

## Zárójelentés OTKA K72592

Az OTKA K72592 sz. pályázat folytatása volt a korábbi T046589 sz. pályázatnak, melynek fő témája a PACAP neuroprotektív hatásainak vizsgálata volt. A jelenleg lezárásra kerülő pályázatban ezt a témát folytattuk, azonban a PACAP védő tulajdonságait jóval többféle megközelítésben vizsgáltuk. A pályázati célkitűzéseket két fő téma köré csoportosítottuk: a protektív hatás mechanizmusának vizsgálata és az endogén PACAP szintek változásának vizsgálata. A jelen OTKA pályázat támogatásával a témában összesen 76 folyóirat közlemény született, melyeknek összesített impakt faktora: 197,3 (absztraktok nélkül). Az OTKA pályázat kezdete óta munkacsoportunkból 6 PhD és 1 habilitációs fokozatszerzés született. További PhD dolgozatok születtek kollaborációs munkacsoportokból, részben a bemutatott közlemények és téma felhasználásával. Jelenleg 12 PhD hallgató dolgozik a munkacsoportban, a PhD fokozat megszerzése a következő években várható. A pályázati periódusban a pályázati témákból 28 TDK előadás született, köztük 2 házi első díj, egy országos első helyezés, Pro Scientia kitüntetés, két kiváló előadói díj és két nemzetközi I. díj, valamint 8 államvizsgadolgozat. A pályázatban nevesített résztvevő kutatók közül 4 személy Bolyai Ösztöndíjban részesült a pályázat ideje alatt.

Eredményeink összefoglalása:

### ***A PACAP sejtvédő hatásmechanizmusának vizsgálata in vivo és in vitro***

A korábbi években számos vizsgálatot végeztünk a PACAP idegrendszeri védő hatásának vizsgálatára. Ezekből, és más tanulmányokból úgy tűnik, hogy a PACAP erőteljes védő hatásáért többféle mechanizmus a felelős, elsősorban antiapoptotikus, antiinflammatorikus és antioxidáns hatásai. Ezek további vizsgálatához a pályázati periódusban többféle in vivo és in vitro modellt választottunk.

A PACAP in vivo neuroprotektív szerepét elsősorban retina modelleken vizsgáltuk. A korábbi években már kimutattuk, hogy a PACAP véd excitotoxicus és ischemiás retinadegenerációban. Jelen pályázati periódusban kimutattuk, hogy a PACAP védő hatást fejt ki UV fény-indukálta károsodásban (*Atlasz et al. J Mol Neurosci 2011*) és diabeteses retinopathiában (*Szabadi et al. Cell Tissue Res 2012*) is. Ezen utóbbi védelem hátterében antiapoptotikus folyamatokat mutattunk ki. A PACAP főként a dopaminerg amakrin sejteken fejtett ki erőteljes védő hatást. Olyan modellekben, melyekben korábban már igazoltuk a PACAP védő szerepét, tovább vizsgáltuk a neuroprotektív hatásmechanizmust, elsősorban krónikus hipoperfúzió és excitotoxicus retinakárosodás modellekben. Western blot és citokin array segítségével igazoltuk, hogy a PACAP a retinában a hipoperfúzió által indukált citokin expressziót és proapoptotikus jelátviteli utakat (JNK, p38 MAPK) ellensúlyozza és számos antiapoptotikus, sejtvédő faktort stimulál, mint pl. Akt és ERK (*Szabó et al. Neurosci Lett 2012*). Ugyancsak ischemiás és glutamát indukálta retinakárosodásban vizsgáltuk a PACAP egyes specifikus markereket mutató sejteken kifejtett védő szerepét (*Atlasz et al. J Mol Neurosci 2008, Atlasz et al. Brain Res Bull 2010*). Leírtuk a PACAP fragmensek hatását is retinadegenerációban, ahol azt találtuk, hogy a PACAP38 és PACAP27 egyforma védő szereppel bír, míg az antagonistá hatású rövidebb fragmensek, mint a PACAP6-38 és PACAP6-27 tovább

fokozza a károsodást, ezzel is bizonyítva a PACAP endogén védő szerepét (*Atlasz et al. Ann NY Acad Sci 2009*). Elektroretinográfiás vizsgálattal bizonyítottuk azt is, hogy a PACAP kezelés hatására megfigyelt morfológiai javulás funkcionális javulásban is megmutatkozik (*Varga et al. J Mol Neurosci 2011*).

