc Dunnett teszttel határoztuk meg. A 0,05 alatti p-értékkel rendelkező adatokat fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. Hip és Hop1 izoformák expressziójának változásai normál fejlődésű retinában

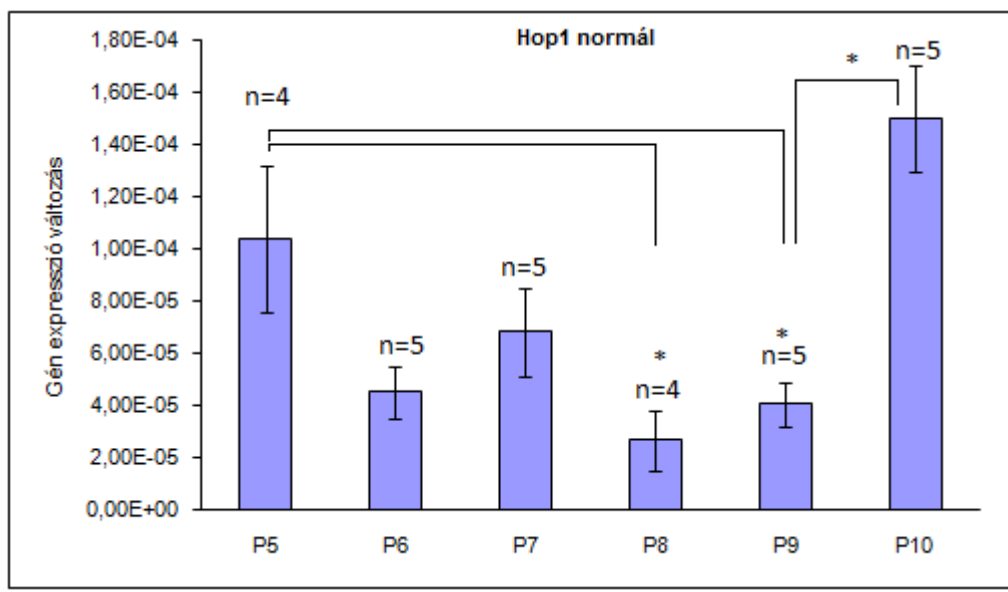
A többfajta fluorescens jelölést tartalmazó TaqMan próbáknak köszönhetően lehetővé vált több cDNS egyidejű vizsgálata ugyanazon reakció elegyben.

A **8. ábrán** jól látható, hogy a Hip mRNS expressziós szintje a P5 korú mintához viszonyítva P9 időpontig folyamatosan csökken és ez a csökkenés már P6 időpontban szignifikáns ($0,4 \pm 0,08$). P7 korban hasonló szintű az expresszió ($0,43 \pm 0,1$), majd P8 korban folytatódik az expressziós szint csökkenése ($0,09 \pm 0,01$). P9 korú retinában a Hip mRNS expressziója emelkedést ($0,15 \pm 0,03$) mutat, majd P10 korban, a P9 korú mintához viszonyítva expressziós szintje szignifikánsan megemelkedik ($3,23 \pm 0,45$), de a P5 időpontban mért expressziós szintet nem éri el.



8. ábra – A Hip mRNS expressziós mintázata normál fejlődési körülmények között (A * jelölés a szignifikáns változásokra utal)

A Hop1 mRNS expressziós mintázatában oszcillációt tapasztaltunk (**9. ábra**). P6 időpontban a Hop1 expressziója csökken ($0,43 \pm 0,1$), majd P7 korú mintában megemelkedik ($0,66 \pm 0,16$), amit P8 korban szignifikánsan csökkenés követ ($0,26 \pm 0,11$). P9 korú retinában a Hop1 expressziója kissé megemelkedik, de viszonyítási alapunkhoz képest a csökkenés még itt is szignifikáns ($0,4 \pm 0,09$). P10 fejlődési korban a Hop1 mRNS expressziója megemelkedik ($1,44 \pm 0,2$), mely emelkedés P9 korú mintához viszonyítva szignifikáns mértékű ($3,7 \pm 0,5$).



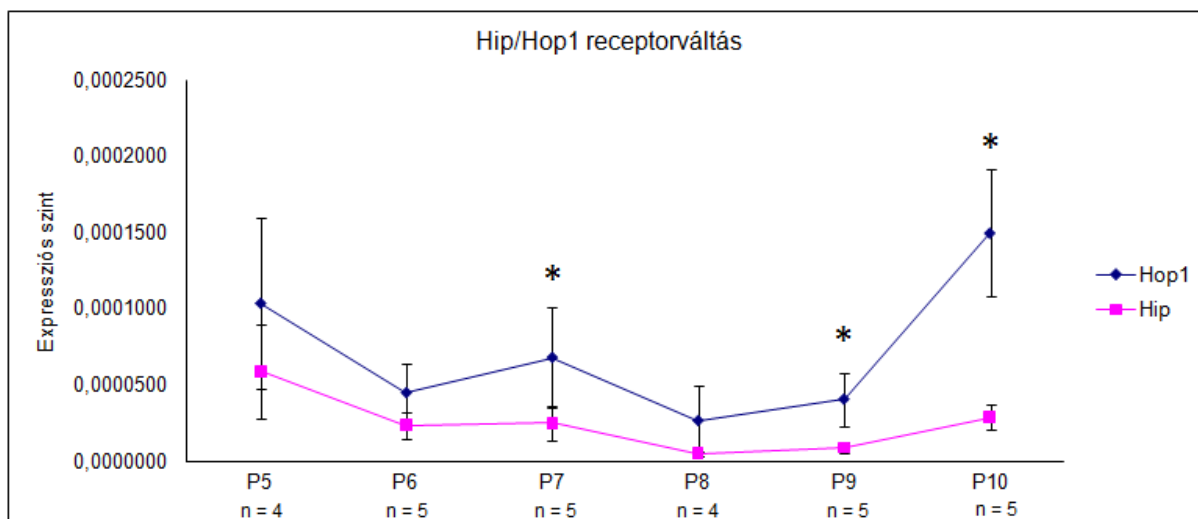
9. ábra – A Hop1 mRNS expressziós mintázata normál fejlődési körülmények között (A * jelölés a szignifikáns változásokra utal)

A Hip és Hop1 mRNS-ek expressziós szintváltozásait a 7. táblázat foglalja össze.

Exp. vált.	P6	P7	P8	P9	P10	P9/P10
Hip	0,40*	0,43*	0,09*	0,15*	0,49*	3,23*
SD ±	0,08	0,10	0,01	0,03	0,07	0,45
Hop1	0,43	0,66	0,26*	0,40*	1,44	3,70*
SD ±	0,10	0,16	0,11	0,09	0,20	0,50

7. táblázat - A Hip és Hop1 mRNS expressziójának változásai P5 mintához viszonyítva a P5 és P10 közötti fejlődési időszakban (A * jelölés a szignifikáns változásokra utal)

Ha a mért értékeket egy diagramban ábrázoljuk (10. ábra) jól látszik a Hip csökkenő és a Hop1 oszcilláló tendenciája. Ugyanakkor a görbék közötti növekvő távolság arra utal, hogy a Hop1 dominanciája fokozatosan egyre kifejezettebbé válik. A Hop1 expressziója szignifikánsan magasabb Hip expressziójánál a P7 ($2,6 \pm 0,27$), P9 ($4,6 \pm 0,5$) és P10 ($5,2 \pm 0,15$) korú minták esetében.

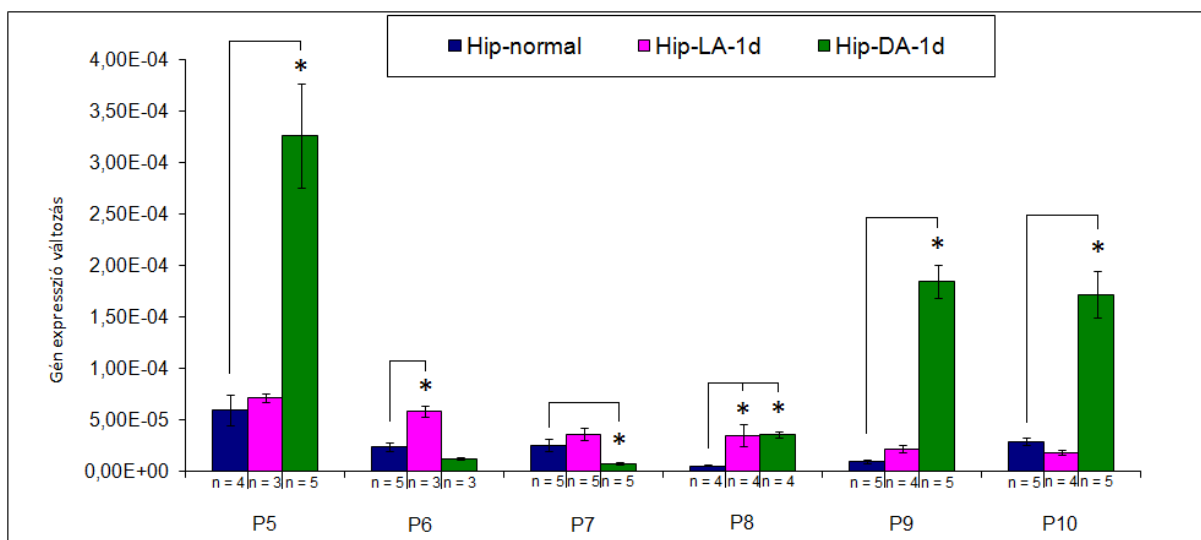


10. ábra – A Hip és Hop1 expressziós mintázatának összevetése (A *jelölés a szignifikáns változásokra utal)

4.2. A fény- és sötét adaptáció hatása a Hip és Hop1 izoforma expressziós mintázatára

4.2.1 A Hip mRNS expressziós változásai fény- és sötét adaptáció hatására

A 11. ábra és a 8. táblázat a Hip mRNS expresszióját hasonlítja össze normál, fény- és sötét adaptált fejlődési körülmények között.



