

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

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

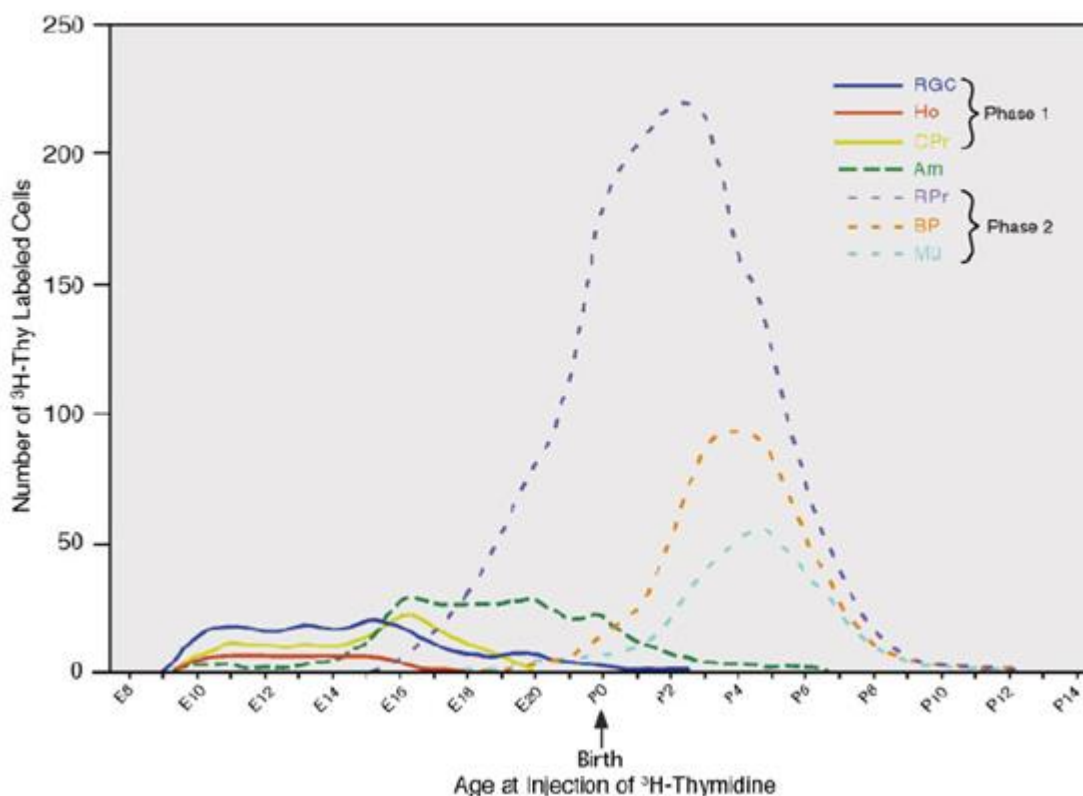
A patkány retina fejlődését számos genetikai és epigenetikai faktor összehangolt szabályozása teszi lehetővé. Az embrionális periódusban kialakul a retina progenitor sejtjeinek ideális aránya. Ezt követően a sejtek a megfelelő rétegbe vándorolnak, ott differenciálódnak, elérik végleges morfológiai jellegzetességeiket 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).

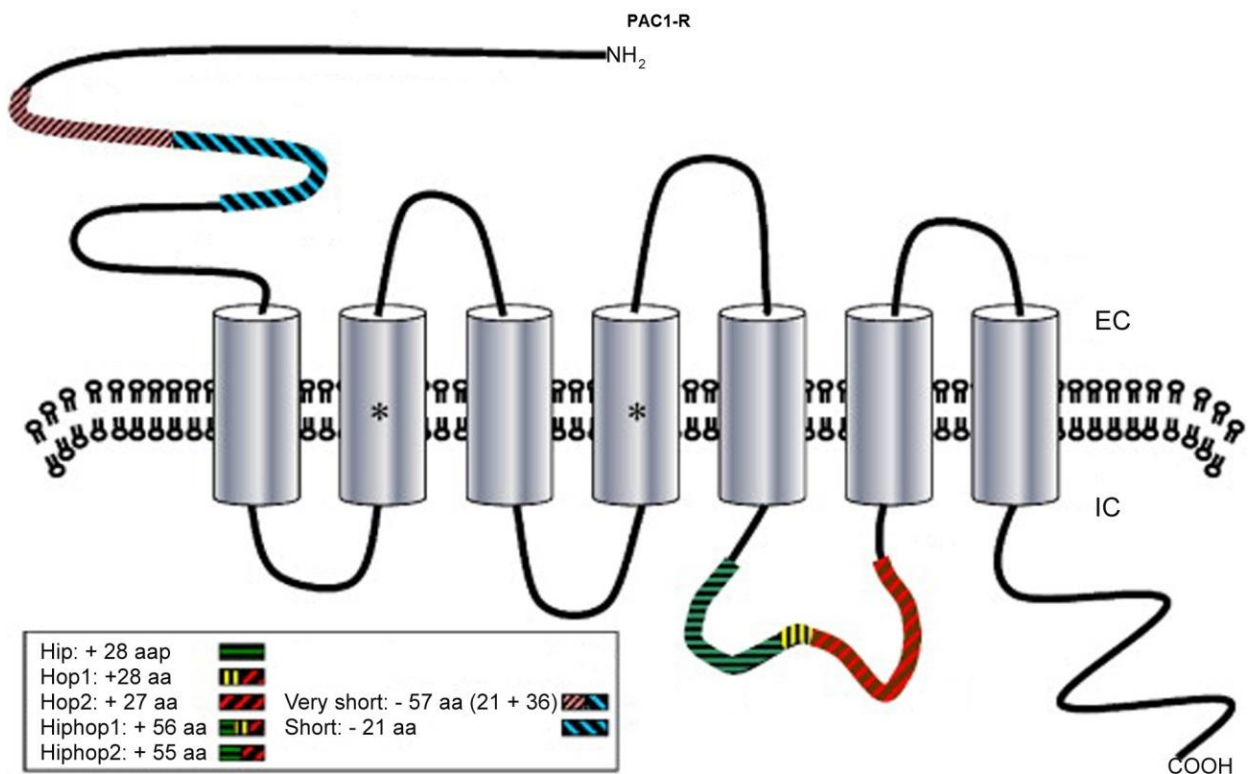
A patkány retina sejtípusai tehát meghatározott sorrendben jelennek meg a neurogenesis során, de a dolgozat szempontjából kiemelt figyelmet érdemel az utolsó két sejtípus proliferációjának sorrendje. Eleinte a Müller-glia sejtek proliferációja úgymond megelőzi a bipoláris sejteket, ez az állapot azonban 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 sejtkeapcsolatok 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).

