

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola
Összehasonlító Neurobiológia Program



A nyálmirigy aminerg és peptiderg szabályozása valamint a nyálelválasztás molekuláris mechanizmusa az éti csigában (*Helix pomatia*)

PhD értekezés

Pirger Zsolt

PÉCS, 2008

**A nyálmirigy aminerg és peptiderg szabályozása valamint a
nyáleválasztás molekuláris mechanizmusa az éti csigában (*Helix
pomatia*)**

Pirger Zsolt

PhD értekezés

Témavezető:

Dr. Kiss Tibor, DSc

Magyar Tudományos Akadémia
Balatoni Limnológiai Kutatóintézet, Tihany



Pécs-Tihany, 2008

BEVEZETÉS

A szájníyláson keresztül a szájúregbe jutott táplálék előemésztését, falattá történő formálását, valamint a nyelés elősegítését a nyál biztosítja. A külön szervként elkülönülő nyálmirigy a soksertéjű gyűrűsférgeknel jelenik meg elsőként, majd valamennyi állattörzsbén megtalálható különböző fejlettségi állapotban. A ragadozó, illetve növényevő életmód meghatározza a kiválasztott nyál összetételét. Egyes ragadozó életmódot folytató állatok nyálmirigysejtjei méregtermelésre is specializálódtak, mint pl. a *Conus* csigák nyálmirigyei, amelyek a conotoxint termelik, vagy a vérszívó rovarok, férgek nyálmirigyei, melyek antikoaguláns faktorokat termelnek. Eltérően a gerincesektől, a nyálmirigyek szekretoros mirigyvégekamrái a gerinctelenek esetében morfológiailag elkülönülő sejttípusokból épülnek fel. Ezek a különböző sejtek termelik a nyál egyes összetevőit, a fehérjéket, enzimeket, nyákot, mérgeket és antikoaguláns faktorokat. A sejtek összehangolt működését idegi szabályozás tartja fenn. A gerincesekben a nyálmirigy paraszimpatikus kolinerg és szimpatikus adrenerg bemeneteket kap. A gerinctelen szervezetek, köztük pl. a rovarok nyálmirigyében is jelen van a kolinerg szabályozás. Azonban számos szövettani, elektrofiziológiai és farmakológiai vizsgálat támasztotta alá, hogy a rovarokban a nyálmirigy idegi szabályozásában dopamin (DA) a jelentősebb ingerületátvivő. A rovarok nyálmirigyében a DA mellett további más transzmitterek és/vagy modulátorok, mint a szerotonin (5-HT), a proktolin és a nyálzást stimuláló peptid (SG-SASP) is képesek kiváltani nyálfelszabadulást. Noha a csigák pofa dúcaiban kimutatták a táplálkozási rendszert szabályozó DA-erg neuronokat, melyek fontos szerepet játszanak a táplálkozási mintázatgenerátor aktiválásában, a DA nyálmirigyben betöltött pontos szerepét nem tisztázták ezidáig. Továbbá, a csigák nyálmirigyének működésében, hasonlóan a DA-hoz, nem ismerjük a 5-HT és az acetilkolin (ACh) nyálelválasztásban betöltött szabályozó szerepét sem.

A mirigysejtekből a szekréció történhet exocitózissal és holokrin vagy apokrin mechanizmussal. Holokrin szekrécióval működő mirigyek, mind a gerinctelen, mind a gerinces szervezetek körében ismertek, mint pl. a faggyúmirigyek, a madarak uropygiális (tollászkodó) mirigyei, a halak axilláris mirigyei, a Harder mirigyek és a halak, pókok, puhatestűek méregmirigyei. Ezeknél a mirigyeknél, a holokrin szekréció folyamatos váladéktermelést eredményez, így a szekréció kiválasztása a felhasználáskor a tartalékból történik. A holokrin mirigyek végkamra sejtjei a váladéktermelésnél elpusztulnak és az egész sejt szekrécióvá alakul át. Egyes szerzők szerint a holokrin szekréció egy szabályozott mechanizmus, amely azonos lehet az apoptózissal vagy a nekrozissal. Leírták, hogy a *Biomphalaria straminea* csiga faj nyálmirigyének sejttípusai holokrin szekréció során szabadulnak meg váladékuktól. A holokrin szekrécióval történő nyálfelszabadulás molekuláris mechanizmusát azonban nem ismerjük.

A puhatestűek (Mollusca) a Földön ma élő második legnagyobb állatcsoport, fajszámában, csak az ízeltlábúak haladják meg. A törzs legnépesebb osztályát a csigák (Gastropoda) alkotják, melyek kevés számú, jól azonosítható idegsejtjeik miatt az idegrendszeri kutatások és különböző fiziológiai folyamatok sejtszintű vizsgálatainak kedvelt objektumaivá váltak. Legnagyobb termetű hazai fajunk, az éti csiga (*Helix pomatia* L., Pulmonata, Gastropoda) nyálmirigyének, mint viszonylag egyszerű modellnek a vizsgálata alapvető ismeretekhez vezethet nyálelválasztás sejtszintű és molekuláris mechanizmusának, valamint az idegrendszer szabályozó és integratív szerepének a megismerésében. A központi idegrendszer és a perifériális szervek közötti kémiai szignalizáció, valamint a modulálás mechanizmusai számos esetben hasonlóak a gerincesekben lejátszódó folyamatokkal, de ezek fajspecifikusak is lehetnek.

