

**A PACAP ANTI-APOPTOTIKUS HATÁSA OXIDATÍV STRESSZ
INDUKÁLTA SZÍVIZOMSEJT, ENDOTHELSEJT
KÁROSODÁSBAN ÉS GLUTAMÁT INDUKÁLTA RETINÁLIS
DEGENERÁCIÓBAN.**

PhD értekezés tézisei

Rácz Boglárka

Klinikai doktori iskola vezető: Prof. Dr. Nagy Judit

Programvezető: Prof. Dr. Róth Erzsébet

Témavezetők: Prof. Dr. Róth Erzsébet, Dr. Reglódi Dóra

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Sebészeti Oktató és
Kutató Intézet**

Pécs

2007

I. BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedek fontos kutatási területévé vált az apoptózis mechanizmusának tanulmányozása. A természetes sejthalál eme folyamatát egy görög hasonlaltal jellemezték, mint "ahogyan a levelek hullanak le a fáról". Az apoptózis fontos szerepet játszik a soksejtű élőlények fejlődésében és öregedésében, de ezeken kívül számos élettani működés szabályozásában is részt vesz. A soksejtű szervezeteknek szükségük van arra, hogy megszabaduljanak az életműködésük szempontjából feleslegben lévő, valamint az életfolyamatokat akadályozó vagy az azokra veszélyes sejtektől.

Az emberi szervezetben megközelítőleg 50-70 billió sejt pusztul el naponta, ám a szervezet igyekszik a sejtek osztódása és az elhalt sejtek száma közti egyensúlyt fenntartani. Az egyensúly azonban felborulhat, ami súlyos következményekhez vezethet. Abban az esetben, ha a sejtek gyorsabban szaporodnak, mint ahogy elpusztulnak a kóros sejtburjánzás, daganat és autoimmun betegség kialakulását eredményezheti. Amennyiben a sejtek lassabban osztódnak, mint ahogyan pusztulnak, súlyos sejtvesztéssel járó betegségek, mint például neurodegeneratív kórképek alakulhatnak ki.

Az apoptózis során számos jelátviteli út aktiválódhat, melyek közül munkám során a mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) család tagjait [extracelluláris szignál-regulálta kináz (ERK), p38MAPK (p38), c-Jun N-terminál kináz (JNK)], valamint a cAMP-reszponzív elemkötő proteint (CREB); a Bcl-2-t; a foszfo-Bad-et; az apoptózis indukáló faktort (AIF); a citokróm c-t és a kaszpáz-3 jelátvitelét vizsgáltam.

Ezen jelátviteli utak vizsgálata segítséget nyújt abban, hogy jobban megismerhessük a fent említett betegségek etiológiáját és pathomechanizmusát, amelyek pontos ismerete elengedhetetlen az újabb terápiás lehetőségek kidolgozásához. Kutatócsoportunk célja a hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) vizsgálata, mely neurotrofikus és neuroprotektív hatása már számos kísérletben bizonyítást nyert. Értekezésem a PACAP antiapoptotikus hatásának molekuláris biológiai hátterét foglalja össze oxidatív stressz indukálta szívizomsejt, endothelsejt valamint glutamát indukálta retinális sejtkárosodások esetén.

II. HYPOPHYSIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP)

A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet 1989-ben izolálták birka hypothalamusból a hypophysisben kifejtett adenilát-cikláz aktiváló hatása segítségével. A szervezetben két, biológiailag aktív formában fordul elő, a 38 aminosavból álló PACAP1-38, amely a szervezetben található PACAP mennyiségnek mintegy 90%-át teszi ki, valamint a 27 aminosavból álló PACAP1-27. A PACAP tagja a szekretin/glukagon/vazoaktív intestinalis polipeptid (VIP) peptidcsaládnak. Szerkezete 67%-ban megegyezik a VIP struktúrájával, de adenilát-cikláz aktiváló hatása 1000-10000-szer nagyobb a VIP hatásánál.

A peptid szekvenciája azonos birkában, patkányban és emberben. A 38 aminosavból álló primer molekula megtalálható az alacsonyabb rendű gerinces és előgerinchúros állatokban is, ahol a struktúra csak 1-4 aminosavban térnek el az emberben található PACAP-tól. Ez azt bizonyítja, hogy a filogenetikai fejlődés során szinte változatlanul konzerválódott molekula alapvető élettani funkcióval rendelkezik.

A PACAP hatását a szervezetben specifikus receptorok közvetítik. A receptorok hét transzmembrán kart és egy intracellulárisan G-proteint kötő domént tartalmaz, mely a VIP receptor családba tartozik. A nyolc altípussal rendelkező PAC1 receptorok két-három nagyságrenddel nagyobb affinitást mutatnak a PACAP-hoz, mint a VIP-hez, míg a VPAC1 és VPAC2 receptorok a PACAP-ot és a VIP-t egyforma erősséggel kötik. A PAC1 a Gs-proteinen keresztül GTP-dependens adenilát-ciklázot aktivál, ezen keresztül növeli az intracelluláris cAMP-szintet, ami a protein kináz A (PKA) aktiválásával képes beindítani a mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) útvonalat.