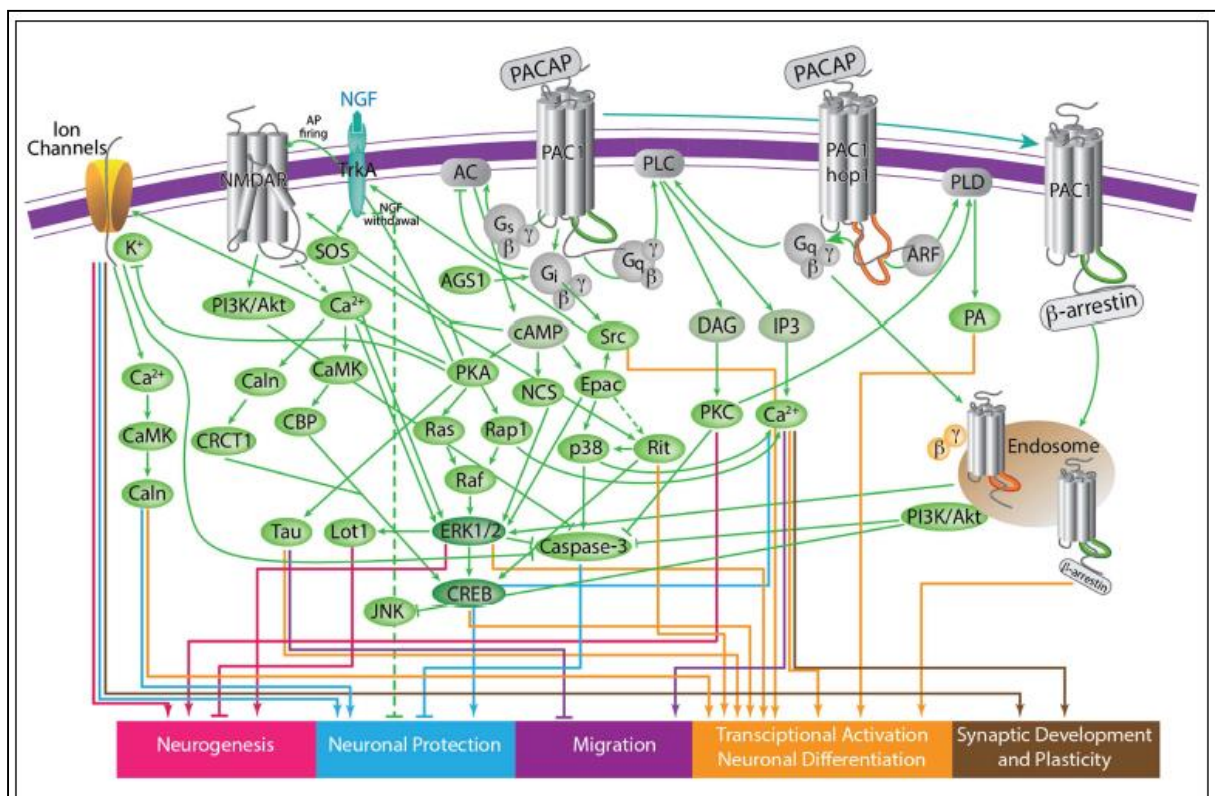
A PACAP hatásai G-protein kapcsolt, metabotróp receptorokon keresztül fejeződnek ki, melyeknek három típusát sikerült ezidáig izolálni: VPAC1, VPAC2 és PAC1 receptorokat. A PAC1 receptornak további izoformái különböztethetők meg patkányban, a receptor extracelluláris és harmadik intracelluláris hurok 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 neurogenezisben 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).