CÉLKITŰZÉSEK

Az éti csiga nyálmirigyének anatómiai felépítéséről, idegi szabályozásáról számos, azonban gyakran ellentmondó, információ áll rendelkezésünkre, szemben az acinussejtek nyugalmi állapotát fenntartó ionkonduktanciákkal, a mirigysejtek elektromos tulajdonságaival, azok

neurokémiai modulálhatóságával, elektrotónusos kapcsolataival, illetve a nyálfelszabadulás molekuláris mechanizmusával, melyekről nincsenek információink. Munkánk célja az volt, hogy elektrofiziológiai, immuncitokémiai, biokémiai és molekuláris biológiai módszerek segítségével vizsgáljuk a *Helix* nyálmirigyének működését, aminerg és peptiderg modulációját, valamint a nyálfelszabadulás lehetséges celluláris mechanizmusait.

Célul tűztük ki tehát, hogy:

- i) azonosítsuk az éti csiga nyálmirigyét felépítő mirigysejt típusokat
- ii) leírjuk a mirigysejtek elektromos tulajdonságait és jellemezzük az azokat fenntartó ionáramokat, ionpumpa mechanizmusokat
- iii) vizsgáljuk a mirigy összehangolt működésének háttérben álló sejtközi kommunikációs lehetőségeket, azok megjelenését, sejtfelszíni eloszlását
- iv) tanulmányozzuk a nyálszekréció celluláris eseményeit, nyomon kövessük a cisztás sejtek sorsát a nyálfelszabadítás mechanizmusában
- v) teszteljük transzmitterek és modulátorok hatását a nyálszekrécióra
- vi) azonosítsuk a nyálszekréciót hatásosan modulálni képes peptidet vagy peptideket
- vii) vizsgáljuk a sejthalál lehetséges szerepét a nyálszekrécióban, annak befolyásolhatóságát egyrészt transzmitter és modulátor molekulákkal (DA, 5-HT, ACh), másrészt egy ismert antiapoptotikus peptiddel, a PACAP-al

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok, preparálás és szövet-előkészítés

Kísérleteinkben a kifejlett *Helix pomatia* aktív, inaktív és hibernált egyedeinek nyálmirigyét használtuk fel.

A relaxált állatokat a bonctáliban rögzítettük, majd a bélcsatornát a nyálmiriggyel és a bukkális masszával együtt eltávolítottuk. Ezután a bélről a nyálmirigyet lefejtettük, majd kitűztük. Az elektrofiziológiai kísérletekhez a nyálmirigyet beidegző neuronokat tartalmazó pofadúcokat is kipreparáltuk a miriggyel együtt. A mirigyet 2-3 mm²-es darabokra vágtuk, majd ezeket rögzítettük a regisztráló edényben. A kitűzött mirigyeket normál fiziológiás oldattal (mM-ban megadva, 80 NaCl, 4 KCl, 10 CaCl₂, 5 MgCl₂, 10 TRIS-HCl desztillált vízben oldva és beállítva NaOH-al a pH=7,4-re) áramoltattuk 1-2 ml/perc sebességgel.

Szövet-tani vizsgálatok

A fénymikroszkópos klasszikus szövet-tani és az elektronmikroszkópos vizsgálatokra az 1% PFA-t és 2,5% glutáraldehidet tartalmazó 0,1 M PBS-ben fixált majd dehidrált szöveteket Aralditba ágyaztuk, majd félvékony, illetve ultravékony metszeteket készítettünk. Az így készült félvékony metszeteket 1%-os toluidinkék oldattal festettük. Az ultravékony elektronmikroszkópos metszeteket utófixáltuk 1% OsO₄-ot tartalmazó 0,1 M Na-cacodylat-pufferben, majd JEOL 1200EX készülékkel vizsgáltuk azokat.

A mirigyet a sejttípusok elkülönítésének céljából timsós hematoxilinnal és bázikus fuxinnal, míg a sejtosztódás kimutatására, HE-vel festettük. A festett metszeteket Zeiss Axioplan fénymikroszkópban vizsgáltuk.

Immuncitokémiai eljárások

Valamennyi általunk alkalmazott módszer az indirekt kétlépéses (fluoreszcens festékekkel, vagy peroxidázzal kapcsolt IgG), illetve a Sternberger-féle (1979) háromlépéses peroxidáz-anti-

peroxidáz eljárás elvén alapult. A szövettelőkészítés során a 4% PFA-t tartalmazó 0,1 M PBS-ben rögzített mintákat 20%-os szacharóz oldatban inkubáltuk, majd Tissue-Tek fagyasztóközegbe ágyasztuk, kriosztátban fagyasztottuk végül 12-16 µm-es metszeteket készítettünk. A metszeteket az elsődleges antitestekkel, majd a megfelelő másodlagos antitestekkel inkubáltuk.

A nyálmirigy korai apoptotikus folyamatainak megjelenítéséhez Annexin V-CY3, valamint TACS-XL – DAB *in situ* apoptózis detektáló kitetet használtunk. Az apoptotikus folyamatok során, a mitokondriumban lejátszódó potenciálváltozások nyomon követésére MitoCapture kitetet alkalmaztuk.