Megjelenését és funkcióját tekintve, az ún. „brain-gut peptidek” közé sorolható, ami azt jelenti, hogy megtalálhatók a központi és perifériás idegrendszer mellett más szövetekben is, többek között az endokrin mirigyekben és gastrointestinalis tractus teljes hosszában.

A PACAP felfedezése óta széleskörben vizsgálják a centrális és perifériás idegrendszerre kifejtett hatásait, és számos kísérletben bebizonyították már neurotrofikus és neuroprotektív képességét. *In vitro*, stimulálja a neuronok növekedését, elősegíti túlélésüket, antiapoptotikus hatással rendelkezik, védi a neuronokat a különböző neurotoxikus hatásokkal szemben, segíti a neuronok differenciálódását és proliferációját a fejlődés közben, és segíti más trofikus faktorok expresszióját és hatását.

In vivo, PACAP védi a hippocampus CA1 sejtjeit globális ischaemiában és a cholierg neuronokat a fornix átmetszése után. A PACAP patkányban csökkenti a károsodott agyterület nagyságát, és javítja a neurológiai jeleket fokális cerebrális ischaemiát követően. Nemrégiben bebizonyították, hogy a PACAP neuroprotektív egér modellben létrehozott tranziens fokális ischaemiában, és más neuronális károsodások esetén, mint például gerincvelő és nervus facialis sérülése esetén patkány modellben és nervus opticus axotómiát követően is. A különböző neuropatológiás elváltozásokat követő PACAP upregulációból arra következtethetünk, hogy fontos szerepe lehet a posttraumás regenerációs folyamatokban. Munkacsoportunk mutatta ki a PACAP neuroprotektív hatását Parkinson-kór modellben, Huntington-chorea modellben valamint glutamát indukálta retinális degenerációban.

III. CÉLKITŰZÉS

A PACAP neuroprotektív hatásának molekuláris háttere még nem pontosan ismert, ezért munkám során célul tűztem ki a PACAP hatásmechanizmusának feltérképezését oxidatív stressz indukálta szívizomsejt és endothelsejt károsodásban *in vitro*, valamint glutamát indukálta retinális degenerációban *in vivo*.

1. Az jól ismert, hogy mind a PACAP, mind a PACAP receptorok jelen vannak a szívizomban, azonban szívizomkárosodás esetén kifejtett esetleges protektív hatását még nem vizsgálták. Ezért első kísérletemben a PACAP lehetséges hatásmechanizmusát vizsgáltam oxidatív stressz indukálta szívizomsejt károsodásban.

2. A vazoaktív intestinalis peptid (VIP), mely nagyfokú homológiát mutat a PACAP-pal, protektív hatással bír humán cornea endothelsejtekben. Azonban a PACAP endothelsejtekre kifejtett protektív hatásával kapcsolatban nem áll rendelkezésünkre irodalmi adat. Ezért kísérletem második szakaszában az oxidatív stressz indukálta endothelsejt károsodásban vizsgáltam a PACAP hatását.

3. Munkacsoportunk korábban kimutatta a PACAP neuroprotektív hatását glutamát indukálta retina degenerációban, *in vivo*, azonban pontos hatásmechanizmusát

még nem ismerjük, ezért kísérleteim harmadik szakaszában ennek feltérképezése volt a céloim.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A PACAP hatásának vizsgálata oxidatív stressz indukálta szívizomsejt és endothelsejt károsodásban, *in vivo* tanulmányok

Sejtkultúrák

A primér szívizomsejt-kultúrát újszülött patkányok szívéből nyertem, kollagenázos emésztést követően. A sejteket DMEM/F12 médiumban tenyésztettem.

Az EOMA CRL-2586 egér hemangioendotheliomából nyert sejtvonal (ATCC). Az EOMA sejtek tenyésztése az ATCC ajánlások figyelembevételével történt.

Sejt életképességének vizsgálata

A szívizom és az endothelsejtek életképességének vizsgálatához kolorimetrikus MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) tesztet használtam. A sejteket egy 96-lyukú tenyésztő edényben tartottam. A sejteket hat különböző csoportra osztottam: 1.) kontroll csoport; 2.) 20nM PACAP-pal kezelt csoport; 3.) 250nM PACAP receptor antagonistával kezelt csoport (PACAP6-38); 4.) 1/0,5mM H₂O₂-dal kezelt csoport; 5.) 1/0,5mM H₂O₂-dal és 20nM PACAP-pal kezelt csoport; 6.) 1/0,5mM H₂O₂-dal és 20nM PACAP-pal, valamint 250nM PACAP6-38-cal kezelt csoport. A kezelést követően a médiumokat lecseréltem egy 0,5%-os MTT tartalmú médiumra, melyben 3 óráig tartottuk a sejteket. Ezt követően egy SIRIO ELISA leolvasóval 570 nm hullámhosszon megmértem a képződött kék formazán festék mennyiségét, amely arányos volt az élő sejtek számával. Minden kísérletet 3-szor ismételttem.

Élő/halott teszt

Az EOMA sejtek életképességét további élő/halott teszt segítségével határoztam meg. A sejteket megfelelő pufferben inkubáltam 45 percen keresztül. A puffer calcein-AM-t (5 µl/10ml PBS) és ethidium homodimer-1-t (20 µl/10ml PBS) tartalmazott. Az ethidium homodimer-1 egy nagy affinitású, piros fluoreszcens nukleinsav festék, amely csak a halott sejtek sérült membránján képes átjutni, és a magban dúsul. A calcein-AM egy membrán fluoreszcens festék, amely az élő sejtek észteráz aktivitása következtében a

membránon áthatolni nem képes zöld-fluoreszcens terméké alakul, ezáltal az épp membránnal rendelkező sejtek citoplazmájában dúsul.