11. ábra – A Hip mRNS expressziójának összehasonlítása normál fejlődésű, fény- és sötét adaptált retinákban (A *jelölés a szignifikáns változásokra utal)
(Hip-normal: normál fejlődésű retina; Hip-LA-1d: egy napos fény adaptációnak kitett retina; Hip-DA-1d: egy napos sötét adaptációnak kitett retina)

Hip	P5	P6	P7	P8	P9	P10
LA	1,21	2,47*	1,43	6,8*	2,41	0,61
SD ±	0,07	0,23	0,22	2,19	0,44	0,08
DA	5,52*	0,5	0,3*	6,94*	20,62*	5,92*
SD ±	0,86	0,04	0,03	0,54	1,82	0,78

8. táblázat - A Hip izoforma normálhoz viszonyított expressziós változásai fény- (LA) és sötét adaptált (DA) mintákban (A * jelölés a szignifikáns változásokra utal)

P5 korú állatokban a fényadaptáció nem okozott számottevő eltérést a Hip mRNS expressziós szintjében, míg P6 korban szignifikáns változást mérhettünk. P7 időpontban a fény adaptált minták Hip expressziója ismét a normálhoz közeli szinten maradt, de P8 korban szignifikáns mértékben felülmúlta azt. A P9 és P10 korú, fény adaptált minták Hip mRNS-ének expressziója a normál fejlődésű mintákban mért értékek körül ingadozott.

A sötét adaptáció P5 korú mintákban szignifikáns, kiugró expressziós növekedést eredményezett. P6 korú állatoknál azonban a Hip expresszió megközelítőleg a normál érték szintjén maradt. A P7 korú mintákban a Hip mRNS-ének normál szinthez viszonyított, szignifikáns csökkenése következett be. A P8 korú állatok Hip expressziója azonban szignifikáns mértékben megemelkedett a normál szinthez képest. A P9 és P10 korú, fény deprivációnak kitett minták Hip mRNS szintje (a P5 időponthoz hasonlóan) kiugróan magas expressziós értékeket vett fel.

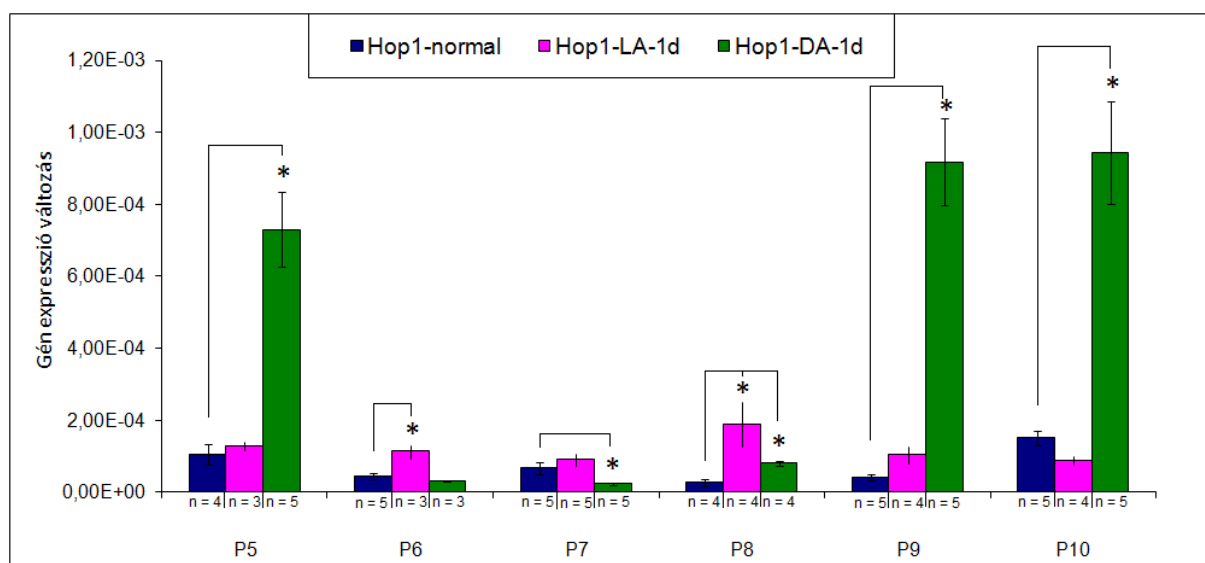
4.2.2 A Hop1 mRNS expressziós változásai fény- és sötét adaptáció hatására

A fény- és sötét adaptáció hasonló hatással volt a Hop1 mRNS expressziós szintjére, mint a Hip mRNS-ére (12. ábra, 9. táblázat).

A 24 órás megvilágításnak kitett retinákban, P5 időpontban a Hop1 mRNS megközelítőleg normál szinten expresszáldott, P6-nál azonban szintje szignifikáns mértékben megemelkedett. P7 korban a Hop1 mRNS szintje ismét a normál értékhez hasonló szintre csökkent, majd expressziójában ismét szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltunk P8 kornál. A P9 és P10 korú, fény adaptált mintákban nem mértünk a normál expressziós szinttől szignifikánsan eltérő értékeket.

A fény depriváció hatására a P5 korú retinák Hop1 expressziójának szintje kiugróan magas értéket vett fel. P6 korban az expressziós szintje nem csökkent szignifikánsan a normál szint alá. Ez a változás P7 korban azonban bekövetkezett. A P8 korú mintákban a Hop1 mRNS

szintje ismét enyhe, de szignifikáns szintű növekedésbe kezdett, majd P9 és P10 korban az expresszió ismét ugrásszerűen megemelkedett.



12. ábra – A Hop1 mRNS expressziójának összehasonlítása normál fejlődésű, fény- és sötét adaptált retinákban (*A * jelölés a szignifikáns változásokra utal*)

(Hop1-normal: normál fejlődésű retina; Hop1-LA-1d: egy napos fény adaptációnak kitett retina; Hop1-DA-1d: egy napos sötét adaptációnak kitett retina)