Western-blot analízis

A nyálmirigy fehérje tartalmát SDS-pufferben történő homogenizálással feltártuk. A homogenizátumot centrifugálással tisztítottuk, a felülúszót eltávolítottuk és SDS-minta-pufferrel 1:1 arányban hígítottuk. A mintákat denaturáltuk, 10-15% SDS-poliacrilamid gélen szeparáltuk a fehérjéket elektroforézissel, majd PVDF membránra elektroblottoltuk azokat. A blotolás után a membránt tejporral blokkoltuk, majd a fehérjéket a megfelelő elsődleges antitestekkel reagáltattuk. Az immunreakciót a másodlagos antitesttel történő inkubálást követően DAB és H₂O₂ oldattal intenzifikáltuk. A minták átlagos, totál fehérje tartalma ~85 µg volt, amit Bradford reagenssel határoztuk meg.

Az immunhisztokémia és a WB kontrollkísérletei

A legtöbb antitestnél preabszorpciós kontroll kísérleteket végeztünk a felismerési szekvenciát specifikusan blokkoló peptiddel. A preabszorpciós kontrollban nem kaptunk jelölést. Az innexin-2 és az aktív-kaspáz-3 antitestek esetében nem rendelkezünk blokkoló peptidekkel, így WB kísérletekben ellenőriztük a specificitást, afrikai vándorsáska nyálmirigy- és patkány agyi-homogenizátumot használva pozitív kontrollként. A WB kísérletek belső kontrolljaként anti-aktin antitestet alkalmaztunk. Minden esetben készítettünk negatív kontrollokat is az elsődleges és a másodlagos antitestek kihagyásával. Mivel a negatív kontroll kísérletek esetében nem detektáltunk jelet, és a pozitív kontrollal megegyező sávokat kaptunk, a kontrollok alapján a csiga minták jeleit specifikusnak tekintettük.

Elektrofiziológiai vizsgálatok

Az ideg ingerlések során a négyszög impulzusokat bipoláris, ezüst elektródán keresztül közvetítettük a pofadúcokat összekötő komiszúrákon keresztül.

Az anyaghatások vizsgálatánál az ACh, 5-HT és DA transzmittereket egy mikroperfúziós rendszerrel perfundáltuk a mérőedényen keresztül. Az anyagok végkoncentrációja soha nem volt magasabb, mint 10⁻⁵-10⁻⁶ M.

Áramméréseinkben a kálium áramokat TEA és 4-AP specifikus kálium csatorna blokkolók jelenlétében azonosítottuk. A kalcium áramok blokkolása céljából CdCl₂-ot oldottunk a normál fiziológiás oldatban. A klorid áramok azonosításához acetát ionokkal helyettesítettük a Cl⁻-at izomoláris mennyiségben. A klorid csatornák blokkolására NPPB-t alkalmaztunk.

A mirigysejtek nyugalmi membránpotenciálját, az ideg ingerlésre és anyaghatásra történő elektromos változásokat, valamint az ionáramokat Axoclamp 2B erősítővel erősítettük, majd szűrtük és egy TL-1, illetve Digidata 1200 jelátalakító segítségével digitalizáltuk. Az intracelluláris elektródákat boroszilikát üveg kapillárisokból vertikális elektródahúzóval készítettük. Az MP mérésekben 10-30 MΩ, míg a voltage-clamp mérésekben 4-8 MΩ ellenállású elektródákat alkalmaztunk. Az egy-mikroelektródás voltage-clamp mérésekben a protokollokpClamp 5.7.7. programmal generáltuk. Az elektrofiziológiai adatokat Origin 6.07-es programmal dolgoztuk fel.

Programozott sejthalál indukálása és kvantifikálása a nyálmirigyben

A nyálmirigy sejtekben a programozott sejthalált különböző anyagokkal és a nyálidegen keresztüli elektromos stimulációval váltottuk ki. A szerveket 10^{-4} és 10^{-8} M DA és 5-HT oldatokkal inkubáltuk. Más esetekben, a DA kezelés előtt DA receptor antagonistákkal (fluphenazin, etikloprid), vagy a K-csatorna blokkolókkal (TEA; 4-AP) előinkubáltuk a nyálmirigyeket. A kezeléseket után a mintákat 4% PFA oldatban rögzítettük, majd $10\ \mu\text{m}$ metszeteket készítettünk.

A TACS-XL pozitív (apoptotikus) sejtek számát az egyes állatok nyálmirigyéből ($n=6-8$) készített metszetek három területének ($1,8\ \text{mm}^2$ területet használtunk 400-as nagyításnál) átlagaként határoztuk meg. A specifikusan jelölt (TACS-pozitív) és a nem jelölt (TACS-negatív) sejtek egymáshoz viszonyított arányát egységnyi területen Zeiss Axioplan mikroszkópban számoltuk, majd az átlagértékeket ábrázoltuk oszlopdiagramon a SEM feltüntetésével OriginPro7.5-ös programot használva.