Összehasonlítottuk a PACAP hatását több más neuroprotektív szer hatásával, többek között a PACAP peptiddel legszorosabb szerkezeti rokonságot mutató VIP-vel is (*Szabadfi et al. J Mol Neurosci 2012*), továbbá sevofluran prekondicionálással (*Szabadfi et al. J Mol Histol 2012*), a stressz rendszeren keresztül ható urokortinnal (*Szabadfi et al. Neurosci Lett 2009*) és a PARP gátlásával (*Mester et al. Neurotox Res 2009*). Azt is vizsgáltuk, vajon a bizonyítottan neuroprotektív ingergazdag környezet és PACAP hatása együtt erőteljesebb retina védelemben nyilvánul-e meg. Azt találtuk, hogy míg az ingergazdag környezet jelentősen védi a retinát az excitotoxicus károsodással szemben (*Szabadfi et al. Brain Res 2009*), ezt a PACAP kezelés tovább nem növeli, hatásuk nem additív (*Kiss et al. Neurosci Lett 2011*). Leírtuk a retina degenerációt újszülöttkori asphyxiában is (*Kiss et al. Brain Res 2009*), ahol a PACAP védő szerepét jelenleg teszteljük. Humán retina pigment epithelsejtekben kimutattuk, hogy a PACAP antiapoptotikus hatással rendelkezik (*Mester et al. J Mol Neurosci 2011*), és ezt a védő hatást számos apoptosisban részt vedő jelátviteli rendszeren keresztül fejt ki, többek között a Bax, Bad, HIF-1 alfa, heat shock proteinek, Fas asszociált fehérjék és TNF alfa. Ezekben a sejtekben a PACAP az oxidatív stressz hatására megváltozó citokintermelést is jelentősen befolyásolja (*Fábián et al. J Mol Neurosci 2012*). A retinán kívül belfülben is leírtuk a PACAP védő szerepét, és kimutattuk, hogy a szőrsejtekben is antiapoptotikus hatása van a peptidnek, részben a kaszpáz 3 gátlása révén (*Rácz et al. Regul Pept 2010*). Vizsgáltuk az újszülöttkori stressz szerepét az idegrendszer fejlődésében, és ebben az anyai megvonás modellben jelenleg teszteljük a PACAP hatásait, miután igazoltuk a PACAP expressziót az agytörzsi stressz központokban (*Gaszner et al. Neuroscience 2012, Int J Dev Neurosci 2009, Farkas et al. Brain Res Bull 2009*). Igazoltuk továbbá, hogy a PACAP jelentős védő hatást fejt ki „fluid percussion” traumás agykárosodásban, amit a csökkent axonkárosodás bizonyít a corticospinalis pálya területén (*Kövesdi et al. Neurotox Res 2008*).

A PACAP sejtvédő hatásmechanizmusát vizsgáltuk nemcsak neuronális, hanem perifériás sejteken is. Ezen vizsgálatok segítségével és irodalmi adatok alapján is úgy tűnik, hogy a PACAP sejtvédő hatása általános érvényű, és nagyon hasonló útvonalakon keresztül történik a neuronális és nem neuronális sejtekben. Például vizsgáltuk ezt a hatásmechanizmust vesesejteken is, ahol azt találtuk, hogy a PACAP hatására a mitochondriális sejtvédelmi útvonal erőteljesebben expresszálódik (mint pl a Bcl-2 molekula), valamint a citokin expresszió jelentősen lecsökken (*Horváth et al. J Mol Neurosci 2011, J Mol Neurosci 2010, Brubel et al. Transplant Proc 2011*). Vesesejteken azt is igazoltuk, hogy a PACAP fokozza az antioxidáns kapacitást, mivel PACAP kezelés hatására a szöveti antioxidáns GSH és a SOD szintek emelkedtek. Továbbá leírtuk a PACAP védő szerepét doxorubicin-indukálta szívizomkárosodásban (*Rácz et al. J Mol Neurosci 2010*), szívizom ischemia-repergúziós károsodásban (*Róth et al. Ann NY Acad Sci 2009*) és bél ischemia/reperfúzióban (*Ferencz et al. J Mol Neurosci 2009, Transplant Proc 2009a,b*).

Azt is vizsgáltuk, hogy milyen faktorok befolyásolhatják a PACAP neuroprotektív illetve általános citoprotektív hatásait. Így kimutattuk, hogy

pinealocitákban a PACAP védő hatása függ a napi ritmustól (*Racz et al. J Mol Neurosci 2008, Horvath et al. Neurosci Lett 2011*). A receptoriális hatásmechanizmussal kapcsolatban pedig azt az érdekes megfigyelést tettük, hogy több szövet/sejttípusban a PACAP általánosan használt antagonistája, a PACAP6-38 agonistaként viselkedik, mely egy eddig ismeretlen receptor altípus létezését veti fel (*Reglődi et al. J Mol Neurosci 2008, Brubel et al. J Mol Neurosci 2010, Boronkai et al. Ann NY Acad Sci 2009*). Corneában is kimutattuk, hogy a PACAP kezelés gyorsítja a felszíni hámsérülés gyógyulását, ennek során a sejtvédő faktorok termelése fokozódik. A könnyben jelen lévő PACAP így endogén úton is segítheti a sebgyógyulást, mint ahogy még szisztémás PACAP kezelés is befolyásolja a könnytermelést (*Gaal et al. J Mol Neurosci 2008*). A cornea adatok kiértékelése jelenleg utolsó fázisában van (eddig konferencia poszteren mutattuk be ezeket az eredményeket).