Annexin V és propidium jodid festés

Az apoptózis számos morfológiai változással jellemezhető, melyek közül legkorábban a plazmamembrán változás észlelhető. Az apoptotikus sejtek membránjában a foszfolipid-foszfátidilszerin a belső felszínről a külső felszínre transzlokálódik. Az Annexin-V igen magas affinitást mutat a foszfolipid-foszfátidilszerinhez. A FITC-cel jelzett Annexin-V felhasználható az apoptotikus sejtek flow citometriás kimutatására. Az Annexin-V-t vitális propidium jodid festéssel együtt kombináltam és így az Annexin-V pozitív apoptotikus sejtek elkülöníthetővé váltak a propidium jodid negatív nekrotikus sejtektől. A mintákat BD FACS Calibur flow citométer segítségével vizsgáltam.

Az eredményeket Cellquest software segítségével analizáltam. A kvadráns dot plot segítségével meghatározható az élő, a nekrotikus (propidium jodid pozitív) a korai apoptotikus (Annexin-V pozitív), valamint a késői apoptotikus (Annexin-V és propidium jodid pozitív) sejtek százalékos aránya.

A MAP kinázok, foszfo-Bcl-2, foszfo-Bad és aktív kaszpáz-3 mérése áramlási flow citometriás módszerrel

A kezelést követően, a sejteket primer 1:1000 (ERK1/2), 1:50 (p38 MAPK), 1:50 (JNK1/2), 1:10 (caspase-3), 1:50 (Bcl-2) és 1:100 (Bad) antitesttel, majd FITC konjugált szekunder anti-egér, vagy anti-nyúl IgG antitesttel (1:50) jelöltem, majd ezt követően áramlási citométerrel mértem. Az eredményeket Cellquest software segítségével analizáltam.

PACAP hatásának vizsgálata glutamát indukálta retinális degenerációban, *in vivo* vizsgálatok

Állatok előkészítése

Az *in vivo* retina degenerációs modellhez újszülött Wistar patkányokat használtam. Az állatok elhelyezése, gondozása és felhasználása a Pécsi Tudományegyetem ellenőrzött protokollja (No: BA02/2000-31/2001) szerint az intézeti ajánlások figyelembevételével történt.

Állatok kezelése

Az újszülött patkányokat hat csoportra osztottam és a postnatalis 1, 3 és 5. napon a következő kezelésekben részesültek:

1. kontoll csoport unilaterális, intravitreális fiziológiás sóoldat
2. csoport unilaterális, intravitreális 100pmol PACAP
3. csoport unilaterális, intravitreális 1nM PACAP6-38
4. csoport 4mg/ttg szubkután MSG, valamint unilaterális, intravitreális 100pmol PACAP
5. csoport 4mg/ttg szubkután MSG, valamint unilaterális, intravitreális 100pmol PACAP és 1nM PACAP6-38.

A postnatalis 1., 3. és 5. napon a kezeléseket mintavétel követte a 12. valamint 24. órában. A mintákat Western blot analízissel vizsgáltam.

Western blot analízis

A sejteket jéghideg Tris pufferben (50mM, pH: 8.0) homogenizáltam, amely 0.5mM sodium-metavanadátot, 1mM EDTA-t és proteázgátlót (1:1000) tartalmazott.

Az azonos mennyiségű fehérjéket 12%-os poliakrilamid gélben futattam. A blottolást követően, a nitrocellulóz membránt 3%-os zsírmentes tejben a következő antitesteket tartalmazó oldatban egy éjszakán át 4°C-on inkubáltam: foszfo-Bad (Ser 136) (1:1000), foszfo-SAPK/JNK (1:2000), foszfo-ERK (1:2000), foszfo-CREB (1:1000), JNK1/2 (1:1000), kaszpáz 3 (1:1000), Bad (Ser 136) (1:1000), aktív kaszpáz-3 (1:1000), citokróm c (1:1000) és AIF (1:1000). A második antitest peroxidáz-konjugált anti-nyúl, valamint anti-egér IgG volt, a vizualizálást ECL Western blot meghatározó rendszer chemiluminescent substrate használatával végeztem el. Az előhívott filmeket NIH's Image J szoftver segítségével értékeltem. Minden kísérletet legalább három alkalommal végeztem el.

Statisztika

In vitro eredményeinket átlag \pm S.E.M. formában adtam meg és ANOVA teszttel hasonlítottam össze, melyet Neuman-Keul's *post hoc* analízis követett.

Az *in vivo* eredményeinket átlag \pm S.D. formában adtam meg. A csoportok közti különbözőségeket ANOVA teszttel hasonlítottam össze, melyet variancia analízis és

Student's *t* teszt követett. A $P < 0.05$ eredmények esetén az eltérést szignifikánsnak tekintettem.