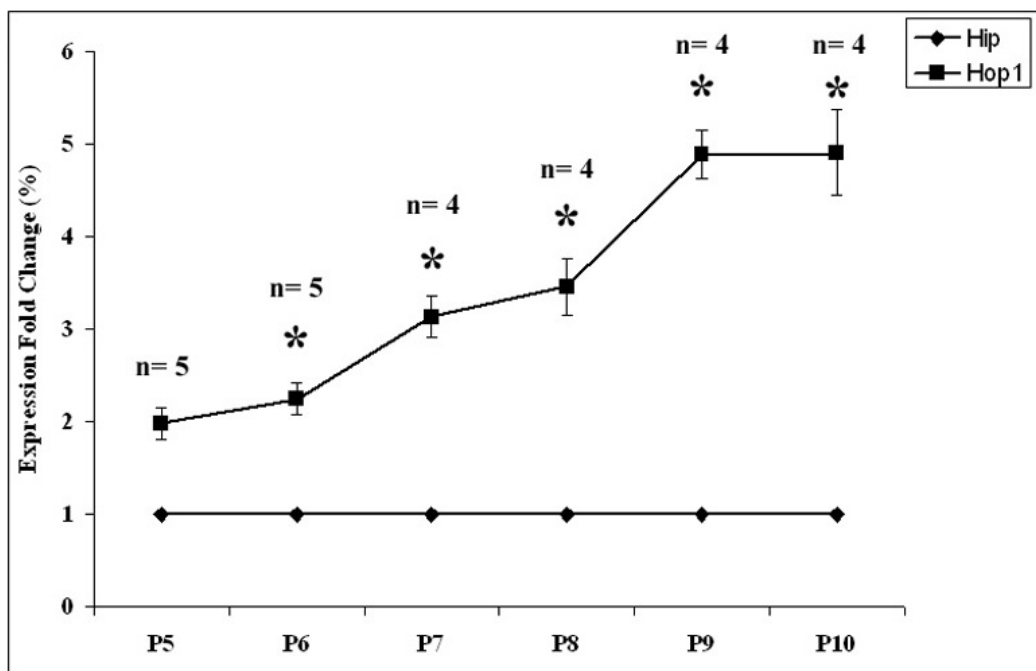
Ebből kiindulva a PACAP, neuroaktív anyagként minden bizonnyal szerepet kap a retina embrionális, majd posztnatális fejlődésének szabályozásában.

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*).

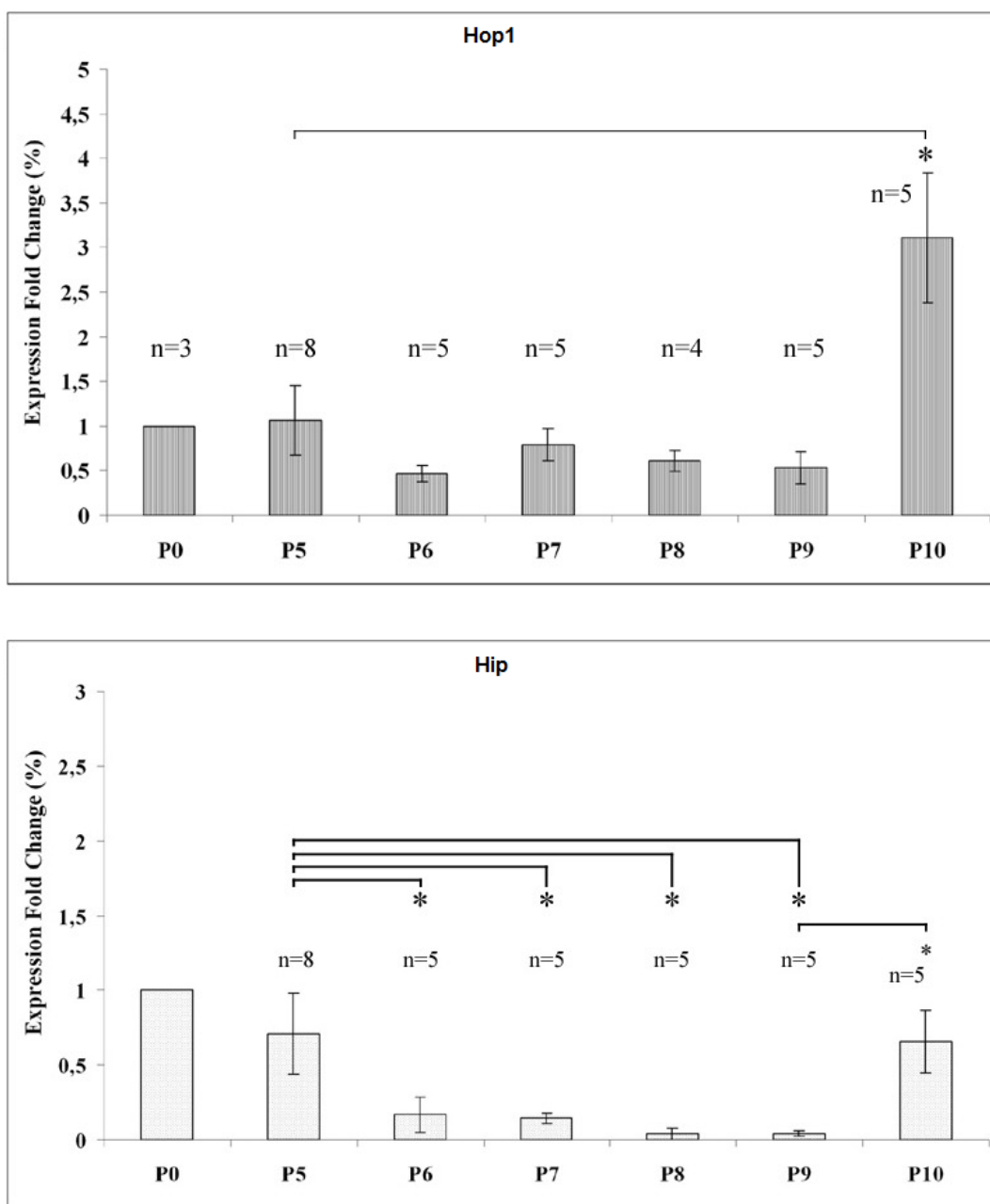
A felvetett hipotézis igazolásának reményében munkacsoportunk célul tűzte ki, hogy az említett két izoforma expressziós szintjeit egy erre irányuló vizsgálat keretein belül komplexebb módon hasonlíthassa össze, valamint, hogy a két izoforma közötti dominancia váltás pontos időszakát meghatározhassa. 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 eddigitől 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 abszorpciók 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