A PACAP neuroprotektív hatásmechanizmusát neurodegeneratív betegségek modelljében a pályázat keretében elkezdtük, és jelenleg folynak még az ezzel kapcsolatos vizsgálatok. Parkinson kór és Huntington chorea modellekben vizsgáljuk a PACAP-indukálta jelátviteli változásokat, valamint PACAP génhiányos egerekben a neurodegenerációval szemben mutatott fokozott érzékenységet.

### ***Az endogén PACAP előfordulása és változása biológiai mintákban***

A pályázat megkezdésekor az endogén PACAP jelenlétét biológiai folyadékokban mindössze vérplazmában ismerte az irodalom. A pályázati periódusban csaknem minden emberi folyadékban vizsgáltuk a PACAP jelenlétét tömegspektrometriai és RIA módszerekkel. Kimutattuk, hogy a PACAP előfordul az anyatejben, a tüszőfolyadékban és a könnyben, míg nem volt kimutatható csarnokvízben, ondófolyadékban, hüvelyváladékban, nyálban és izzadságban (*Brubel et al. J Mass Spectrom 2011, J Mol Neurosci 2012*). Anyatejben azt találtuk, hogy a PACAP koncentrációja a vérplazmában található koncentrációnál 5-20szor nagyobb, ami feltételezi, hogy az anyatejben lévő PACAP fontos szerepet játszik az újszülött és/vagy az emlőmirigy fejlődésében (*Börzsei et al. 2009*). Ezt a magas PACAP szintet igazoltuk emberi fogyasztásra használt állati tejekben is (*Czeglédi et al. Gen Comp Endocrinol 2011*). Az utóbbi időben pedig egy több mint kétéves vizsgálat lezárult, melynek során a szoptató kismamákat követtük a szoptatási idő alatt és leírtuk a PACAP szintek változását több mint mérfél éves szoptatás során. Azt találtuk, hogy a colostrumban a PACAP szint szignifikánsan magasabb, mint az érett tejben, majd 7 hónapos korig szintje stagnál és utána megint emelkedést mutat (*Csanaky et al. J Mol Neurosci 2012*). Munkánk kezdetekor feltételeztük, hogy a PACAP szintje különböző élettani illetve patológiai folyamatokban változik, és ez összefüggést mutathat a betegséggel vagy állapottal. Ilyen vizsgálatokat a közelmúltban humán tüszőfolyadékkal végeztünk hiperstimulált nőbetegekből nyert tüszőfolyadékkal, ahol a PACAP szint és az érett petesejt szám között korrelációt találtunk (*Koppán et al. J Mol Neurosci 2012*). Kimutattuk továbbá, hogy a vérben kimutatható PACAP szint a terhesség előrehaladtával nő, majd a szülés során szintje hirtelen leesik, végül pedig a szülést követő 3 nap múlva a kiindulási értéket mutatja. Újszülöttek vérében is a felnőttekhez hasonló értéket mértünk (*Reglődi et al. J Endocrinol Invest 2010*). További humán szöveti mintákban is vizsgáltuk a PACAP szintjét, mint pl. kardiológiai és tumoros betegeken (*Szántó et al. J Mol Neurosci 2012*). További vizsgálataink jelenleg is

folyamatban vannak. A PACAP biológiai folyadékokban való rutin, megbízható méréséhez a tömegspektrometriai vizsgálatok folyamatos fejlesztés alatt állnak, ezzel kapcsolatban is számos közleményt publikáltunk (*Szabó et al. Cleft Palate Craniofacial J 2012*, *Jarai et al. Pathol Oncol Res 2012*, *Szanto et al. Technol Cancer Res Treatment 2012*, *Ivanova et al. Food Anal Meth 2011*, *Mark et al. J Archeol Sci 2010*, *Boros-Majoret et al. J Archeol Sci 2011*). Állatok szérumában és szöveteiben is vizsgáltuk a PACAP szint változásait. Többek között leírtuk patkány vesében a PACAP szint változását ischemia/reperfúziót követően (*Szakály et al. Transplant Proc 2010*). Nervus trigeminus ingerlés hatására emelkedést írtunk le a patkány szérumban és a trigeminus ganglionban is nitroglicerinnel adásakor (*Tuka et al. Peptides 2012*). Mindezek az endogén PACAP korábban már kimutatott fájdalomban játszott szerepének további bizonyítékai. Súlyos koponyasérültek likvorából kimutattuk, hogy a túléléssel szoros korrelációt mutat a magasabb PACAP szint (poszterbemutatás konferencián, *Bukovics et al. 2009*). A továbbiakban mindezen vizsgálatokat folytatjuk, és reményeink szerint a PACAP rutin mérésével és széleskörű diagnosztikai feltérképezésével lehetővé válik a PACAP biomarkerként való hasznosíthatósága a jövőben.