Radioimmunoassay (RIA)

A PACAP27 és PACAP38 tartalom RIA-val történő meghatározásának céljából a mintákat megfelelően előkészítettük. A PACAP38 C-terminális fragmentje (PACAP24-38) és a PACAP27 jodidálva volt és az egyes frakciókat fordított-fázisú HPLC-vel szeparáltuk annak megfelelően. A mono-jodidált formát a RIA mérés nyomjelzőjeként alkalmaztuk. A szintetikus PACAP38 és 27 formákat standardként használtuk. A meghatározás során $100\ \mu\text{l}$ antitestet valamint $100\ \mu\text{l}$ RIA nyomjelzőt és $100\ \mu\text{l}$ PACAP standardot vagy mirigy mintát összemértünk, majd inkubáció után, elkülönítettük az antitest kötött fehérjét a szabad fehérjétől $100\ \mu\text{l}$ szeparáló oldattal. A centrifugálást követően a felülúszót óvatosan leöntöttük, és a minták radioaktivitását egy gamma-számlálóban mértük. A nyálmirigy minták PACAP38 és PACAP27 koncentrációja leolvasható volt a megfelelően elkészített kalibrációs görbéről.

Citokró-m-c meghatározás

A nagyobb detektálható jel reményében a vizsgálatokban inaktív állatok nyálmirigyét alkalmaztuk. A mirigyek egy részét kontrollként használtuk méréseinkben ($n=6$; $0,197\text{g}$) míg másik részüket ($n=6$; $0,188\text{g}$) 10^{-4} M DA oldatba áztattuk 30 percig. Ezt követően mindkét mintát homogenizáltuk izo-ozmotikus cukor oldatban. A módosított, eredetileg Whittaker (1965) által leírt differenciált centrifugálási módszer alapján szeparáltuk a mitokondriális és a sejtalkotóktól mentes citoszól frakciót. A tiszta citoszól frakció tartalmazta a leadott citokró-m-c molekulákat. A mitokondriális frakcióban a citokró-m-c leadását CaCl_2 hozzáadásával indukáltuk és folyamatosan mértük fotométerrel az áteső fény abszorpcióját. A citokró-m-c abszorbanciáját (A) a kontroll és a DA-kezelt mintákban $540\ \text{nm}$ -nél spektrofotométerrel mértük. A citokró-m-c meghatározott abszorbancia értékeit OriginPro7.5 programmal dolgoztuk fel.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A csigák nyálmirigyében alapvetően négy sejttípust különítettünk el félvékony metszeteken toluidinkék festés mellett: a nyálkasejtet, a szemcsés sejtet, a vakuoláris sejtet és a cisztás sejtet. A negyedik sejttípus, a cisztás sejt a vakuoláris sejtek érési folyamatának eredményeképpen alakul ki a vakuólumok összeolvadásával. Véleményünk szerint, ez a sejttípus az aktív állatok nyálmirigyében gyakori és szoros kapcsolatban áll a nyálfelszabadulással. A csigák nyálmirigyére vonatkozó korábbi irodalmi adatok szerint a mirigysejtek igen széles skáláját írták le azonos csigafajok esetében is. Ennek hátterében a szezonális változások mellőzése, illetve az aktív és inaktív állapotok definiálásának a hiánya állhat. A mirigyállományban a különböző

sejttípusok acinusokba tömörülnek, melyekben elszórtan savós és nyákos mirigyváladékot termelő sejteket találtunk. Ebből adódóan a felszabaduló nyál kevert összetételű, amely enzimekben gazdag emésztő- és fehérjékben szegény hígító nyálat tartalmaz.

A HE festéssel az acinusok perifériás területein osztódó sejtek rétegét azonosítottuk. Az osztódó sejteket korai proliferációt detektáló Ki67 antitestekkel is kimutattuk. Ezeknek az osztódó sejteknek a száma aktivitásfüggést mutatott, az aktívan táplálkozó állatok nyálmirigyében erőteljesebb volt a proliferáció. Feltételezések szerint, a cisztás sejtől a nyálfelszabadulás holocrin mechanizmussal történik. Ezt a feltételezést erősítették meg adataink, miszerint az osztódó sejtek mellett a félvékony, toluidinkék festett sorozatmetszeteken intralobuláris nyálvezetékek mentén sejttörmelék azonosítottunk az aktív állatok nyálmirigyében. A sejttörmelék mennyisége, hasonlóan a proliferatív sejtekhez, függött az állat aktivitási állapotától. Az aktív állatokban a sejttörmelék mennyisége nagyobb volt, mint az inaktív állatok nyálmirigyében. A sejttörmelék az érési ciklus eredményeként pusztuló, a sejthalál klasszikus morfológiai és élettani jellemzőit mutató mirigysejtek maradványa. Az érés során kialakuló cisztás sejtek váladékukat a sejtpusztulás során adják le. Az aktív állatok nyálmirigyében a vacuoláris és cisztás sejtek pusztulási folyamatát apoptózisként azonosítottuk Annexin V-Cy3 és TACS-XL *in situ* apoptózis detektáló kitek segítségével.