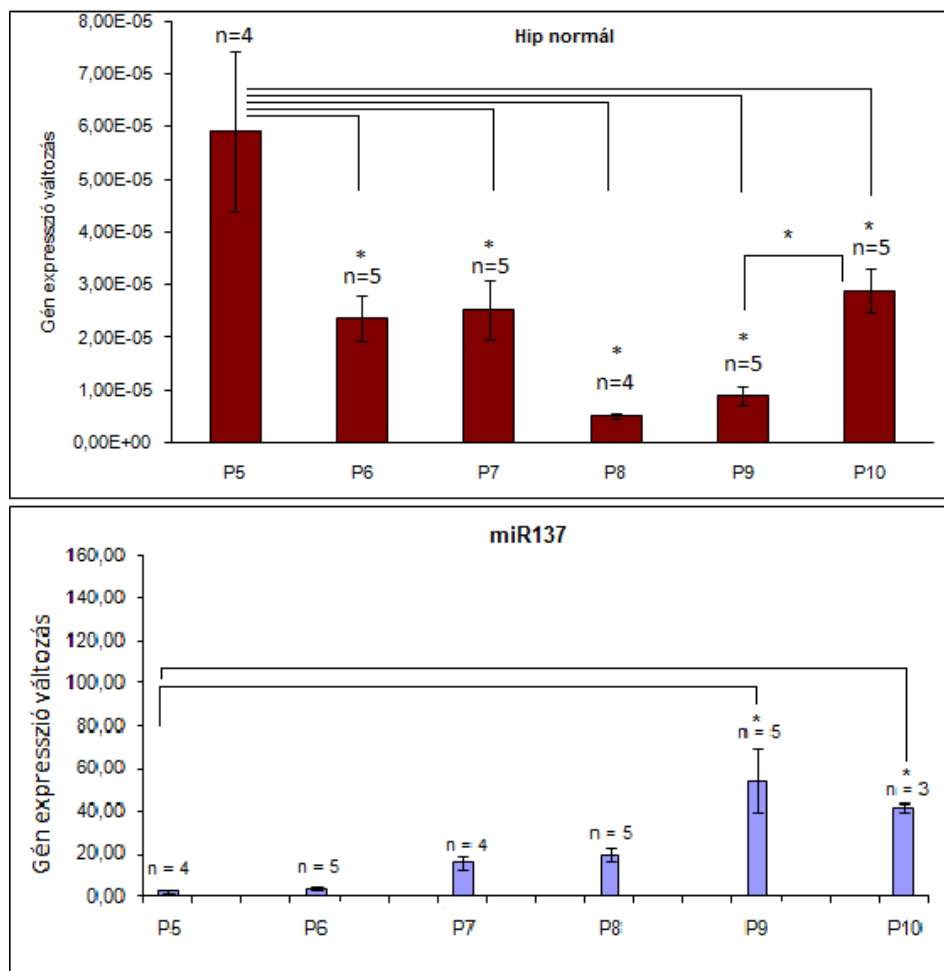
Hop1	P5	P6	P7	P8	P9	P10
LA	1,24	2,50*	1,34	4,59*	2,54	0,59
SD ±	0,13	0,41	0,24	2,3	0,61	0,08
DA	7,00*	0,7	0,34*	2,98*	22,52*	6,28*
SD ±	1,00	0,05	0,06	0,26	2,98	0,96

9. táblázat - A Hop1 mRNS normál szinthez viszonyított expressziós változásai fény- (LA) és sötét adaptált (DA) mintákban (*A * jelölés a szignifikáns változásokra utal*)

4.3. A miR137 és miR147 expressziós változásai normál fejlődésű retinában

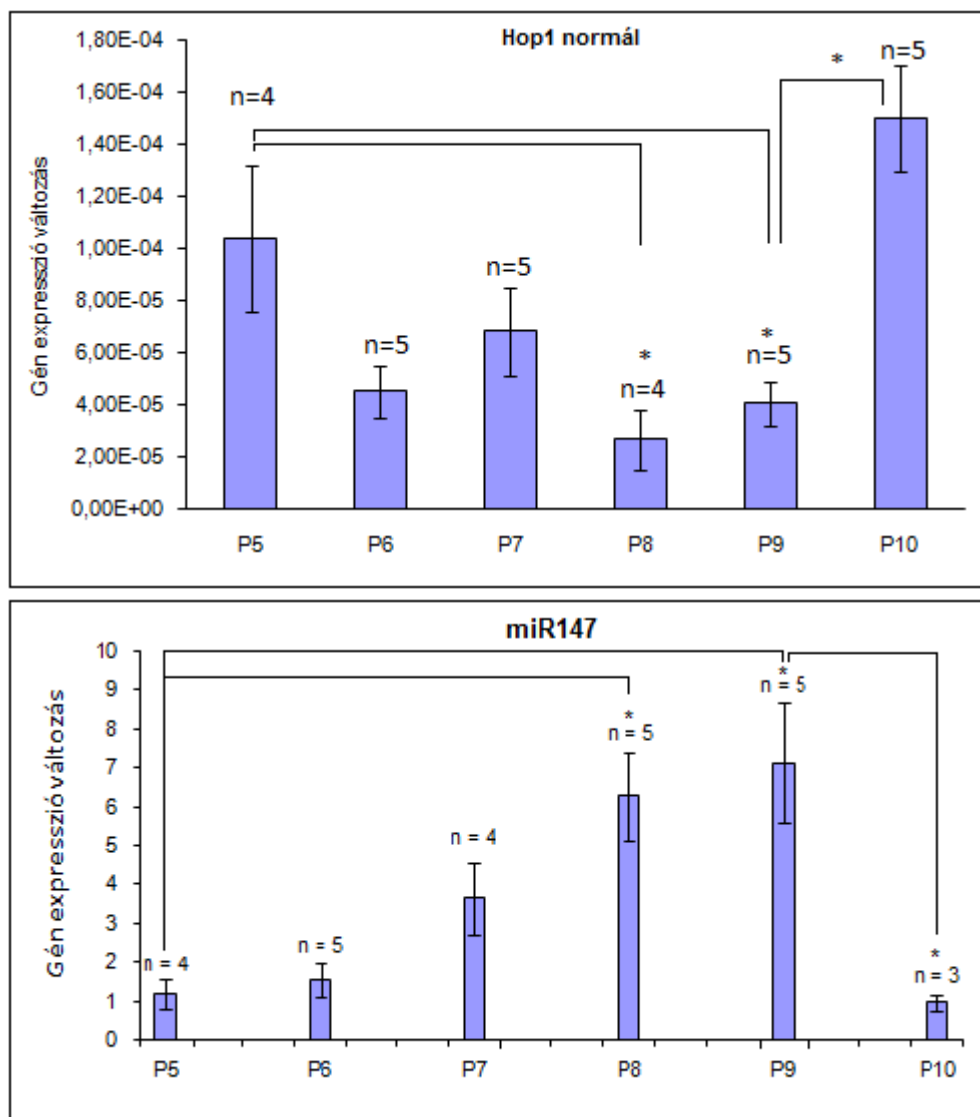
A Hip mRNS expressziójának folyamatos csökkenő tendenciájával ellentétben a miR137 expressziós szintjében (**13. ábra**) egy – nem szignifikáns mértékű – de folyamatos, enyhe növekedés fedezhető fel, mely a P9 és P10 korú mintáknál már szignifikáns mértékűvé válik. A P5 korú minták expressziós szintjéhez viszonyítva P6 kortól ($1,78 \pm 0,33$) P7 ($8,4 \pm 1,8$), majd P8 korig ($10,32 \pm 1,5$) nem szignifikáns az expressziós szintváltozás, de a P9 ($29,4 \pm 8,0$) és P10 ($22,4 \pm 1,15$) korú mintákban szignifikáns emelkedést detektáltunk a miR137 expressziójának szintjében. Kiemelendő, hogy a Hip mRNS expressziós szintjének P10

időpontban történő emelkedésével ellentétben, a miR137 expressziója nem szignifikáns mértékben csökken le.



13. ábra – A Hip mRNS és miR137 expressziós mintázatának összehasonlítása normál fejlődésű retinákban (A * jelölés a szignifikáns változásokra utal)

A Hop1 mRNS és miR147 normál expressziójának vizsgálati eredményeiben (14. ábra) is fellelhető a mRNS és a miRNS közötti fordított expressziós válasz. Ennek ékes példái a P8 ($5,4 \pm 0,98$) és P9 ($6,14 \pm 1,34$) korú minták, melyekben a Hop1 mRNS expressziójának csökkenését a miR147 emelkedése kíséri, valamint a P10 ($0,82 \pm 0,17$) korú minta, melyben a Hop1 expressziójának szignifikáns emelkedésével párhuzamosan a miR147 szignifikáns csökkenése tapasztalható.



14. ábra – A Hop1 mRNS és miR147 expressziós mintázatának összehasonlítása normál fejlődésű retinákban (A * jelölés a szignifikáns változásokra utal)

A miR137 és miR147 expressziós változásait a P5 és P10 közötti fejlődési időszakban a 10. táblázat foglalja össze.