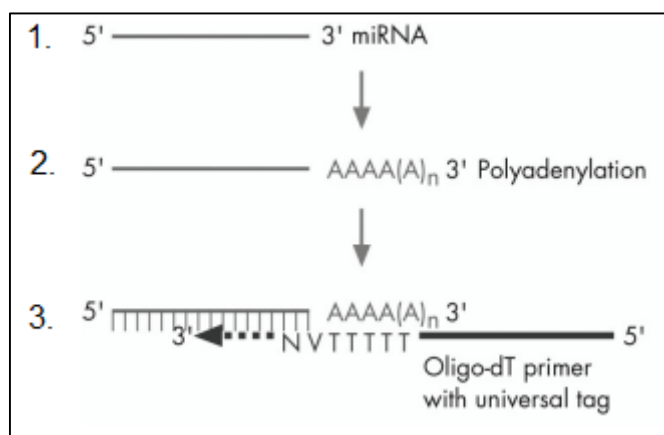
mennyiségű, RNáz mentes víz. A reverz transzkripciót PTC-200-as (Peltier Thermal Cycler; MJ Research) PCR készülék segítségével végeztük el az alábbi program alapján:

- 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 adenosin 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 expresszálandó 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 leköötődés (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

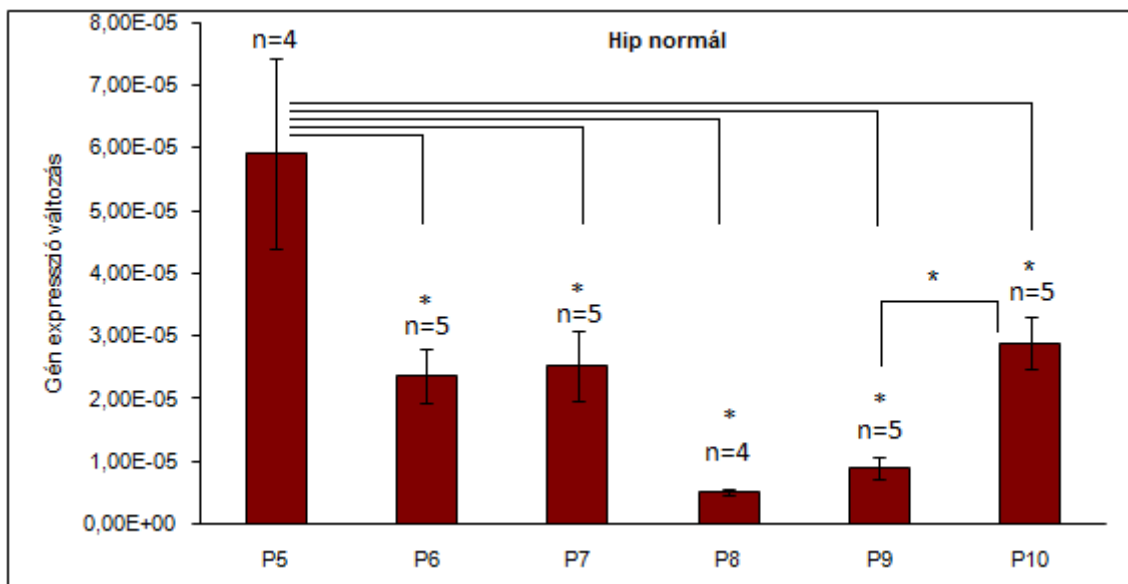
A gén expressziók közötti statisztikai szignifikanciát egy-utas ANOVA analízissel és Post-Hoc Dunnett teszttel határoztuk meg. A 0,05 alatti p-értékkel rendelkező adatokat fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. Hip és Hop1 izoformák expressziójának változásai normál fejlődésű retinában