A nyálmirigy ultrastrukturális vizsgálata során különböző típusú membránkapcsolatokat tártunk fel a szomszédos mirigysejtek között. A nem specializált lazább sejtkapcsolatok esetében széles extracelluláris tér volt látható (20 és 150 nm). A szorosabb membránkapcsolatokban a szomszédos sejtek membránja közötti távolság erőteljesen lecsökkent (10-20 nm). Máskor, az egymással parallel futó membránszakaszokon megnövekedett elektron denzitás volt megfigyelhető, elkülönült, széles sejt közötti térrel (~60 nm). Ezt a specializált membránkapcsolatot dezmoszóma-szerű sejtkapcsolatnak azonosítottuk. A szomszédos mirigysejtek klasszikus kommunikációs csatornája, a réskapcsolat (gap-junction) is kimutatható a mirigysejteken, melyet szoros membránkapcsolat jellemez (2-4 nm). Immunhisztokémiai technikát alkalmazva azonosítottuk ennek a specializált mirigykapcsolatnak a háttérben álló molekuláris struktúrákat, az innexineket. Az elektronmikroszkópos felvételeken azonosított elektrotónusos sejtkapcsolatok jelenlétét elektrofiziológiai méréseink is alátámasztották, ugyanis azt találtuk, hogy két egymáshoz közeli, mintegy 7-10 sejt távolságban elhelyezkedő (kb. 300 μ m) mirigysejt között az ingerület elektrotónusos terjedése jó. A sejt-sejt közötti elektrotónusos kapcsolatok a szegényes beidegzés ellenére biztosítják a mirigy szinkronműködését.

A mirigysejtek MP értéke a -30 és -80 mV-os értéktartomány közé esett, átlagos értéke $-56,6 \pm 9,8$ mV-nak adódott (n=483) normál fiziológiás oldatban. Ez az átlagérték nem mutatott jelentős eltérést a gerincesek, vagy a rovarok exokrin nyálmirigysejtjeinek MP értékétől. A nyugalmi MP fenntartásában elsősorban a K^+ -ok vettek részt, de kimutattuk, hogy az elektrogén Na-pumpák és a Cl-ok szerepe is jelentős.

A mirigysejtek mikroelektródával történő megszúrásuk után általában nem mutattak elektromos aktivitást, azonban egyes esetekben transzmitter felszabadulás okozta spontán miniatűr potenciálokat figyeltünk meg. Alkalmanként, a miniatűr potenciálok összegződtek és EPSP-ok voltak rögzíthetők, de regeneratív AP-t nem detektáltunk. Néha AP-szerű, ún. junctios potenciálokat láttunk, melyek amplitúdója 5 és 25 mV között mozgott.

A mirigysejtekben feszültség-függő inward és outward membrán áramokat regisztráltunk adott lépéssel depolarizálva a sejtet egy-mikroelektrodás voltage-clamp technikával. A mérések során meghatároztuk a mirigysejtek működésében részt vevő ionáramokat, úgy mint a I_K , I_A , $I_{K(Ca)}$ és az I_{Ca} -t. A totál outward K-áram 62%-a TEA szenzitív I_K komponens, míg 27%-a kalcium-függő $I_{K(Ca)}$ komponens volt. A mirigysejtpopuláció egy részében 4-AP szenzitív I_A áramkomponens is mérhető volt, ami a totál áram 55%-t tette ki. Az inward áram valószínűleg egy T-típusú kalcium-csatornán keresztül vándorolt és Cd^{2+} -al 100%-ban blokkolható volt. Ezek az ionáramok határozzák meg és tartják fenn a mirigysejtek elektromos tulajdonságait.

A pofadúcból eredő és a nyálmirigy működését szabályozó nyálideg elektromos ingerlése 30 mV körüli depolarizációt váltott ki a nyálmirigysejtekben. Hasonló depolarizációs válaszokat regisztráltunk, ha a mirigyet 10^{-4} - 10^{-5} M végkoncentrációjú ACh-al, DA-al és 5-HT-al kezeltük. A legerőteljesebb depolarizáló hatása az idegingerlésnek volt. Az idegingerlés, az ACh és a monoamin kezelés hatására kialakuló MP változás a mirigysejtekből kiváltott szekretoros potenciálként azonosítható. A szekretoros potenciál kialakításának háttérében álló idegvégződéseket elektronmikroszkópos felvételeken azonosítottuk a mirigysejtek között. A varikozitások szoros (16-20 nm), de nem specializált kapcsolatokat alakítanak ki a mirigysejtekkel. A különböző transzmitter molekulák hatását a felszabadított nyál mennyiségének mérésével is teszteltük. A szekretoros potenciálok indukálásában a leghatásosabb szignálmolekula az ACh, míg a nyálelválasztás szabályozásában a DA volt. Az idegrendszerben hatásos neuropeptidok, mint pl. MIP, FMRFa, CARP, szekretoros potenciált nem generáltak, azaz feltehetően a nyálelválasztás szabályozásában nincs transzmitter funkciójuk.