Exp.vált.	P6	P7	P8	P9	P10
miR137	1,78	8,41	10,32	29,45*	22,44*
SD ±	0,34	1,8	1,5	8,03	1,15
miR147	1,33	3,13	5,4*	6,14*	0,82
SD ±	0,36	0,78	0,98	1,34	0,17

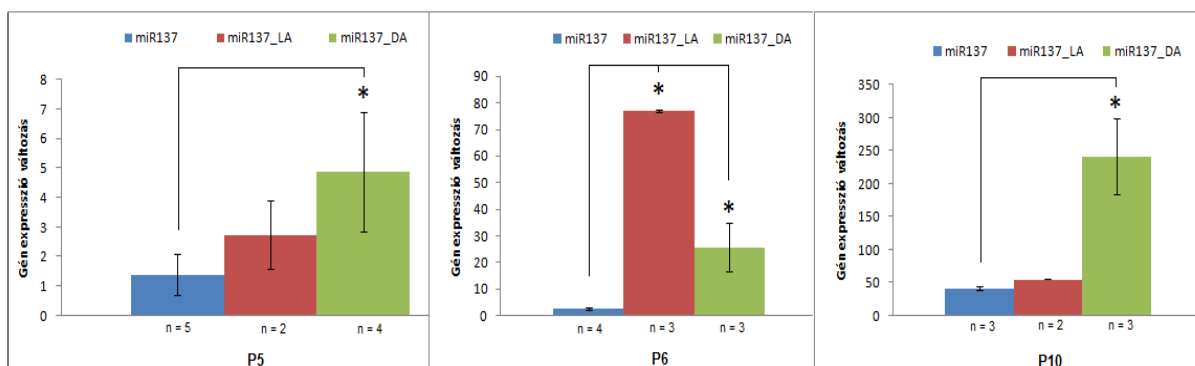
10. táblázat – A miR137 és a miR147 normál fejlődésű retinában mért expressziós változásai (A * jelölés a szignifikáns változásokra utal)

4.4. A fény és sötét adaptáció hatása a miR137 és miR147 expressziójára

A Hip és Hop1 mRNS-ek expressziójában kiugró értékeket mértünk a sötét adaptált P5, P9 és P10 korú állatokból származó mintákban. A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy ezeken a kitüntetett napokon hogyan változik a miR137 és a miR147 mennyisége, ha a retina folyamatos fénynek vagy sötétségnek van kitéve. Három mintát választottunk ki: kettő esetében kimagasló volt a mRNS expresszió a sötét adaptált retinákban (P5 és P10), a harmadik kontrollként szolgált (P6), itt ugyanis nem mutattak kiugró értékeket a mRNS-ek.

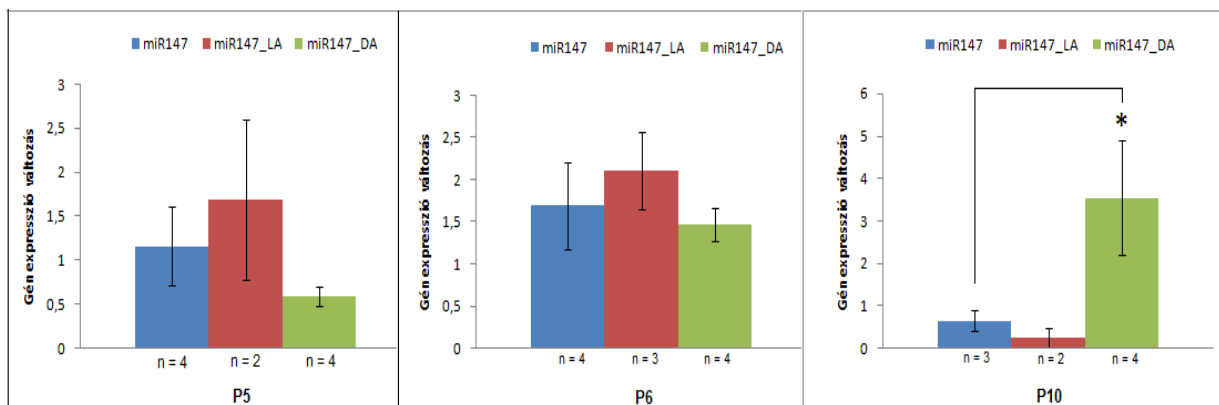
Eredményeink alapján sem a miR137 (**15. ábra**), sem a miR147 (**16. ábra**) esetében nem sikerült fordított expressziós választ detektálni a Hip és Hop1 mRNS-ek expressziójával sem a fény, sem a sötét adaptált mintákban.

A miR137 esetében P5 kornál csak a sötét adaptált retinákban sikerült az expresszió szintjében szignifikáns változást kimutatni ($3,5 \pm 1,46$), majd P6 korban mind a fény adaptált ($29,94 \pm 0,23$), mind a sötét adaptált ($10,00 \pm 3,52$) minta expressziója szignifikáns mértékben emelkedett a normál szint fölé. A P10 korú minták miR137 expressziójára is csak a sötét adaptáció hatott szignifikáns mértékben ($5,83 \pm 1,37$), a miR137 expressziójának emelkedését eredményezve.



15. ábra – A miR137 expressziós szintjeinek összehasonlítása fény adaptált (LA) és sötét adaptált (DA) mintákban, P5, P6 és P10 fejlődési napokon (A *jelölés a szignifikáns változásokra utal)

A miR147 expressziójában egyik kísérleti beállítás sem okozott a normál expressziós szinttől szignifikáns mértékben eltérő szintváltozást a P5 és P6 korú mintákban, P10 korban azonban szignifikáns szintemelkedést detektáltunk a sötét adaptált minták ($5,35 \pm 2,04$) miR147 expressziójában.



16. ábra – A miR147 expressziós szintjeinek összehasonlítása fény adaptált (LA) és sötét adaptált (DA) mintákban, P5, P6 és P10 fejlődési napokon (A *jelölés a szignifikáns változásokra utal)

A normál fejlődésű retinák expressziós szintjeihez viszonyított fény- és sötét adaptált minták expressziós szintváltozásait a **11. táblázat** foglalja össze.

Exp.vált.	P5-LA	P5-DA	P6-LA	P6-DA	P10-LA	P10-DA
miR137	1,97	3,50*	29,94*	10,00*	1,34	5,83*
SD ±	0,84	1,46	0,23	3,52	0,01	1,37
miR147	1,46	0,51	1,25	0,87	0,39	5,35*
SD ±	0,79	0,09	0,27	0,12	0,34	2,04

11. táblázat – Normál expressziós szintekhez viszonyított miR137 és miR147 expressziók változásai arányokban megadva, fény adaptált (LA) és sötét adaptált (DA) mintákban (A *jelölés a szignifikáns változásokra utal)

5. Eredmények tárgyalása

5.1. A PAC1 receptor Hip és Hop1 izoformáinak funkcionális jelentősége a fejlődő patkány retinában

A PACAP, pleiotrópikus hatású hormonként számos élettani folyamat szabályozásában részt vesz, mint például az idegrendszer fejlődő sejtjeinek proliferációja, differenciációja, migrációja és káros hatások elleni védelme, vagy a gén átíródás és szinaptikus kapcsolatok kialakulásának és plaszticitásának irányítása. Hatásai G-protein kapcsolt, metabotróp receptorokon keresztül fejeződnek ki. A PAC1-R a legmagasabb ligandkötő affinitással rendelkező PACAP receptor, melynek a harmadik intracelluláris hurok régió szekvenciális eltérései alapján különböző izoformái alakultak ki (*Blechman és Levkowitz, 2013*). Ezek közül négy (Null, Hip, Hop1 és Hiphop1) a patkány retinából is kimutatható a posztnatális fejlődés során (*Lakk és mtsai., 2012*). A PAC1 receptor izoformái – csakúgy, mint a jelen dolgozatban vizsgált Hip és Hop1 izoforma – eltérő sajátságokkal rendelkeznek ligandkötő affinitásukat és az általuk aktivált jelátviteli útvonalakat illetően. A Hop1 izoforma például magasabb affinitással rendelkezik a PACAP felé, mint a Hip izoforma (*Blechman és Levkowitz, 2013*). PACAP hatásra mindkét izoforma képes aktiválni az AC útvonalat. A Hop1 izoforma, az AC/cAMP/PKA útvonal aktiválása mellett, a PLC/inozitol-trifoszfát (IP3) vagy foszfolipáz D (PLD) kaszkád elindításával, számos sejtszintű választ indukálhat. Az említett szignalizációs útvonalakon keresztül kialakíthat anti-apoptotikus hatást, de serkentheti a sejtek proliferációját, differenciációját és a szinaptogenezist is (*Blechman és Levkowitz, 2013*). A Hip kazetta jelenléte azonban az AC útvonal lefutását, valamint a PLC útvonal csökkentett aktiválását vonja maga után (*Vaudry és mtsai., 2009*). Munkacsoportunk kimutatta, hogy a posztnatális fejlődés második hetében (P5-P10) a patkány retinában a Hip izoforma egyre alacsonyabb mennyiségben expresszálódik, míg a Hop1 izoforma expressziója stabil marad a PAC1 receptorral rendelkező amakrin-, horizontális- és ganglion sejtek teljes-, míg a bipoláris- és Müller-glia sejtek részleges populációjában (*Dénes és mtsai., 2013*). A PAC1 receptor izoformák változása arra enged következtetni, hogy a patkány retina posztnatális fejlődése során a PACAP különböző élettani folyamatokat indíthat el a különböző sejtekben a Hip, illetve Hop1 szignalizáció közrejátszásával, attól függően, hogy az adott fejlődési stádiumban melyik izoforma expressziója dominál a retinális szövetben. A posztnatális fejlődés második hetében számos olyan folyamat zajlik a retinában, melynek szabályozásában a PACAP a Hip, illetve Hop1 receptorokon keresztül szerepet kaphat. Ebben az időszakban tetőzik ugyanis a bipoláris interneuronok és Müller-glia sejtek proliferációja, zajlik a ganglion

sejtek apoptózisa, a neurit növekedés és megkezdődik a szinaptogenezis mindkét rostos rétegben (*Bagnoli és mtsai., 2013*). Ennek megfelelően a Hop1 izoforma dominanciájának növekedése P5 és P10 kor között hozzájárulhat a bipoláris és Müller-glia sejt proliferáció szabályozásához és a szinaptogenezis folyamatához.