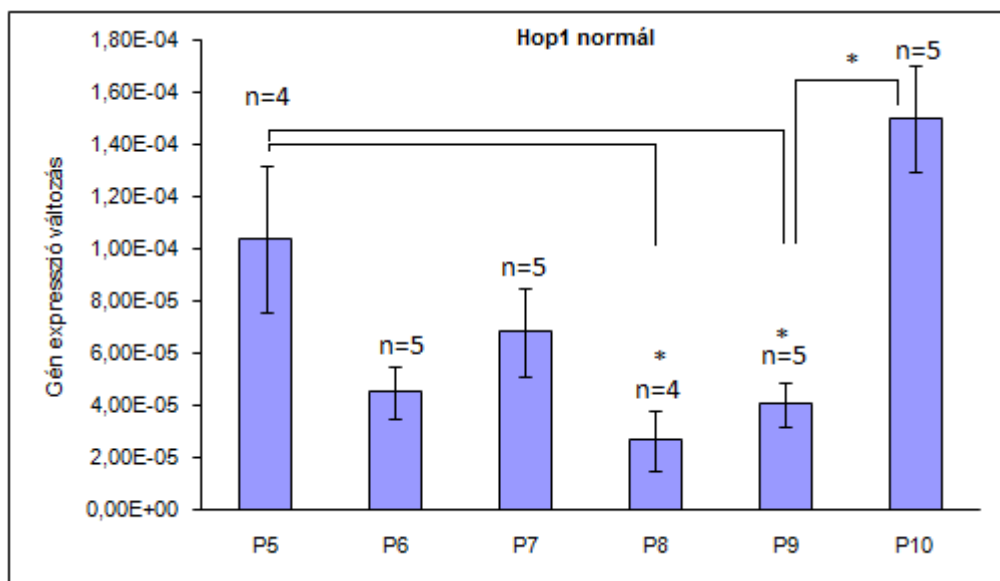
A többfajta fluorescens jelölést tartalmazó TaqMan próbáknak köszönhetően lehetővé vált több cDNS egyidejű vizsgálata ugyanazon reakció elegyben.

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 ($3,7 \pm 0,5$).



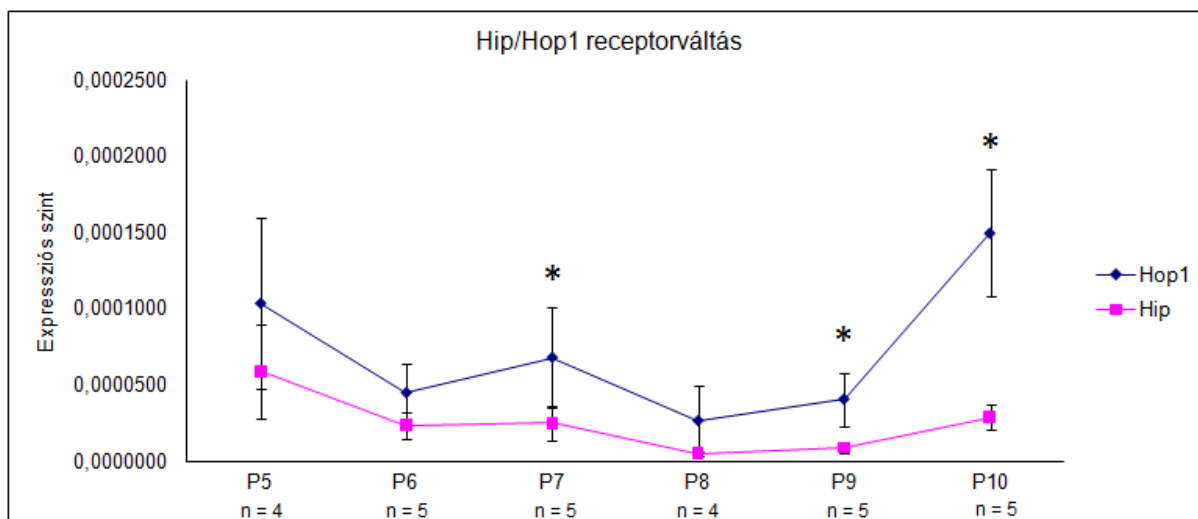
9. ábra – A Hop1 mRNS expressziós mintázata normál fejlődési körülmények között (A * jelölés a szignifikáns változásokra utal)

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.