Különbséget találtunk az aktívan táplálkozó, illetve inaktív állatok nyálmirigye között a TUNEL-pozitív (apoptotikus) sejtszám tekintetében. Az aktív állatok nyálmirigyében megnövekedett TUNEL-pozitív sejtszám volt detektálható, szemben az inaktív mirigyekkel. A mirigysejtek közül elsősorban a vakuoláris- és cisztás sejtek mutattak TUNEL pozitivitást. Ez arra utalt, hogy a táplálkozás során ezek a sejtek a megfelelő jelre apoptózis során elpusztultak, miközben leadták az általuk termelt nyálat. De mi lehetett az apoptotikus szignált kiváltó jel? Korábbi biokémiai mérések igazolták, hogy a DA koncentrációja az éhes, táplálkozását megkezdő állatok nyálmirigyében szignifikánsan magasabb, mint a jóllakott állatokéban. Eredményeink szerint a nyálelválasztás leghatásosabb transzmittere, a DA, amely képes volt az apoptotikus sejtszámot jelentősen megnövelni az inaktív állatok nyálmirigyében. Hasonló eredményeket kaptunk az idegingerléssel is, mely során többek között DA szabadul fel az idegvégződésekből. A DA a D2 receptoron keresztül fejt ki hatását, ugyanis a receptor eticlopriddal történő szelektív blokkolásakor a DA apoptózis indukáló hatása elmaradt. A TEA, mint az I_K szelektív blokkolója gátolta a DA apoptózis stimulációját, míg a tranziens K-áramot blokkoló 4-AP hatástalan volt. Ez azt jelentette, hogy a DA apoptózis stimuláló hatását részben a D2 receptorokon hatva, részben pedig a K^+ homeosztázisának befolyásolásával fejt ki.

A DA által kiváltott MP változás (szekretoros potenciál) az intracelluláris K^+ koncentráció csökkentésén keresztül befolyásolja a mitokondriumok transzmembrán potenciálját (MMP) is. Kialakulnak a mitokondrium membránpórusai, melyek elmélyítik a MMP megváltozását. A membránpórusok kialakításában résztvevő számos elem közül az inaktív Bcl2 és az aktív Bad fehérjék részvételét mutattuk ki a mirigysejtekben WB technikával. Az antiapoptotikus (Bcl2) és a proapoptotikus (Bad) fehérjék aránya, amely eldönti a sejt sorsát azáltal, hogy elindul-e az apoptózis intrinsic útvonala, alapvetően függött az állat aktivitási állapotától ill. a DA szinttől. A pro- és antiapoptotikus fehérjék arányát a DA kezelés az aktív Bad molekula felé mozdította el, alátámasztva a DA apoptózist serkentő hatását. A kialakított membránpórusokon keresztül megnőtt a mitokondrium membránjának az áteresztőképessége és a citokrom-c, mint legfontosabb apoptózis indukáló faktor a citoplazmába transzlokálódott. Az inaktív állatok nyálmirigyében a DA kezelés fokozni tudta a citokrom-c mitokondriumból történő felszabadulását. A citokrom-c a kaszpáz-9 és az APAF-1 molekulákkal kialakítja az apoptozómát, ami az apoptózis legfontosabb szabályozó molekuláját, a kaszpáz-3-at aktiválja az intrinsic apoptotikus szignálban.

Immunhisztokémiai és WB technikával a megfelelő antitestek felhasználása mellett azonosítottuk a cisztás sejtekben az aktív-kaspáz-3-at, mint az apoptózis legfontosabb irányító és végrehajtó molekuláját. Az aktív-kaspáz-3 immunopozitív jeleket a cisztás sejtek citoplazmájában a membránközeli régióban azonosítottuk kizárólagosan. A DA képes volt megemlíni az aktív-kaspáz-3 molekula mennyiségét a jelátviteli mechanizmus eredményeként. Azonban eticloprid jelenlétében a DA kaszpáz-3 aktiváló hatása blokkolható volt. A kaszpáz-8 molekulát, amely az extrinsek és intrinsek útvonalat összekapcsolja, a jelátviteli folyamatokban nem tudtuk kimutatni, így feltételezhető, hogy a klasszikus extrinsek útvonal nem vesz részt a

mirigysejtek apoptotikus folyamataiban. Véleményünk szerint valamely más útvonal és/vagy ezidáig nem azonosított molekula(ák) kapcsolja össze a receptor közvetített DA hatást és az apoptózis intrinsic útvonalát egymással. Ezt alátámasztja az M β CD jelenlétében megismételt DA inkubáció alatt tett megfigyelés is. Az M β CD gátolja a membránban a ceramid közvetítette lipid-szigetek kiépülését, amelyen a jelátviteli útvonal egyes elemei, mint receptorok, ionszatórnák, enzimek, stb. horgonyoznak. Amikor a ceramidot gátoljuk a lipid-szigetek kiépülése nem történik meg, a szignáltranszdukció sérül, így a DA hatás nem jut el a mitokondriumig, ennek következtében a DA citokróm-c felszabadulást serkentő hatása elmarad. Valószínű, hogy a ceramid kulcs molekulája a jelátviteli folyamatoknak a nyálmirigyben.