5.2. A fény- és sötét adaptáció hatása a Hip és Hop1 mRNS expressziókra

Munkacsoportunk bizonyítékot talált arra a feltevésre, miszerint a patkány retina posztnatális fejlődésének második hetében, a PAC1 receptor Hip és Hop1 izoformája között dominanciaváltás történik. Az izoformák létrejötte az alternatív splicing eredménye: a PAC1 receptor harmadik intracelluláris hurok régiójába beépülő, illetve onnan kivágódó, különböző hosszúságú aminosav kazetták alapján hat izoforma különböztethető meg (*Dickson és Finlayson, 2009*). Ennek megfelelően a tapasztalt izoformaváltás hátterében vagy az alternatív splicing komplex, vagy miRNS-ek regulációs mechanizmusai állhatnak. Ezek a közvetlen mechanizmusok extrinszik vagy intrinszik hatásokra aktiválódnak, melyeknek megértése további kutatómunka tárgyát képezi. Jelen dolgozatban azt teszteltük, hogy az adott fejlődési stádiumban a fénynek vagy fény megvonásnak van-e hatása a Hip és Hop1 mRNS-ek expressziós mintázatára.

Eredményeink bizonyítják, hogy bizonyos fejlődési stádiumokban, mind a fényinger, mind pedig annak hiánya befolyásolja a receptor izoformák mRNS szintjét. Vizsgálataink alkalmával azt tapasztaltuk, hogy a Hip és a Hop1 expressziója azonos tendencia szerint és ugyanazokon a fejlődési napokon változott meg, ami arra enged következtetni, hogy a két izoforma kifejeződésének szabályozása kapcsolt, vagy ugyanazon mechanizmusokon keresztül zajlik. További megfigyelés, hogy a fényinger hiánya nagyobb eltéréseket okozott az izoformák expressziójában, mint a fénykitettség, de fontos kiemelni, hogy a fénymegvonás hatása fejlődési stádiumtól függött. A 24 órás megvilágításnak köszönhetően a Hip és Hop1 mRNS expressziója is szignifikáns mértékben emelkedett meg a P6 és P8 korú mintákban, a többi napon a normálhoz közeli expressziós szinteket mértünk. A 24 órás fény depriváció hatása sokkal drasztikusabb változásokat eredményezett mindkét izoforma expressziójában. A P5, P8, P9 és P10 korú mintákban kiemelkedően magas expressziós szinteket mértünk mind a Hip, mind a Hop1 esetében, míg drasztikus csökkenést váltott ki a P6 és P7 korú retinákban.

Gyakorlatilag tehát mind a fényinger, mind pedig annak hiánya befolyással lehet az izoformák közötti dominanciaváltás menetére. Fény adaptált retinában a Hip normál expressziójának csökkenő tendenciája felborul a P6 és P8 időpontokon mért szignifikáns emelkedések miatt, ezért a Hip mRNS expressziója jellegzetes ingadozást mutat, Hop1

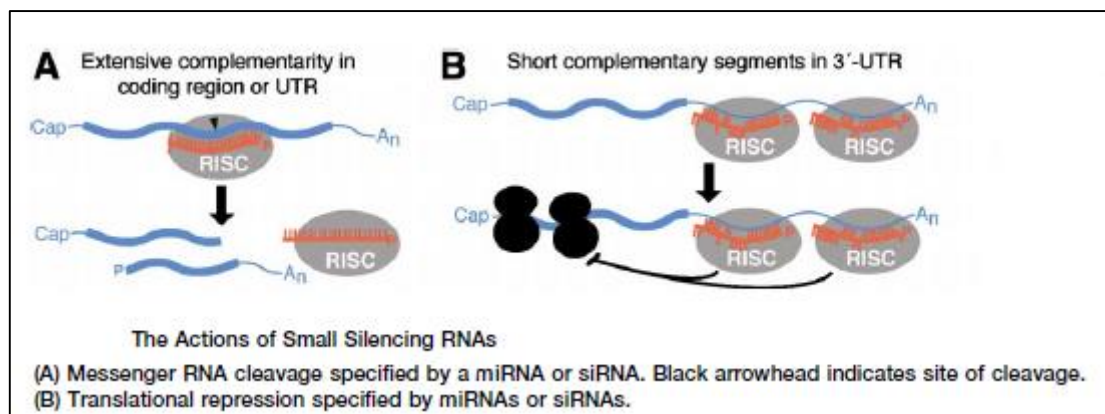
esetében azonban az expressziós szintbeli dominancia még kifejezettebbé válik a vizsgált időszakban. Sötét adaptált retinában azonban a Hip és Hop1 expressziója is hasonló tendenciát követve változik, és bár a Hip mRNA expressziós szintje nagyságrendileg a Hop1 szintjének megközelítőleg a fele a teljes vizsgált időtartam alatt, a dominanciaváltás ebben a kísérleti beállításban nem valósul meg.

Hipotézisünk szerint a Hip és Hop1 mRNA szintek szabályozásának hátterében miRNS-ek is állhatnak.

5.3. A miRNS-ek lehetséges szerepe a Hip és Hop1 mRNA expresszió szabályozásában

A PAC1 receptor splicing-regulációjának háttérmechanizmusairól kevés a rendelkezésre álló irodalom, a receptor izoformák kifejeződését szabályozó miRNS-ekről, illetve azok lehetséges szerepéről nem található tudományos közlemény.

A miRNS-ek 20-22 nukleotid hosszúságú, kis RNS szekvenciák, melyek gének átíródásának, vagy mRNA-ek transzlációjának epigenetikai szabályozásában vesznek részt. A szekvenciák diverzitása és a miRNS-ek széleskörű elterjedése az evolúció során arra utal, hogy számos génkifejeződést szabályozó mechanizmus hátterében jelen lehetnek (Ambros, 2001). A miRNS-eken alapuló géncsendesítés vagy transzláció gátlásának folyamata egy ribonukleo-protein komplex, a RISC (RNA-induced silencing complex) létrejöttével kezdődik (Hammond és mtsai., 2000). A RISC (közel) komplementer szakaszokat ismer fel a target mRNA és a siRNS (kis interferáló RNS) vagy miRNS között, hozzá kötődik, majd a komplex endonukleáz aktivitással rendelkező komponense hasítja a mRNA-t egy specifikus ponton (17/A ábra,) (Elbashir és mtsai., 2001). Ha a mRNA nem rendelkezik a hasítás kezdeményezéséhez szükséges kóddal, de található rajta néhány, az adott miRNS-sel komplementaritást mutató szekvencia, több RISC is képes a mRNA-hez kötődni és jelenlétével represszálni a transzlációt (17/B ábra) (Zeng és mtsai., 2003).



17. ábra – miRNS vagy siRNS hatása a mRNS expresszióra (Bartel és David, 2004)

Jelen kutatómunkához a miRBase felhasználásával azonosítottunk két miRNS-t, melyek szekvenciájuk alapján specifikusak a Hip, illetve a Hop1 mRNS-re. A Hip mRNS megfelelő szakaszával legteljesebb komplementaritást mutató szekvenciák közül a miR137, a Hop1 mRNS-re specifikus miRNS-ek közül pedig a miR147 szekvenciát választottuk ki. A miR137 és miR147 miRNS retinális jelenlétét vagy ottani szerepét tisztázó szakirodalmat nem találtunk, így valószínűleg munkacsoportunk izolálhatta elsőként az említett két szekvenciát a fejlődő patkány retinából.

A miRNS-ek jelenlegi tudásunk szerint számos neurogenetikai folyamat szabályozásában részt vesznek, mint például a sejt proliferáció, differenciáció és apoptózis (Liu és Zhao, 2009). Egy friss tanulmány szerint a miR137 jelentős szerepet kap a fejlődő neuronok fenotipikus érésének és a dendritok morfogenezisének szabályozásában (Smrt és mtsai., 2010). A miR147 általános, idegrendszeri szerepéről kevés az adat. Egy 2011-es kutatás eredményei szerint részt vesz az amiloid prekursor protein (APP) transzlációjának szabályozásában és mivel az APP metabolizmus csekély változása is agyi rendellenességeket, például Alzheimer-kórt eredményezhet, a miR147 közvetett módon hozzájárul a normál agyi működés kialakításához (Delay és mtsai., 2011).