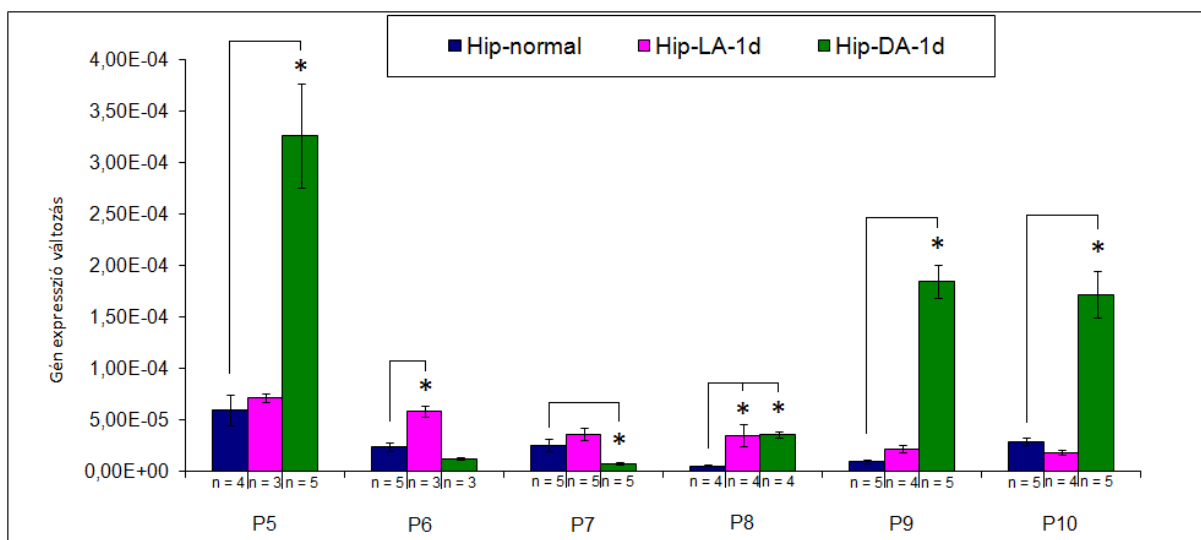


10. ábra – A Hip és Hop1 expressziós mintázatának összevetése (A *jelölés a szignifikáns változásokra utal)

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.

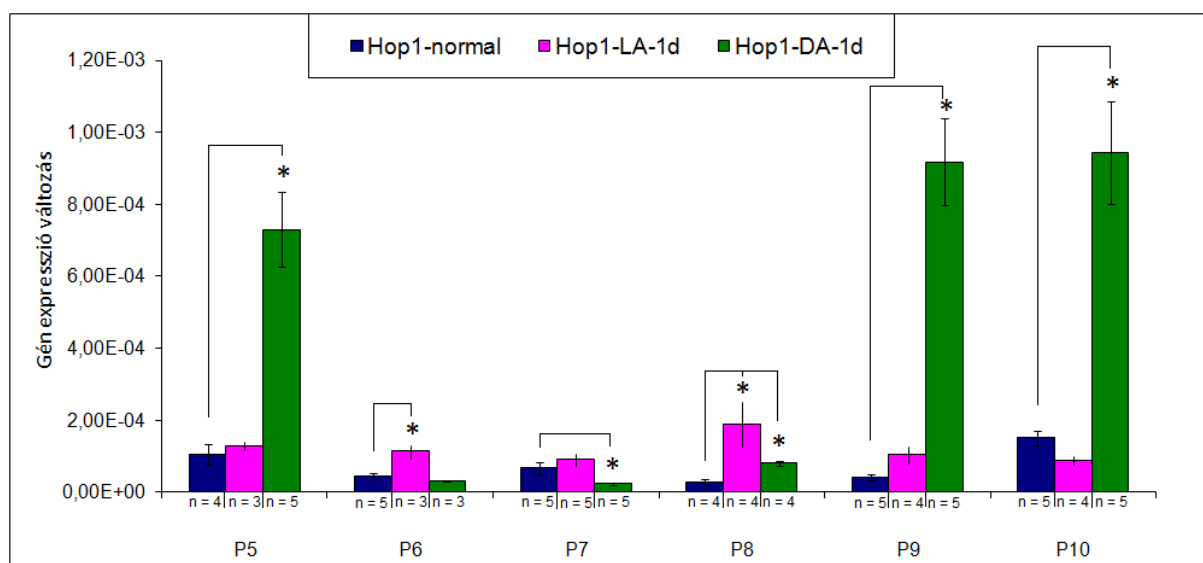
4.2.2 A Hop1 mRNS expressziós változásai fény- és sötét adaptáció hatására

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)

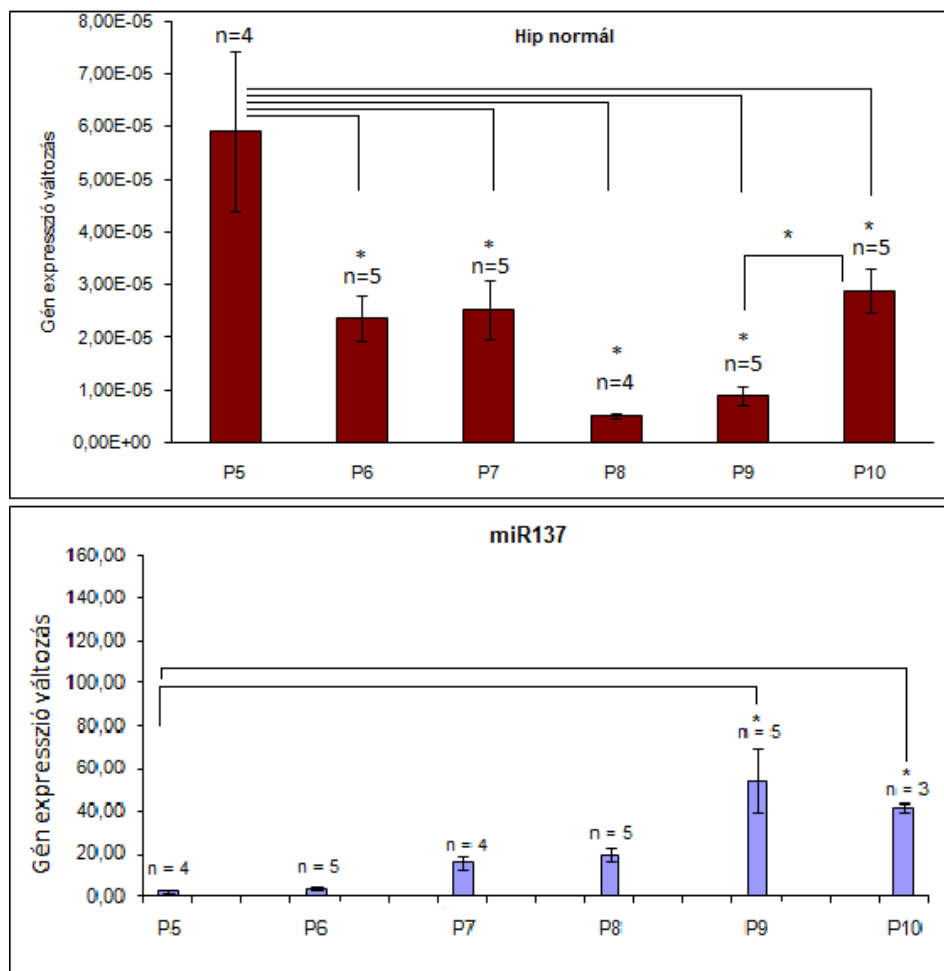
Hop1	P5	P6	P7	P8	P9	P10
LA	1,24	2,50*	1,34	4,59*	2,54	0,59
SD ±	0,13	0,41	0,24	2,3	0,61	0,08
DA	7,00*	0,7	0,34*	2,98*	22,52*	6,28*
SD ±	1,00	0,05	0,06	0,26	2,98	0,96