A nyálmirigyben megfelelő antitestek felhasználásával PACAP tartalmú mirigysejtek detektáltunk, míg PACAP immunoreaktív idegelemeket, a gerincesek exokrin mirigyével ellentétben, nem azonosítottunk. RIA mérések eredményeként kimutattuk a PACAP mindkét formáját a mirigyszövetben, melyek koncentrációja aktivitásfüggést mutatott. Biokémiai méréseinkkel igazoltuk, hogy a PACAP funkcióképes molekula a mirigysejtekben, mivel a PACAP kezelés hatására 50%-al megnövekedett a cAMP koncentrációja (cAMP assay kit, Biorad). Kimutattuk a PACAP antiapoptotikus hatását a mirigysejtekben, ugyanis a DA és a colchicine apoptózist indukáló hatását a PACAP leblokkolta. A PACAP hatás a kaszpáz-3 molekulák esetében is kimutatható volt. A PACAP jelenlétében a DA nem volt képes megemelni az aktív-kaspáz-3 molekula koncentrációját a mirigysejtekben.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk célja az volt, hogy elektrofiziológiai, immuncitokémiai, biokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáljuk a nyálmirigy működését, különös tekintettel a nyálfelszabadulás molekuláris mechanizmusára. Az éti csiga nyálmirigye, mint minden szerv, az idegrendszer irányítása alatt áll. A gerinces mirigysejtektől elektromos tulajdonságaik szempontjából nem különböző egyes mirigysejt típusok acinusokba tömörülnek, melyben elektrotónusosan kapcsolnak egymással. Ez, a viszonylag szegényes beidegzés ellenére biztosítja a nyálmirigy szinkron működését. A mirigysejtek között található idegvégződésekből a nem szinaptikus kapcsolatokon keresztül, az idegingerlés során felszabaduló transzmitterek (DA, 5-HT, ACh) szekretoros potenciálokot generálnak, melyek hatására a nyálsejtekből megtörténik a nyálfelszabadulás excitózissal, illetve vacuoláris és cisztás sejtek esetében holokrin szekrécióval. A holokrin szekrécióval egyenértékű folyamatként a nyálszekrécióban az apoptózis azonosítható. Az apoptózis meghatározott morfológiai és biokémiai elváltozásai, mint foszfatidilserin molekulák külső membránba történő megjelenése, a citoplazmatikus és nukleáris elemek fragmentációja, a fehérjék degradációja és a sejtmembrán felszakadozása megfigyelhető volt a mirigysejtekben. Az elsődleges nyálvezetékek mentén megjelenő sejtörmelék a felszabaduló nyállal eliminálódott. Az apoptózis ebben a formájában a mindennapi nyálszekréció eszköze, s mint ilyen fiziológiai folyamat. Az apoptózist intrinsic és extrinsic szignálok szabályozzák. Az intrinsic útvonal aktiválásának eredményeként a mitokondriumból citokróm-c szabadul fel a citoplazmába. Kísérleteink igazolták, hogy a nyálevlasztás molekuláris mechanizmusa során a transzmitterként felszabaduló DA a D2 receptoron keresztül stimulálja a citokróm-c transzlokációját, amely folyamat a pro- és antiapoptotikus Bcl-2 fehérjék szabályozása alatt áll. Mindemellett a fokozott K⁺ leadás is képes apoptózist indukálni. A DA stimulálta a mirigysejtekben a TEA szenzitív K-csatornák működését, megnövekedett a K-efflux, ami apoptotikus szignált generált. Az alacsony intracelluláris K⁺ koncentráció közvetlenül is képes fokozni a kaszpáz-3 aktivációját. Igazoltuk, hogy a DA a D2 receptorokon közvetlenül illetve a K⁺ homeosztázisán keresztül képes az apoptózis végrehajtó molekuláját, a kaszpáz-3-at aktiválni. A nyálevlasztásban az extrinsic és intrinsic útvonalakat összekapcsoló folyamat ez idáig ismeretlen, ugyanis a kapcsoló molekulát, a kaszpáz-8-at nem sikerült kimutatni a jelátviteli

mechanizmusban. DA által aktivált apoptotikus folyamatok hatásosan blokkolhatók az éti csiga egyik endogén peptidjével, a PACAP-al. A PACAP hatás célmolekulája a kaszpáz-3 molekula.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T. (2004): Functional morphology of the salivary gland of the snail, *Helix pomatia*. *Acta Biol. Hung*; 55:1-4. IF: 0,447
- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T. (2006): Electrical properties and cell-to-cell communication of the salivary gland cells of the snail, *Helix pomatia*. *Comp. Biochem. Phys. Part A*; 145:7-19. IF: 1,553
- Pirger, Zs., Németh, J., Hiripi, L., Tóth, G., Kiss, P., Lubics, A., Tamás, A., Hernádi, L., Kiss, T., Reglődi, D. (2008): PACAP has anti-apoptotic effect in the salivary gland of an invertebrate species, *Helix pomatia*. *J. Mol. Neurosci.*; in press. IF: 2,965
- Hernádi, L., Pirger, Zs., Kiss, T., Németh, J., Márk, L., Kiss, P., Tamás, A., Lubics, A., Tóth, G., Shioda, S., Reglődi, D. (2008): The presence and distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC1-R) in the snail *Helix pomatia*. *Neuroscience*; 155(2):387-402. IF: 3,427
- Pirger, Zs., Rácz, B., Kiss, T. (2009): Mitochondrial-caspase dependent programmed cell death provides a physiological mechanism for mucus release from the snail salivary gland. *Biol. Cell*; in press. IF: 4,303