Eredményeink alapján feltételezhető, ezek a miRNS-ek részt vesznek a normál fejlődésű patkány retinában kifejeződő Hip és Hop1 mRNS-ek szintjének beállításában, ugyanis sikerült fordított expressziós válaszokat kimutatni a mRNS-ek és a miRNS-ek között. A fény- és sötét adaptált retinák esetében azonban nem találtunk összefüggést a mRNS-ek és a miRNS-ek expressziós szintjei között, így ezekben az esetekben más mechanizmus állhat a fény és sötét adaptált retinákban történő expressziós változások hátterében.

Ugyanakkor fontos leszögezni, hogy eredményeink „bepülő” jellegűek, a két miRNS szerepének bizonyítása jövőbeli kutatási terveink között szerepel, mely során miRNS inhibitor

és „mimics” szekvenciák segítségével megbizonyosodhatunk a miR137 és miR147 szabályozó szerepéről a PAC1 izoformák kifejeződésében. A miRNS-ek – amellett, hogy fontos biológiai szabályozásban vesznek részt – egy hatékony eszközt adnak a kezünkbe. Az általunk azonosított két miRNS szekvencia lehetőséget nyújt rövid, interferáló RNS-ek (siRNS) szintézisére, melyek transzfekciójával fényt deríthetünk az adott receptor izoformák fiziológiai szerepére.

5.4. Az emlős retina fejlődése során felszabaduló, a fény- és a sötét adaptáció kialakításáért felelős mediátorok

A retina fejlődését számos extrinszik és intrinszik szignál irányítja. A retina fejlődésében potenciálisan részt vevő neuroaktív anyagok expresszióját vizsgáló kutatások a késői prenatális vagy korai posztnatális fejlődési időszakokat célozzák meg. A rendelkezésre álló adatok arra utalnak, hogy a neurotranszmitterek már az előtt expresszálódnak, hogy a retina jeltovábbító rendszere elérné a szerkezeti és funkcionális érettséget, ezért valószínű, hogy a retinális sejtek fejlődésbiológiai folyamatainak szabályozásában is szerepet kapnak (*Bagnoli és mtsai., 2003*).

5.4.1. Dopamin

A legvalószínűbb fényadaptációt kialakító kémiai hírvivő az emlős retinában a dopamin, hiszen annak felszabadulását főként a fény indukálja. Számos eredmény támasztja alá, hogy szerepe lehet a retina fejlődésbiológiájának szabályozásában is, mivel a dopamin az elsők között megjelenő transzmitter (patkányoknál P7 korban) a fejlődő retinában, melyet a dopaminerg (DA) amakrin sejtek termelnek (*Witkovsky, 2004*). A szekretált dopamin G-protein kapcsolt receptorok közvetítésével fejti ki hatását a célsejtekre parakrin módon. A receptorok két fő altípusra, a D1 és a D2 dopamin receptorokra különíthetők el. A két altípus közötti alapvető különbség, hogy a D1 receptorok (D1 és D5) serkentőleg, a D2 receptorok (D2, D3 és D4) pedig gátlólag hatnak az AC útvonalra és ezzel együtt az intracelluláris cAMP szintre (*Jackson és mtsai., 2012*). A dopamin termelés és felszabadulás napi ritmusa a DA neuronok és a fotoreceptorok interakciójától, a fény behatásától függ. Az emlős retinában bizonyítottan több dopamin szabadul fel fényben, mint sötétben. Ezen a ponton fontos hangsúlyozni, hogy a dopamin felszabadulás sötétben sem áll le. A DA sejtek fény-függő működését más neurotranszmitterek is modulálják. Egyes glutamáterg bipoláris interneuronok serkentő szinapszisokat, míg más gamma-amino-vajsavat expresszáló, azaz GABA-erg és

glicinerg amakrin sejtek gátló szinapszisokat bocsátanak a DA amakrin sejtek felé (Witkovsky, 2004).

A glutamát a retina legnagyobb mennyiségben jelen lévő serkentő hatású neurotranszmittere. A GABA és a glicin ezzel szemben gátló hatást fejt ki a retina sejtjeinek működésére. Johnson és munkatársai a glutamáterg VGLUT1 és GABA/glicinerg VGAT transzporterek expresszióját vizsgálta a posztnatális rágszáló (egér és patkány) retinákban. Eredményeikben kimutatták, hogy a VGAT expresszió (P1) megelőzi a VGLUT1 megjelenését (P5-P7) a fejlődő patkány retinában. A GABA és glicin mediálta vezikuláris transzport tehát nemcsak a glutamáterg, de a dopaminerg hírközlést is megelőzi rágszálóknban. Az említett transzmitterek korai expressziója szintén a patkány retina fejlődésére ható, szabályozó szerepre utalhat (Johnson és mtsai., 2003).

Fényben a dopamin biztosítja a retina működésének átszervezését és egyben az éles látás kialakítását a kontraszt szenzitivitás és a felbontóképesség emelésével. Jackson és munkatársai kimutatásai szerint a kontraszt szenzitivitás emelése a D4 receptorok fotoreceptorokra kifejtett hatásának, míg a felbontóképesség emelése a D1 receptorok csap – ON bipoláris/horizontális sejtekre kifejtett hatásának függvénye (Jackson és mtsai., 2012). A D1 receptorok működésének eredményeként a horizontális sejtek közötti adhézio (gap-junction) megszűnik, és ezzel együtt csökken a feszültség áramlása az elektromos szinapszisokon át, valamint a receptív mező átmérője is csökken (He és mtsai., 2000). A D4 receptorok azonban a csapok és pálcikák adhézio kapcsolatait modulálják, melyek dopamin hiányában szorosan összekapcsolódnak és számos közvetett hatáson keresztül csökkentik a ganglion sejtek kontraszt szenzitivitását (Ribelayga és mtsai., 2008).

A fent idézett közlemények bizonyítják, hogy a dopamin nagymértékben módosítja a retina PAC1 receptort expresszáló sejtjeinek működését (pl.: ganglion sejtek, horizontális sejtek), tehát ésszerű feltételezés, hogy a dopamin felelős lehet a PAC1 receptor fény adaptált retinákban bekövetkező expressziós változásaiért.

5.4.2. Melatonin

A melatonin számos gerinces faj retinájában szintetizálódik, nagyobb mennyiségben a fotoreceptorok, kisebb mennyiségben a ganglion sejtek által (Liu és mtsai., 2004, Garbarino-Pico és mtsai., 2004). A melatonin AC útvonalat gátló hatását G-protein kapcsolt receptorok közvetítik, melyeknek két altípusát sikerült azonosítani az emlős retinában: az MT1 és MT2 receptorok (Wiechmann és Summers, 2008). Patkányban az MT1 receptor expresszióját kimutatták amakrin, horizontális és ganglion sejteken is (Fujieda és mtsai., 1999), míg az

MT2 receptorok jelenléte a pálcika-ON-bipoláris sejteken (*Yang és mtsai., 2011*) és a ganglion sejteken igazolt (*Zhao és mtsai., 2010*). A melatonin receptorok jelenléte a szintézisért felelős sejteken arra utal, hogy a melatonin saját bioszintézisét is szabályozza. Lokális neuromodulátorként szabad diffúzó révén, parakrin módon fejti ki hatását a célsejtekre. A legtöbb vizsgált fajban a melatonin szintje magasabb éjszaka, mint nappal, ugyanakkor termelődését a retina cirkadián ritmusa is befolyásolja, hiszen a folyamatos sötétségnek kitett állatokban is megvalósul szintjének ciklikus emelkedése és csökkenése (*Iuvone és mtsai., 2005, Tosini és mtsai., 2008*). Számos eredmény támasztja alá, hogy a melatonin termelés cirkadián ritmusát a fotoreceptorok szabályozzák (*Tosini és mtsai., 2007*). A fény, mint direkt hatás, befolyásolja a fotoreceptor sejtek működését a dopamin felszabadulás révén. A dopamin ugyanis fény hatására szabadul fel az amakrin és az ún. interplexiform sejtekből – mely az amakrin sejtek egy, a külső retina felé is nyúlványokat küldő variációja – és a fotoreceptorok D4 receptoraira hatva szupresszálja az intracelluláris cAMP és Ca^{2+} szint emelkedését, valamint gátolja a melatonin bioszintézist, mely igazolja a dopamin és a melatonin működésének antagonisztikus viszonyát (*Ivanova és mtsai., 2008*). Számtalan bizonyíték támasztja alá azt az elképzelést, miszerint, ahogyan a dopamin a fény adaptáció kulcseleme, úgy a melatonin viszont a sötét adaptív fiziológia kialakításáért felelős a retinában. Nappal a magas dopamin szint gátolja a melatonin felszabadulást, ugyanakkor éjszaka, vagy sötétben a melatonin kerül fölénybe, míg a dopamin felszabadulás gátolt (*Ribelayga és mtsai. 2004*).