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

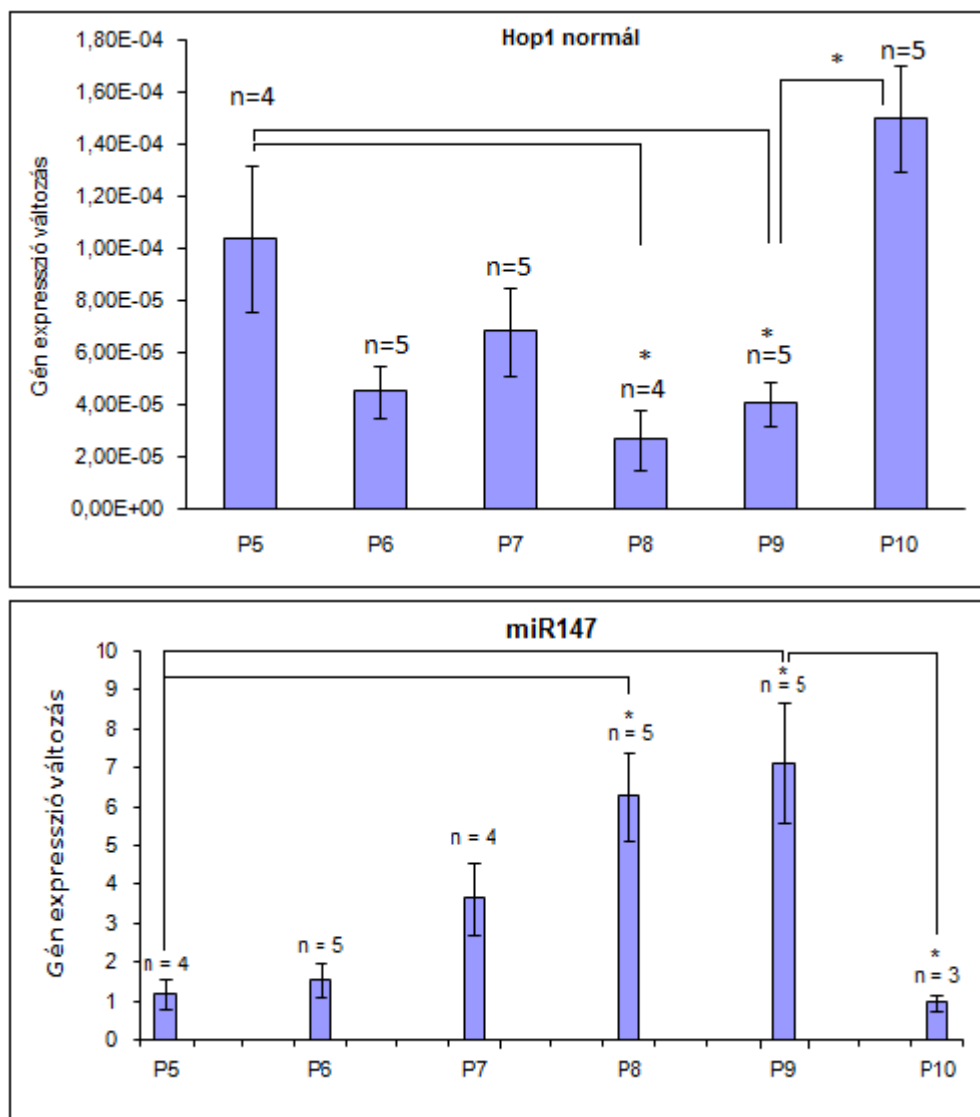
A Hip mRNS expressziójának folyamatos csökkenő tendenciájával ellentétben a miR137 expressziós szintjében (**13. ábra**) egy – nem szignifikáns mértékű – de folyamatos, enyhe növekedés fedezhető fel, mely a P9 és P10 korú mintáknál már szignifikáns mértékűvé válik. A P5 korú minták expressziós szintjéhez 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