V. A PACAP VÉDŐ HATÁSA, OXIDATÍV STRESSZ INDUKÁLTA SZÍVIZOMSEJT KÁROSODÁSBAN

Eredmények

1. A sejtek életképességének vizsgálata során MTT teszttel kimutattam, hogy a H_2O_2 kezelés szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét a kontroll csoporthoz viszonyítva ($58.2 \pm 11.0\%$). A PACAP és PACAP6-38 kezelések önmagukban nem okoztak eltérést a kontroll csoporthoz képest. Azonban, amikor a H_2O_2 kezelésben részesített sejteket együtt inkubáltam PACAP-pal, akkor a sejtek életképessége szignifikánsan növekedett a H_2O_2 -kezelt csoporthoz viszonyítva ($85.8 \pm 15.8\%$). Amennyiben a H_2O_2 kezeléskor együtt inkubáltam a sejteket PACAP-pal és PACAP6-38-cal, abban az esetben a PACAP receptor antagonistája képes volt elnyomni a PACAP protektív hatását ($56.1 \pm 11.9\%$).

2. Az áramlási flow citométerrel kapott eredményeimben, a kontroll csoportban az élő sejtek százalékos aránya $90.5 \pm 1.3\%$ volt, míg a korai apoptotikus sejtek $5.4 \pm 1.6\%$ -ban fordultak elő. A H_2O_2 -kezelt csoportban az apoptotikus sejtek száma nőtt ($21.6 \pm 3.8\%$), míg az élő sejtek száma szignifikánsan csökkent ($76.7 \pm 3.6\%$). PACAP és PACAP6-38 kezelés önmagában nem okozott eltérést a kontroll sejtcsoporthoz képest. A H_2O_2 kezeléssel egyidőben történt PACAP kezelés szignifikánsan emelte az élő sejtek ($91.1 \pm 0.9\%$) és csökkentette az apoptotikus sejtek számát ($6.7 \pm 1.7\%$). A PACAP védő hatását a PACAP6-38 megakadályozta (élő sejtek: $81.8 \pm 1.2\%$, apoptotikus sejtek: $14.1 \pm 1.8\%$).

3. A lehetséges pro- és antiapoptotikus jelátviteli útvonalakat, aktív kaszpáz-3, foszfo-Bcl-2 és foszfo-Bad antitestekkel vizsgáltam, melyhez szintén áramlási flow citométert használtam. A PACAP és PACAP6-38 kezelés önmagában nem idézett elő változást a kérdéses jelátviteli útvonalakban. A H_2O_2 kezelés hatására az aktív kaszpáz-3 szintje szignifikánsan megemelkedett, míg a Bcl-2 és a Bad fehérjék foszforilációs szintje lecsökkent. A PACAP képes volt az aktív kaszpáz értékét a kontroll csoporthoz hasonló szintre visszaszorítani, míg a Bcl-2 és a Bad foszforilációs szintjét a kontroll

értékhez hasonló szintre emelni. A PACAP receptor antagonistá minden esetben képes volt elnyomni a PACAP védő hatását, és a vizsgált fehérjék szintje, a H₂O₂-kezelt csoporthoz hasonló értékeket mutatott.

VI. A PACAP VÉDŐ HATÁSA AZ OXIDATÍV STRESSZ INDUKÁLTA ENDOTHELSEJT KÁROSODÁSBAN

Eredmények

1. A sejtek életképességének vizsgálata során MTT teszttel kimutattam, hogy a H₂O₂ kezelést követően szignifikánsan lecsökkent az életképes sejtek száma a kontroll csoporthoz képest (51.8±12.3%). Önmagában a PACAP és PACAP6-38 kezelés nem okozott változást a sejtek életképességében. Abban a csoportban, ahol H₂O₂-dal egyidőben PACAP kezelést is alkalmaztam, szignifikánsan növekedett az életképes sejtek száma (84.5±13.6%). A PACAP6-38 kezelésben is részesült csoportban a PACAP antagonistá képes volt elnyomni a PACAP védő hatását.

2. A PACAP protektív hatását egy további kvalitatív élő/halott teszttel is bizonyítottam. A H₂O₂ kezelés hatására a halott sejtek száma növekedett, amit a PACAP képes volt kivédeni. A PACAP receptor antagonistá segítségével a PACAP protektív hatása blokkolható volt.

3. Az áramlási flow citométerrel kapott eredményeimben, a H₂O₂-kezelt csoportban az élő sejtek száma szignifikánsan csökkent, míg a késői apoptotikus sejtek száma nőtt (24.9±4.2%), a kontroll értékekhez viszonyítva. A PACAP és PACAP6-38 kezelés önmagában nem okozott eltérést a kontroll sejtcsoporthoz képest. A H₂O₂ kezeléssel egyidőben történt PACAP kezelés szignifikánsan emelte az élő sejtek (70.6±1.2%) és csökkentette az apoptotikus sejtek számát (7.4±2.2%). A PACAP védő hatását a PACAP6-38 képes volt megakadályozni.