A fent leírtak értelmében elképzelhető, hogy a PAC1 receptorok expressziójának nagymértékű emelkedéséért a sötétben felszabaduló melatonin felelős.

6. Összefoglalás

A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP), pleiotróp hormonként számos élettani folyamatot szabályoz VPAC1, VPAC2, PAC1 receptorain keresztül. Ezen belül a PAC1 receptornak további hat izoformája ismert melyek embrionális korban való megjelenése arra engednek következtetni, hogy a PACAP a retina ontogenezisében is szerepet vállal. Az emlős retinában megjelenő Null, Hip, Hop1, Hiphop1 izoforma expressziós mintázata azt jelzi, hogy a retina posztnatális fejlődése során a PAC1 izoformák kifejeződése komplex reguláció alatt áll. Jelen dolgozatban célul tűztük ki, hogy fényt derítsünk az izoformák kifejeződését szabályozó mechanizmusokra és miRNS szekvenciáikra.

A kísérletekben normál körülmények között nevelkedett, 24 órás fény-, vagy sötét adaptált Wistar patkányok retináját vizsgáltuk, P5 kortól P10 korig. A totál és miRNS extrakciót követően reverz transzkripciót végeztük. A Hip és Hop1 specifikus miRNS primereket a miRBase adatbázis felhasználásával terveztük meg. A Hip és Hop1 receptorok mRNS és miRNS-ek expressziós szintjét real-time PCR segítségével állapítottuk meg. Az expressziós különbségek kalkulációjához a deltadeltaCt módszert alkalmaztuk. Statisztikáinkhoz egy-utas ANOVA-t használtunk Post-Hoc Dunnett teszttel.

Normál retinákban P6-P9 között a Hip expressziója folyamatosan csökkent, míg a Hop1 szintje csak P8 és P9 korban mutatott csökkenést. Mindkét izoforma mRNS szintjében a P10 napon egy szignifikáns növekedést detektáltunk. A sötét adaptált mintákban P5, P8, P9 és P10 korban mindkét izoforma mRNS szintjében kiugró növekedést mértünk. Az adatbázisból a miR137, miR147 miRNS-eket választottuk ki, melyek szekvencia alapján a Hip, illetve Hop1 mRNS-re specifikusak. A miRNS szintek normális fejlődési körülmények között fordítottan korreláltak a Hip és Hop1 mRNS szintekkel. A fény, illetve sötét adaptált retinák esetében azonban nem találtunk összefüggést a mRNS-ek és a miRNS-ek expressziós szintje között.

Elsőként azonosítottunk két miRNS szekvenciát, melyek normál fejlődési körülmények között szabályozhatják a Hip és Hop1 mennyiségét a patkány retinában. Kimutattuk, hogy a Hop1/Hip expressziót a fényinger hiánya nagymértékben befolyásolja bizonyos fejlődési állapotokban, azonban ebben a regulációban a vizsgált miRNS-ek nem vesznek részt. A mRNS szintek emelkedése ebben az esetben a transzkripció serkentésén vagy a splicing reguláción keresztül valósulhat meg, melyben parakrin regulátorokként a dopamin és melatonin is szerepet kaphat.

7. Hivatkozások

- Ambros V. (2001) *microRNAs: Tiny regulators with great potential*. Cell, 107: 823–826.
- Arimura A. (2007) *PACAP: the road to discovery*. Peptides, 28: 1617–1619.
- Atlasz T., Szabadfi K., Kiss P., Racz B., Gallyas F., Tamas A., Gaal V., Marton Z., Gabriel R., Reglodi D. (2010) *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the retina: focus on the retinoprotective effects*. Ann N Y Acad Sci. 2010 Jul;1200:128-39.
- Bagnoli P., Dal Monte M., Casini G. (2003) *Expression of neuropeptides and their receptors in the developing retina of mammals*. Histol Histopathol., 18: 1219-1242.
- Bartel D.P. (2004) *MicroRNAs: Genomics, biosynthesis, mechanism and function*. Cell, 116: 281–297.
- Bähr M. (2000) *Live or let die – retinal ganglion cell death and survival during development and in the lesioned adult CNS*. Trends Neurosci., 23: 483–490.
- Blanks J.C., Adinolfi A.M., Lolley R.N. (1974) *Synaptogenesis in the photoreceptor terminal of the mouse retina*. J. Comp. Neurol., 156:81-93.
- Blechman, J., Levkowitz G. (2013) *Alternative splicing of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor PAC1: mechanisms of fine tuning of brain activity*. Frontiers in Endocrinology, 4:55-
- Close, J.L., Gumuscu B., Reh T.A. (2005) *Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Müller glia in the rat retina via TGF β signaling*. Development, 132: 3015-3026.
- Cook J.E., Chalupa L.M. (2000) *Retinal mosaics: new insights into an old concept*. Trends Neurosci., 23: 26-34.
- Delay C., Calon F., Mathews P., Hebert S.S. (2011) *Alzheimer-specific variants in the 3' UTR of Amyloid precursor protein affect microRNA function*. Mol. Neurodegener., 6: 70.
- Dhingra N.K., Ramamohan Y., Raju T.R. (1997) *Developmental expression of synaptophysin, synapsin I and syntaxin in the rat retina*. Dev. Brain Res., 102: 267-273.
- Dickson L., Finlayson K. (2009) *VPAC and PAC receptors: From ligands to function*. Pharmacol Ther., 121: 294-316.
- Elbashir S.M., Leneckel W., Tuschl T. (2001) *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. Genes Dev., 15: 188–200.
- Frade J.M., Bovolenta P., Martínez-Morales J.R., Arribas A., Barbas J.A., Rodríguez-Tébar A. (1997) *Control of early cell death by BDNF in the chick retina*. Development, 124: 3313–3320.

- Fujieda H., Hamadanizadeh S.A., Wankiewicz E., Pang S.F., Brown G.M. (1999) *Expression of mt1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin*. Neuroscience, 93: 793-799.
- Garbarino-Pico E., Carpentieri A.R., Contin M.A., Sarmiento M.I., Brocco M.A., Panzetta P., Rosenstein R.E., Caputto B.L., Guido M.E. (2004) *Retinal ganglion cells are autonomous circadian oscillators synthesizing N-acetylserotonin during the day*. J. Biol. Chem., 279: 51172-51181.
- Hammond S.C., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J. (2000) *An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in Drosophila cells*. Nature, 404: 293-296.
- Hannibal J., Fahrenkrug J. (2004) *Target areas innervated by PACAP-immunoreactive retinal ganglion cells*. Cell Tissue Res., 316: 99-113.
- He S., Weiler R., Vaney D.I. (2000) *Endogenous dopaminergic regulation of horizontal cell coupling in the mammalian retina*. J Comp Neurol., 418: 33- 40.
- Horsburgh G.M., Sefton A.J. (1987) *Cellular degeneration and synaptogenesis in the developing retina of the rat*. J. Comp. Neurol., 263: 553-566.
- Iuvone P.M., Tosini G., Pozdeyev N., Haque R., Klein D.C., Chaurasia S.S. (2005) *Circadian clocks, clock-controlled genes and melatonin biosynthesis in the retina*. Prog. Retin. Eye Res., 24: 433-456.
- Ivanova T.N., Alonso-Gomez A.L., Iuvone P.M. (2008) *Dopamine D4 receptors regulate intracellular calcium concentration in cultured chicken cone photoreceptor cells: relationship to dopamine receptor-mediated inhibition of cAMP formation*. Brain Res., 1207: 111-119.
- Izumi S., Seki T., Shioda S., Zhou C.J., Arimura A., Koide R. (2000) *Ultrastructural localization of PACAP immunoreactivity in the rat retina*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 921:317-320.
- Jackson C.R., Ruan G.X., Aseem F., Abey J., Gamble K., Stanwood G., Palmiter R.D., Iuvone P.M., McMahon D.G. (2012) *Retinal dopamine mediates multiple dimensions of light-adapted vision*. The Journal of Neuroscience, 32: 9359-9368.
- Johnson J., Tian N., Caywood M.S., Reimer R.J., Edwards R.H., Copenhagen D.R. (2003) *Vesicular neurotransmitter transporter expression in developing postnatal rodent retina: GABA and glycine precede glutamate*. The Journal of Neuroscience, 23: 518-529.
- Koulen P. (1997) *Vesicular acetylcholine transporter (VACHT): a cellular marker in rat retinal development*. Neuroreport, 8: 2845-2848.
- Koulen P., Sassoè-Pognetto M., Grünert U., Wässle H. (1996) *Selective clustering of GABA(A) and glycine receptors in the mammalian retina*. J. Neurosci., 16: 2127-2140.
- Köves K., Kántor O., Vereczki V., Kausz M., Nemeskéri A., Fögel K., Kiss A., Görcs T.J., Szeiffert G., Arimura A. (2000) *PACAP and VIP in the photoneuroendocrine system. From the retina to the pituitary gland*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 921: 321-326.