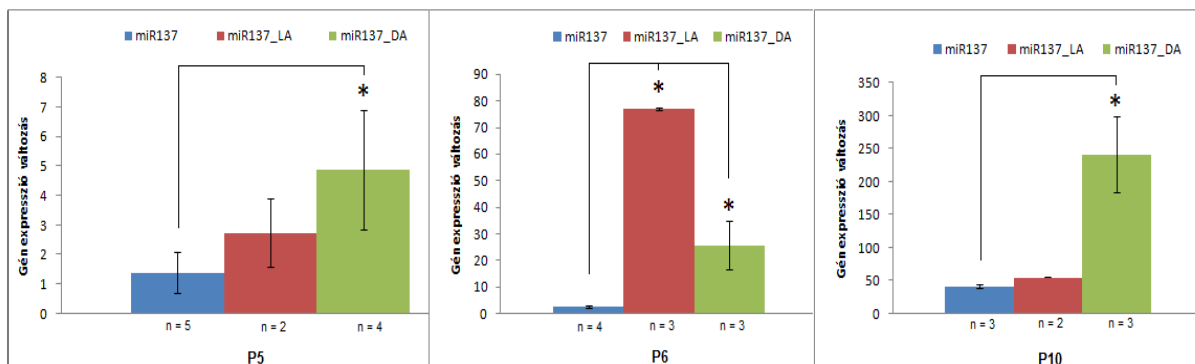
10. táblázat – A miR137 és a miR147 normál fejlődésű retinában mért expressziós változásai (A * jelölés a szignifikáns változásokra utal)

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.

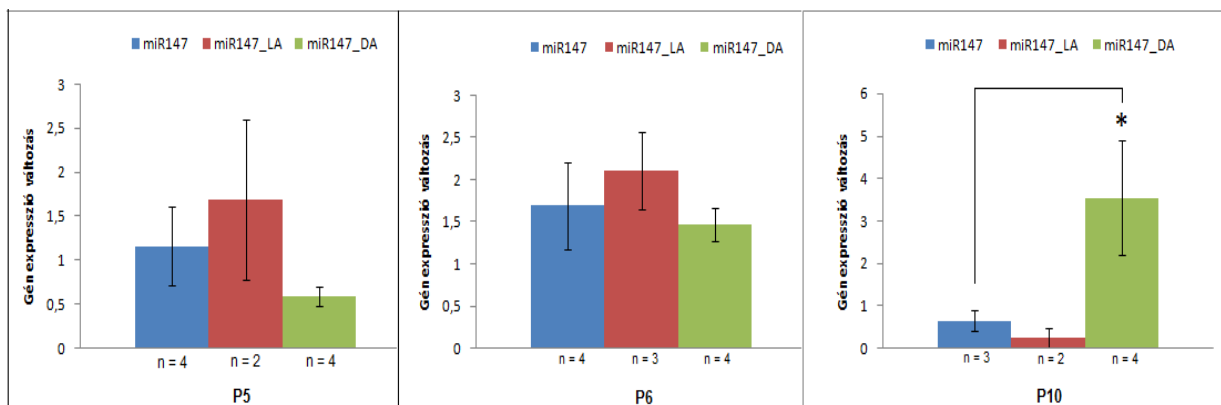
Eredményeink alapján sem a miR137 (**15. ábra**), sem a miR147 (**16. ábra**) esetében nem sikerült fordított expressziós választ detektálni a Hip és Hop1 mRNS-ek expressziójával sem a fény, sem a sötét adaptált mintákban.

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

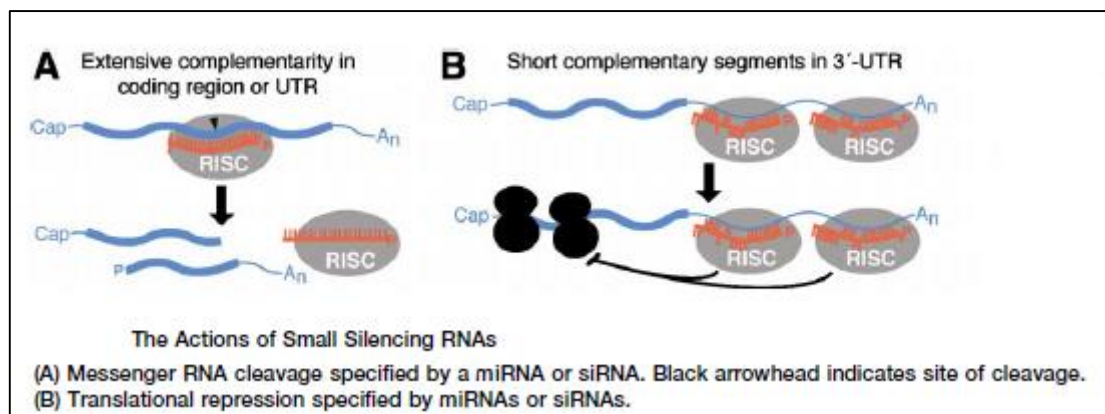
esetében azonban az expressziós szintbeli dominancia még kifejezettebbé válik a vizsgált időszakban. Sötét adaptált retinában azonban a Hip és Hop1 expressziója is hasonló tendenciát követve változik, és bár a Hip mRNA expressziós szintje nagyságrendileg a Hop1 szintjének megközelítőleg a fele a teljes 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 ribonukleoprotein 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 „bepölő” 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 rágszálóknak. 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.