A PACAP endogén szerepével kapcsolatban igen fontos lépés volt, hogy Japán kollaboráción keresztül PACAP knockout egerekhez jutottunk, és számos, sejtvédelemmel kapcsolatos kísérletet végeztünk. Összefoglalóan, a PACAP génhiányos egerek jóval érzékenyebben reagálnak káros behatásokra, mind idegrendszeri, mind perifériás károsító tényezőkre. Míg normál állatokban csupán a fejlődés időbeli lefolyása változik a PACAP vad típusokhoz képest (mint mielinizáció folyamata – *Vincze et al. Int J Dev Neurosci 2011*, vagy a calcium-kötő fehérjék érzékszervi expressziója - *Tamás et al. Neurotox Res 2012*), addig a KO egerekben a szövettani és molekuláris szintű károsodás, valamint gyulladási folyamatok is jóval súlyosabb különböző modellekben. Ezt igazoltuk in vivo például ischemiás retinakárosodásban (*Szabadfi et al. Neurotox Res 2012*), endotoxin-indukálta légúti gyulladásban (*Elekes et al. Peptides 2011*), ischemia-indukálta vese- és bélkárosodásban (*Ferencz et al. J Mol Neurosci 2010a, b*, *Ferencz et al. Transplant Proc 2010*, *Szakály et al. Neuropeptides 2011*, *J Mol Neurosci 2008*), in vitro pedig oxidatív stressz és hypoxia-okozta vesesejt pusztulásban (*Horvath et al. Neurosci Lett 2010*, *Transplant Proc 2010*). Kimutattuk azt is, hogy a PACAP endogén hiányában változik az állatok stresszre és fájdalomingerre adott válasza is (*Gaszner et al. Neuroscience 2012*, *Markovics et al. Neurobiol Dis 2012*, *Sandor et al. Neuropeptides 2010*) a korábban munkacsoportunk által leírt válaszokkal szemben (*Sandor et al. Pain 2009*), valamint fokozottan jelenik meg az allergiás kontakt dermatitis oxazolon hatására (*Kemeny et al. J Mol Neurosci 2010*).

Az elmúlt években több, a pályázat témáihoz kapcsolódó összefoglaló tanulmányt is írtunk, többek között a PACAP neurodegeneratív betegségek in vivo és in vitro modelljeiben játszott szerepéről (*Reglődi et al. Curr Phar Des 2011*), a PACAP nephroprotektív hatásairól (*Reglődi et al. Neuropeptides 2012*), a PACAP KO egerek fokozott érzékenységről (*Reglődi et al. J Mol Neurosci 2012*), valamint a PACAP traumás idegi léziókban (*Tamás et al. Int J Mol Sci 2012*) illetve retinadegenerációkban (*Atlasz et al. Ann NY Acad Sci 2010*, *Szabadfi et al. Int J Mol Sci 2010*) kifejtett védő szerepéről.

Korábbi OTKA támogatások segítségével munkacsoportunk alacsonyabbrendűekben is vizsgálta a PACAP előfordulását és hatásait. Bár ezek a munkák nem tartoznak szorosan a jelen lezárt pályázathoz, egyéb pályázatok segítségével, de kis részben az OTKA támogatással számos új felfedezést tettünk a PACAP filogenetikailag megőrzött szerepével kapcsolatban, melyek hosszú távon hozzásegíthetnek bennünket a PACAP alapvető biológiai szerepének megismeréséhez. Ilyen pl. az egyik fő vizsgálatunk, melyben kimutattuk, hogy a PACAP alapvetően fontos a puhatestűek memóriafolyamataiban, blokkolásával pedig memóriadeficit érhető el (*Pirger et al. J Neurosci 2010*). A memóriában betöltött szerepe mellett úgy tűnik, a PACAP egyik alapvető biológiai hatása az apoptózis gátlása, melyet igazoltunk csigában is (*Pirger et al. J Mol Neurosci 2010, J Mol Neurosci 2008*). Különböző mollusca és annelida fajokban feltérképeztük a PACAP előfordulását és változását a fejlődés során vagy különböző külső behatásokra, mint pl. hibernáció a csigában vagy (*Hernádi et al. Neuroscience 2008, Pirger et al. Neuropeptides 2010, Boros et al. J Mol Neurosci 2008, Boros et al. Cell Tissue Res 2010, Somogyi et al. Ann NY Acad Sci 2009, Varhalmi et al. J Mol Neurosci 2008*).