- Lakk M., Szabo B., Volgyi B., Gabriel R., Denes V. (2012) *Development-related splicing regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors in the retina*. Invest.Ophthalmol.Vis.Sci., 53: 7825–7832.
- Lang, B., Zhao, L., Cai, L., McKie, L., Forrester, J. V., McCaig, C. D., Jackson, I. J., Shen, S.(2010) *GABAergic amacrine cells and visual function are reduced in PAC1 transgenic mice*. Neuropharmacology, 58: 215–225.
- Liu, C., Fukuhara, C., Wessell, J. H., P., Iuvone, M., Tosini, G. (2004) *Localization of Aa-nat mRNA in the rat retina by fluorescence in situ hybridization and laser capture microdissection*. Cell. Tissue Res., 315: 197-201.
- Liu, C., Zhao, X. (2009) *MicroRNAs in adult and embryonic neurogenesis*. Neuromolecular Med., 11: 141-152.
- Livesey F.J., Cepko C.L. (2001) *Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina*. Nat. Rev. Neurosci., 2: 109-118.
- Mey J., Thanos S. (2000) *Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis*. Brain Res. Rev., 32: 343-379.
- Miyata A., Arimura, A., Dahl, R. R., Minaminot, N., Ueharas, A., Jiang, L., Cullern, M. D., Coy, D. H. (1989) *Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells*. Biochem Biophys Res Commun., 164: 567–574.
- Ohtaki, H., T. Nakamachi, K. Dohi, S. Shioda. (2008) *Role of PACAP in ischemic neural death*. J. Mol. Neurosci., 36: 16–25.
- Perry, V.H., Cowey, A. (1982) *A sensitive period for ganglion cell degeneration and the formation of aberrant retino-fugal connections following tectal lesions in rats*. Neuroscience, 7: 583–594.
- Perry, V. H., Henderson, Z., Linden, R. (1983) *Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat*. J. Comp. Neurol., 219: 356–368.
- Rapaport, D. H., Wong, L. L., Wood, E. D., Yasumura, D., 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., Galli-Resta L. (2002) *The role of tangential dispersion in retinal mosaic formation*. Prog. Retin. Eye Res., 21: 153-168.
- Ribelayga, C., Wang, Y., Mangel S. C. (2004) *A circadian clock in the fish retina regulates dopamine release via activation of melatonin receptors*. J. Physiol., 554: 467-482.
- Ribelayga C, Cao Y, Mangel SC (2008) *The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling*. Neuron, 59: 790–801.
- Rich K.A., Zhan Y., Blanks J.C. (1997) *Migration and synaptogenesis of cone photoreceptors in the developing mouse retina*. J. Comp. Neurol., 388: 47-63.

- Seki, T., Shioda, S., Ogino, D., Nakai, Y., Arimura, A., Koide, R. (1997) *Distribution and ultrastructural localization of a receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its mRNA in the rat retina*. *Neurosci. Lett.*, 238: 127–130.
- Seki T., Shioda S., Izumi S., Arimura A., Koide R. (2000a) *Electron microscopic observation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-containing neurons in the rat retina*. *Peptides*, 21: 109–113.
- Seki T., Izumi S., Shioda S., Zhou C.J., Arimura A., Koide R. (2000b) *Gene expression for PACAP receptor mRNA in the rat retina by in situ hybridization and in situ RT-PCR*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 921: 366–369.
- Shioda, S., Ohtaki, H., Nakamachi, T., Dohi, K., Watanabe, J., Nakajo, S., Arata, S., Kitamura, S., Okuda, H., Takenoya, F., Kitamura, Y. (2006) *Pleiotropic functions of PACAP in the CNS: neuroprotection and neurodevelopment*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1070: 550–560.
- Silveira, M.S., Costa, M. R., Bozza, M., Linden, R. (2002) *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide prevents induced cell death in retinal tissue through activation of cyclic AMP-dependent protein kinase*. *J. Biol. Chem.*, 277: 16075–16080.
- Skoglosa, Y., N. Takei, D. Lindholm. (1999) *Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide mRNA in the developing rat brain*. *Mol. Brain Res.*, 65: 1–13.
- Smrt, Richard D., Szulwach, K. E., Pfeiffer, R. L., Li, X., Guo, W., Pathania, M., Teng, Z. Q., Luo, Y., Peng, J., Bordey, A., Jin, P., Zhao, X. (2010) *MicroRNA miR-137 Regulates Neuronal Maturation by Targeting Ubiquitin Ligase Mind Bomb-1*. *Stem Cells*, 28: 1060–1070.
- Somogyvari-Vigh, A., D. Reglodi. (2004) *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide*. *Curr. Pharm. Des.*, 10: 2861–2889.
- Son, Y.J., J.W. Park, B.J. Lee. (2007) *TTF-1 expression in PACAP-expressing retinal ganglion cells*. *Mol. Cells*, 23: 215–219.
- Tosini, G., Davidson, A. J., Fukuhara, C., Kasamatsu, M., Castanon-Cervantes, O. (2007) *Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors*. *FASEB J.*, 21: 3866–3871.
- Tosini, G., Pozdeyev, N., Sakamoto, K., Iuvone, P. M. (2008) *The circadian clock system in mammalian retina*. *BioEssays*, 30: 624–633.
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., Fournier, A., Chow, B. K., Hashimoto, H., Glals, L., Vaudry, H. (2009) *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery*. *Pharmacol. Rev.*, 61: 283–357.
- Waschek, J.A. (2002) *Multiple actions of pituitary adenylate cyclase activating peptide in nervous system development and regeneration*. *Dev. Neurosci.*, 24: 14–23.
- Wässle H., Boycott B.B. (1991) *Functional architecture of the mammalian retina*. *Physiol. Rev.*, 71: 447–480.

- Wiechmann, A.F., Summers, J.A. (2008) *Circadian rhythms in the eye: the physiological significance of melatonin receptors in ocular tissues*. Prog. Retin. Eye Res., 27: 137-160.
- Witkovsky, P. (2004) *Dopamine and retinal function*. Documenta Ophthalmologica, 108: 17–40.
- Yamasaki E.N., Ramoa A.S. (1993) *Dendritic remodelling of retinal ganglion cells during development of the rat*. J. Comp. Neurol., 329: 277-289.
- Yang, X.F., Miao, Y., Ping, Y., Wu, H. J., Yang, X. L., Wang, Z. (2011) *Melatonin inhibits tetraethylammonium-sensitive potassium channels of rod ON type bipolar cells via MT2 receptors in rat retina*. Neuroscience, 173: 19-29.
- Zeng, Y., Yi, R., Cullen, B.R. (2003) *MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 9779–9784.
- Zhao, W.J., Zhang, M., Miao, Y., Yang, X. L., Wang, Z. (2010) *Melatonin potentiates glycine currents through a PLC/PKC signalling pathway in rat retinal ganglion cells*. J. Physiol., 588: 2605-2619.
- Zhou, C. J., Shioda, S., Yada, T., Inagaki, N., Pleasure, S. J., Kikuyama, S. (2002) *PACAP and its receptors exert pleiotropic effects in the nervous system by activating multiple signaling pathways*. Curr Protein Pept Sci., 4: 423-39.

<http://www.bio.miami.edu/tom/courses/protected/bil265/retina.jpg>

8. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Dénes Viktóriának, aki fáradtságot nem ismerve segített mindenben, ami e dolgozat létrejöttéhez nélkülözhetetlen volt.

Köszönöm Dr. Gábrriel Róbertnek és Lakk Mónikának, hogy mindig számíthattam rájuk, valamint, hogy segítettek jelen dolgozat javításában, tökéletesítésében.

Köszönettel tartozom Dr. Fekete Csabának, illetve a Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszéknek, akik biztosították készülékeik és a megfelelő technika elérhetőségét kísérleti munkánkhoz.

A lelki támogatásért és technikai jellegű jótanácsaiért Czimmermann Tamásnak tartozom hálával.

Végezetül köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy megértőek és türelmesek voltak velem ebben az időszakban.

9. Tételes szerzői hozzájárulás

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott, Stefanov Antónia a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- a retinák preparálását,
- az RNS, miRNS extrakciót és koncentráció meghatározást
- reverz transzkripció reakciók összeállítását,
- a kvantitatív real-time PCR reakciók összeállítását,
- az adatok kiértékelését

végeztem el.



aláírás

Pécs, 2015. január 6.