4. Áramlási flow citométerrel a MAP kinázok foszforilációs szintjét is vizsgáltam oxidatív stresszel szemben. Az EOMA sejteket H₂O₂ tartalmú médiumban 10, 30 és 60 percig inkubáltam. A MAP kinázok -ERK1/2, p38MAPK, JNK1/2-aktivációja a 30. percben érte el csúcspontját. Az ERK foszforilációs szintje lecsökkent, míg a p38MAPK és a JNK szintje megemelkedett oxidatív stressz hatására. Sem a

PACAP, sem a PACAP6-38 önmagában nem okozott szignifikáns eltérést a vizsgált fehérjék aktivációjában. Azonban H₂O₂ kezelés mellett a PACAP szignifikánsan emelte az ERK és csökkentette a p38MAPK valamint a JNK foszforilációs szintjét. A PACAP receptor antagonistá csökkentette a PACAP hatását a vizsgált fehérjék esetében.

VII. A PACAP NEUROPROTEKTÍV HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA GLUTAMÁT INDUKÁLTA RETINÁLIS DEGENERÁCIÓBAN

Eredmények

Ebben a kísérletben elsőként az ERK1/2 és a CREB foszforilációs szintjének változását vizsgáltam. Mindkét fehérje foszforilációs szintje szignifikánsan megemelkedett PACAP kezelés hatására az első és második kezelés 12. órájában, azonban a harmadik kezelést követően nem volt további emelkedés egyik fehérje aktivációs szintjében sem. Ebből arra következtettem, hogy a PACAP már az első két kezelést követően eléri hosszantartó protektív hatását. Ezt hisztológiai vizsgálatok is alátámasztották, melyből kiderült, hogy már egyszeres PACAP kezelés is elegendő a protektív hatás eléréséhez és az ezt követő kezeléseket további változást nem idéztek elő, ezért a későbbiekben elhagytam a harmadik kezelést.

Az MSG kezelés megemelte a foszfo-JNK szintjét, amelyet a PACAP kezelés szignifikánsan csökkentett az első kezelés 24. órájában. A PACAP6-38, valamennyi esetben gátolta a PACAP hatását.

A Bad foszforilációs szintjében, mely egyben ennek a fehérjének az inaktivációját is jelenti a PACAP kezelés önmagában nem játszott szerepet. Az MSG kezelést követően a Bad foszforilációja szignifikánsan csökkent és ezt a csökkenést a PACAP képes volt gátolni. A PACAP6-38 kezelés hatására a PACAP protektív hatása elmarad és a foszfo-Bad szintje az MSG-kezelt retinához hasonló értékeket mutatott.

Az AIF kiáramlása a mitokondriumból a citoszólba, kaszpáz független jelátviteli úton megy végbe. Érdekes, hogy amennyiben csak PACAP kezelésben részesítettük a sejteket, kevesebb AIF transzlókálódott a citoszólba, mint a kontroll csoportban. A MSG kezelést követően megemelkedett az AIF citoszólban mért mennyisége, azonban a PACAP kezeléssel ez a mennyiség a kontrollhoz közeli értéket mutatott. PACAP6-38-cal a PACAP nem volt képes kifejteni védő hatását.

A citokróm c kiáramlása a mitokondriumból, a kaszpáz függő apoptózis egyik korai eseménye. Amennyiben csak PACAP kezelésben részesültek a sejtek, a citokróm c mitokondriumban mért szintje kevesebb volt, míg a csak PACAP6-38-cal kezelt csoportban mért szint magasabb volt, mint a kontroll csoportban. Az MSG kezelés szignifikánsan megemelte a kiáramlott citokróm c mennyiségét, a PACAP kezelés hatására a citoszólban mért citokróm szintje szignifikánsan csökkent. Ebben az esetben is a PACAP6-38 elnyomta a PACAP hatását.

Az aktív kaszpáz 3 szintje a kaszpáz aktiváció egyik legjobb indikátora. A PACAP kezelés önmagában nem okozott változást a szintjében. Az MSG kezelés szignifikánsan megemelte a kaszpáz 3 szintjét az első kezelést követően. A PACAP kezelés képes volt meggátolni az MSG indukálta kaszpáz 3 aktivációt, amit pedig a PACAP6-38 kezelés blokkolt.

VIII. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A PACAP kezelés szignifikánsan csökkentette az oxidatív stressz indukálta apoptózist a szívmusclejtekben. Csökkentette a kaszpáz 3 aktivációt és emelte a Bcl-2 és a foszfo-Bad szintjét. Kimutattam, hogy a PACAP már jólismert antiapoptotikus hatása nem csak neuronális sejtvonalakban, hanem szívmusclejtekben is megfigyelhető (Fig.1).

2. A PACAP antiapoptotikus hatását az endothelsejtekben is kimutattam, mivel növelte az endothelsejtek életképességét oxidatív stresszel szemben, amely hatását a MAP kináz útvonalakon keresztül érte el (Fig.1).

3. A MSG indukálta retinális degeneráció csökkentette az antiapoptotikus fehérjét, valamint növelte a proapoptotikus fehérék szintjét. A lokális PACAP kezelés képes volt elnyomni az MSG kezelés degeneratív hatásait: a PACAP növelte az antiapoptotikus foszfo-ERK, foszfo-CREB, foszfo-Bad szintjét, és csökkentette a proapoptotikus jelátviteli molekulák, a JNK, AIF, citokróm c és kaszpáz 3 aktivációs szintjét a retinában (Fig.1).