A disszertációhoz kapcsolódó konferencia előadások, poszterek

- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T. (2003): Morphological changes accompanying the saliva production in the salivary gland of the snail, *Helix pomatia*. 10th Symp. Invertebr. Neurobiol. (ISIN), Tihany (abstract).
- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T. (2004): Aminergic and peptidergic regulation of the snail salivary gland: electrophysiology and immunocytochemistry. IBRO-MITT Internat. Workshop, Budapest. *Clinical Neurosci., Ideggyógyászati Szemle*, 57:75, 1. különszám.
- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T. (2004): Aminergic and peptidergic regulation of the snail gland: electrophysiology and immunocytochemistry. IV. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, 2004, Budapest (abstract).
- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T. (2004): Aminergic and peptidergic regulation of the snail gland: electrophysiology and immunocytochemistry. 4th Forum Europ. Neurosci. (FENS), Lisbon, Portugal, abstract no. A-082.
- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T. (2005): Electrical properties and voltage-gated ion-channels of the snail, *Helix pomatia*, salivary gland cells. A Magyar Biofizikai Társaság XXII. Kongresszusa, Debrecen (abstract)
- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T. (2005): Electrical properties and voltage-gated ion-channels of the salivary gland cells of the snail, *Helix pomatia*. 15th IUPAB and 5th EBSA Internat. Biophysics Congress, France, Montpellier. *Eur. Biophys. J.* 34:651, number 6., abstract no. P-276.
- Pirger, Zs., Kiss, T. (2006): Nyálfelszabadulás apoptózissal az éti csiga nyálmirigysejtjeiből. V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, abstract no. A-0020.
- Pirger, Zs., Kiss, T., Németh, J., Hernádi, L., Reglődi, D. (2007): The presence and distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC-R) in the snail; *oral presentation*. 11th Symposium on Invertebrate Neurobiology (ISIN), Tihany, Hungary
- Pirger, Zs., Reglodi D, Hernadi L, Nemeth J, Toth G, Kiss P, Lubics A, Kiss T. (2007): PACAP has antiapoptotic effect in the salivary gland of a molluscan species, *Helix pomatia*. 8th Symposium on VIP, PACAP, and Related Peptides, Manchester and Burlington, Vermont, USA; *J. Mol. Neurosci.* 33: 333.

Egyéb közlemények

- Pirger, Zs., László, Z., Kiss, T. (2006): G-protein coupled receptor kinase-like immunoreactivity in the snail, *Helix pomatia*, neurons. **Brain Res.**; 1122(1):10-7. IF: 2,341
- Nikitin, ES., Vavoulis, DV., Kemenes, I., Marra, V., Pirger, Zs., Michel, M., Feng, J., O'Shea M, Benjamin PR, Kemenes, G. (2008): Persistent sodium current is a nonsynaptic substrate for long-term associative memory. **Curr. Biol.**; 18(16):1221-1226. IF:10,539

Könyvfejezet

- Kiss, T., Pirger, Zs., (2006): Neuropeptides as modulators and hormones in terrestrial snails: Their occurrence, distribution and physiological significance. – part 4. **Transworld Research Network**, (ISBN: 81-7895-224-6), Invertebrate neuropeptides and hormones: Basic knowledge and recent advances; Editor: Honoo Satake, Kerala, India

Egyéb konferencia előadások, poszterek

- Pirger, Zs., Szappanos, H., Gönci, M. (2003): Purinerg signaling mechanisms in cultured mouse skeletal muscle cells. 9th Conference of the Hung. Neurosci. Soc., Balatonfüred; **Clinical Neurosci., Ideggyógyászati Szemle**, 56:71, 2. különszám.
- Pirger, Zs., László, Z., Kiss, T. (2005): Occurrence and the role of G-protein coupled receptor kinase in the desensitization of mytilus-inhibitory peptide receptors in *Helix pomatia*. 11st. MITT kongresszus, Pécs; **Clinical Neurosci., Ideggyógyászati Szemle**, 58:77, 1. különszám.
- Pirger, Zs., László, Z. and Kiss, T. (2006): G-protein coupled receptor kinase-like immunoreactivity in the snail, *Helix pomatia*. 5th Forum of European Neuroscience (FENS), Vienna, Austria, abstract no. A-048.20.
- Pirger, Zs., Juhász-Vedres, G., Kiss, T. (2007): Distribution and localization of different sodium channel subtypes in snail; *poster presentation*. 11th Symposium on Invertebrate Neurobiology (ISIN), Tihany, Hungary
- Kiss, T., Pirger, Zs., Kemenes, G., (2007): Food-aversive conditioning increases persistent Na-current in withdrawal interneurons; *poster presentation*. 11th Symposium on Invertebrate Neurobiology (ISIN), Tihany, Hungary
- Hiripi, L., Pirger, Zs., Kiss, T., Elekes, K. (2007): Protein phosphorylation in the heart and foot of *Helix pomatia* during active state; *oral presentation*. 11th Symposium on Invertebrate Neurobiology (ISIN), Tihany, Hungary
- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T., Hiripi, L. (2007): Activity state of *Helix pomatia* is regulated by a serotonin-receptor coupled to adenylyl-cyclase; *poster presentation*. Society for Neuroscience, San Diego, California, USA
- Kiss, T., Pirger, Zs. (2008): A perzisztens Na-csatornák és szerepük az elemi tanulásban; előadás. 38. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, Magyarország
- Reglodi, D., Pirger, Zs., Mark, L., Nemeth, J., Hiripi, L., Kiss, P., Lubics, A., Tamas, A., Kiss, T. (2008): Activity-dependent changes in the protein composition of *Helix pomatia* with special reference to pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide; 24. Conference of European Comparative Endocrinologists (CECE), Genoa, Italy