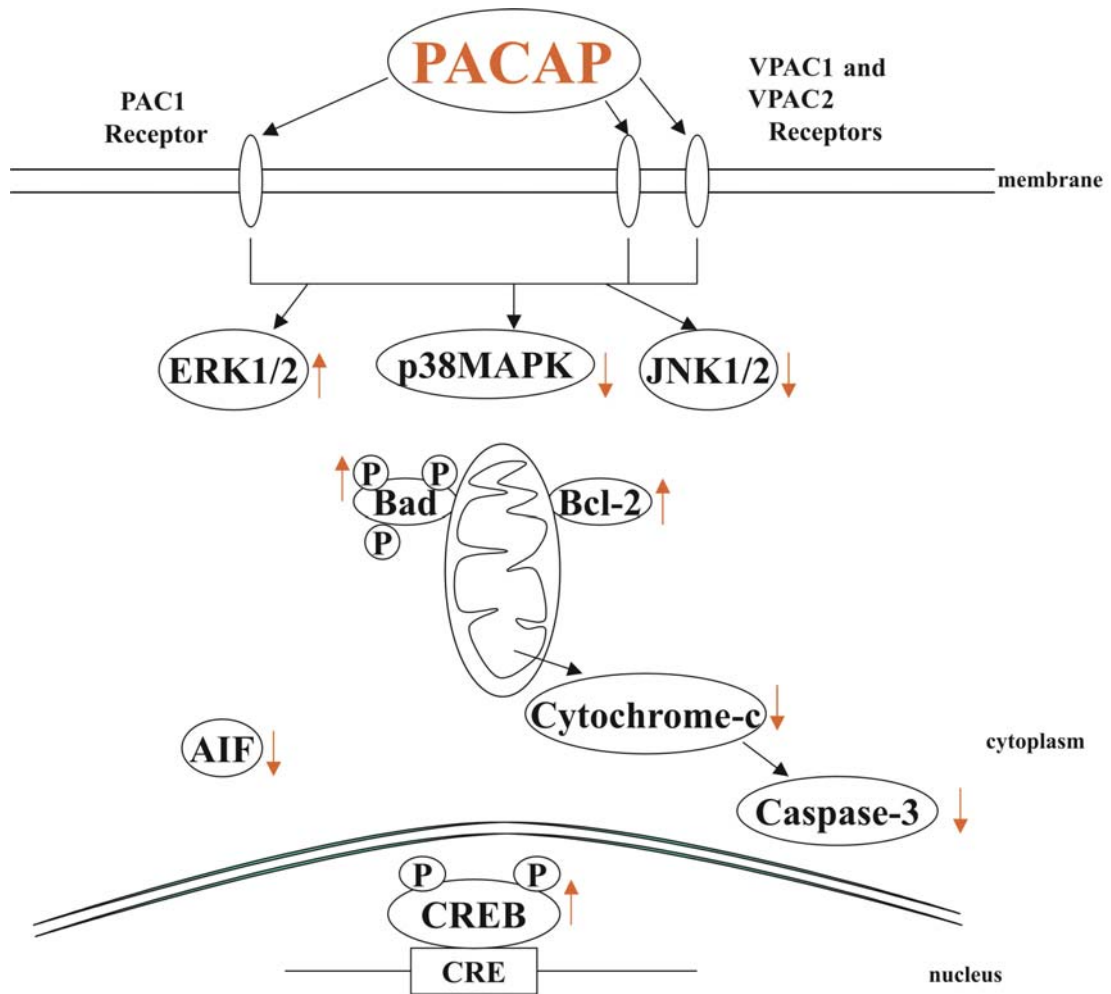


Fig.1. Sematikus ábra a PACAP jelátviteli útvonaláról. A PACAP hatása a vizsgált jelátviteli utakon keresztül a szívizomsejtekben, endothelsejtekben és a retinában. A nyilak a vizsgált fehérjék csökkent, vagy növekedett szintjét mutatják.

IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni a Sebészeti Oktató és Kutató Intézet, az Anatómia Intézet, a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet valamennyi dolgozójának a kedvességét és segítőkészségét.

Külön szeretnék köszönetet mondani a programvezetőmnek, Dr. Róth Erzsébet professzorasszonynak és Dr. Borsiczky Baláznak, valamint Dr. Gasz Baláznak, hogy támogatták és segítették tudományos munkámat.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani konzultánsomnak, Dr. Reglődi Dórának, hogy támogatta a tudományos tevékenységemet.

További köszönetet szeretnék mondani Ifj. Dr. Gallyas Ferencnek a munkánk során nyújtott segítségért.

Végül, de nem utolsó sorban ezúton mondok köszönetet a családomnak, akik mindvégig segítettek és támogattak, ami nélkül ez a munka nem születhetett volna meg.

X. ELŐADÁSOK ÉS PUBLIKÁCIÓK

A dolgozathoz kapcsolódó publikációk

1. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Gallyas F Jr, Róth E, Reglődi. Involvement of ERK and CREB signalling pathways in the protective effect of PACAP on monosodium glutamate-induced retinal lesion. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2006. 1070: 507-511. IF: 1,93.
2. **Rácz B**, Gallyas F Jr, Kiss P, Tóth G, Hegyi O, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Róth E, Tamás A, Lengvári I, Lubics A, Reglődi D. The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involves inhibition of proapoptotic signaling pathways. *Regul. Pept.* 2006. 137: 20-26. IF: 2,442.
3. **Rácz B**, Reglődi D, Kiss P, Babai N, Atlasz T, Gábrriel R, Lubics A, Gallyas F Jr, Gasz B, Tóth G, Róth E, Hegyi O, Lengvári I, Tamás A. In vivo neuroprotection by PACAP in excitotoxic retinal injury: review of effects on retinal morphology and apoptotic signal transduction. *Int. J. Neuroprot. Neuroregen.* 2006. 2: 80-85.
4. **Rácz B**, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Tamás A, Józsa R, Lubics A, Kiss P, Róth E, Ferencz A, Tóth G, Hegyi O, Wittmann I, Lengvári I, Somogyvári-Vigh A, Reglődi D. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2007. 153:115-123 . IF: 2,487.
5. Tamás A, Gábrriel R, **Rácz B**, Dénes V, Kiss P, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium-glutemate. *Neurosci. Lett.* 2004. 372: 110-113. IF: 2,019.
6. Gasz B, **Rácz B**, Róth E, Borsiczky B, Ferencz A, Tamás A, Cserepes B, Lubics A, Gallyas F Jr, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides* 2006. 27: 87-94. IF: 2,701.
7. Gasz B, **Rácz B**, Róth E, Borsiczky B, Tamás A, Boronkai Á, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. PACAP inhibits oxidative stress-induced activation of MAP kinase dependent apoptotic pathway in cultured cardiomyocytes. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2005. 1070: 293-297. IF: 1,93.
8. Kiss P, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Szalai M, Hauser D, Horváth Zs, **Rácz B**, Gábrriel R, Babai N, Tóth G, Reglődi D. Effects of systemic PACAP treatment in monosodium glutamate-induced behavioral changes and retinal degeneration. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2006. 1070: 365-370. IF: 1,93.

Egyéb publikációk

1. **Rácz B**, Reglódi D, Fodor B, Gasz B, Lubics A, Gallyas F Jr, , Róth E, Borsiczky B. Hyperosmotic stress-induced apoptotic signaling pathways in chondrocytes. *BONE* 2007. 40: 1536-1543. IF: 3,829.
2. **Rácz B**, Gasz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tamás A, Szántó Z, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Hegyi O, Róth E, Reglódi, D. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regul. Pept.* 2007; (in press). IF: 2,442
3. **Rácz B**, Gasz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Róth E, Tóth G, Hegyi O, Verzár Z, Fabricsek C, Reglódi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the PKA-Bad-14-3-3 signaling pathways in glutamate-induced retinal injury in neonatal rats. *Neurotox. Res.* 2007; (in press). IF: 2
4. Ferencz A, **Rácz B**, Gasz B, Benkő L, Jancsó G, Kürthy M, Róth E. Intestinal ischemic preconditioning in rats and NF-kappaB activation. *Microsurgery* 2006. 26: 54-57. IF: 0,711
5. Gasz B , Lénard L, **Rácz B** , Benkő L, Borsiczky B, Cserepes B, Gál J, Jancsó G, Lantos J, Ghosh S, Szabados S, Papp L, Alotti N, Róth E. Effect of cardiopulmonary bypass on cytokine network and myocardial cytokine production. *Clin. Cardiol.* 2006. 29: 311-315. IF: 0,989.
6. Borsiczky B, Fodor B, **Rácz B**, Gasz B, Sára J, Róth E. Rapid leukocyte activation following intraarticular bleeding. *J. Ortop. Res.* 2006. 24: 684-689. IF: 2,784.
7. Ferencz A, **Rácz B**, Gasz B, Kalmár-Nagy K, Horváth ÖP, Róth E. Threshold level of NF-kB activation in small bowel ischemic preconditioning procedure. *Transplant. Proceed.* 2006. 38: 1800-1802. IF: 0,962.
8. Ferencz A, **Rácz B**, Cserepes B, Róth E. A korai és késői ischémiás prekondicionálás hatása az oxidatív stresszre vékonybél autotranszplantációs modellben. *Magy Seb* 2005; 58: 245-249.
9. Cserepes B, Jancsó G, Gasz B, **Rácz B**, Ferencz A, Benkő L, Borsiczky B, Kürty M, Ferencz S, Lantos J, Gál J, Arató E, Miseta A, Wéber Gy, Róth E. Cardioprotective action of urocortin in early pre- and postconditioning. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2007. 1095: 228-239. IF: 1,93.

10. Jancsó G, Cserepes B, Gasz B, Benkő L, Borsiczky B, Ferencz A, Kürty M, **Rácz B**, Lantos J, Gál J, Arató E, Sinay L, Wéber Gy, Róth E. Expression and protective role of heme oxygenase-1 in delayed myocardial preconditioning. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2007. 1095: 251-261. IF: 1,93.
11. Kiss P, Hauser D, Tamás A, Lubics A, **Rácz B**, Horváth Z, Farkas J, Zimmermann F, Stepien A, Lengvari I, Reglődi D. Changes in open-field activity and novelty-seeking behavior in periadolescent rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Neurotox. Res.* 2007; (in press). IF: 2

Absztraktok

1. **Rácz B**, Gasz B, Fodor B, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Osmotic stress induced signal transduction pathways in chondrocytes during acute haemarthrosis- an in vitro study. *Eur. Surg. Res.* 2005; 37: 61.
2. **Rácz B**, Gasz B, Tamás A, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Activation of signal transduction pathways in chondrocytes during hyperosmotic conditions. *J. of FEBS.* 2005. X: 312.
3. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Sümegi B, Róth E, Reglődi D. Possible signalling pathways involved in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion. *Regul. Pept.* 2005. 130: 174.
4. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Sümegi B, Róth E, Reglődi D. Possible signalling pathways involved in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion. *Regul. Pept.* 2005. 130: 187.
5. **Rácz B**, Gasz B, Cserepes B, Ferencz A, Fodor B, Dávid Sz, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Ozmotikus stressz indukálta jelátviteli útvonalak vizsgálata chondrocytákon. *Magy. Seb.* 2005. 58: 270.
6. **Rácz B**, Tamás A, Dénes V, Kiss P, Lengvári I, Gábel R, Reglődi D. PACAP attenuates the monosodium-glutamate-induced retinal degeneration in the rat. *Clin. Neurosci/Idegy. Szml.* 2005. 58(S1): 78.
7. **Rácz B**, Reglődi D, Benkő L, Ferencz A, Cserepes B, Róth E, Borsiczky B. The effects of adenylate cyclase activating polypeptide and the possible signalling pathways involved in chondrocytes during hyperosmotic conditions. *Eur. Surg. Res.* 2006. 38: 60.

8. **Rácz B**, D Reglődi, B Fodor, Gasz B, L Benkő, A Ferencz, A Tamás, F Jr. Gallyas, Róth E, Borsiczky B. PACAP increases chondrocyte survival through acting on apoptosis signalling pathways.
J. of FEBS. 2006. 273:123.
9. Reglődi D, Tamás A, **Rácz B**, Dénes V, Kiss P, Lengvári I, Gábiel R. Pituitary adenylylate cyclase activating polypeptide protects against monosodium-glutamate toxicity in the rat retina.
Regul. Pept. 2004. 122: 36.
10. Gasz B, Jancsó G, Lantos J, **Rácz B**, Lénárd L, Szabados S, Papp L, Róth E. Oxidative stress and PARP activation in patients undergone coronary surgery.
Shock. 2005. 23: 52.
11. Gasz B, **Rácz B**, Lénárd L, Cserepes B, Jancsó G, Szabados S, Lantos J, Sümegi B, Alotti N, Papp L, Róth E. POLY (ADP-RIBOSE) Polymerase enzim aktivációjának összehasonlítása extrakorporális keringéssel, illetve off-pump technikával végzett koszorúsérműtétek állatkísérletes modelljében.
Cardiol. Hun. 2005. 35: A 40.
12. Gasz B, **Rácz B**, Lénárd L, Cserepes B, Jancsó G, Szabados S, Sümegi B, Alotti N, Papp L, Róth E. Off-pump technikával végzett koszorúsérműtétek csökkentik a poly (ADP-ribose) polymerase enzim aktivációját.
Magy. Seb. 2005. 58: 283.
13. Borsiczky B, **Rácz B**, Fodor B, Gasz B, Dávid Sz, Benkő L, Róth E. Intraarticularis citokin túlermelődés akut haemarthrosban.
Magy. Seb. 2005. 58: 258.
14. Ferencz A, **Rácz B**, Benkő L, Róth E. Rövid ciklusú ischémiás prekoncionálás hatása az NF-kB aktivációra bélsejtekben.
Magy. Seb. 2005. 58: 282.
15. Cserepes B, Jancsó G, Gasz B, **Rácz B**, Balatonyi B, Gaszner B, Róth E. Az urocortin a szívizomzat iszkémiás prekoncionálásában.
Magy. Seb. 2005. 58: 281.
16. Ferencz A, **Rácz B**, Gasz B, Benkő L, Róth E. Effects of brief ischemic preconditioning protocol to NF-kB activation in bowel cells.
Eur. Surg. Res. 2005. 37: 104.
17. Cserepes B, Jancsó G, Gasz B, Ferencz A, **Rácz B**, Gaszner B, Lantos J, Róth E. Urocortin expression after ischaemic preconditioning in cardiac cells.
J. Mol. Cell Cardiol. 2005. 38: 1014.
18. Ferencz A, **Rácz B**, Gasz B, Cserepes B, Tamás A, Reglődi D, Róth E. Effects of pituitary adenylylate cyclase activating polypeptide on the ischemia/reperfusion injury in rat small bowel.
Eur. Surg. Res. 2006. 38: 140.

19. Benkő L, Danis J, Ferencz A, **Rácz B**, Cserepes B, Lőrinczy D, Róth E. Differential scanning calorimetric examination of the esophagus after 2 different stent implantations. Early results with a new stent, designed for the management of acute esophagus variceal bleeding.
Eur. Surg. Res. 2006. 38: 143-144.
20. Reglődi D, Tamás A, Kiss P, Lubics A, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr., Tóth G, Róth E, **Rácz B**. PACAP attenuates excitotoxic retinal injury by influencing apoptotic pathways in neonatal rats.
J. of FEBS. 2006. 273:123.
21. Gasz B, Jancsó G, Bertók Sz, **Rácz B**, Alotti N, Róth E. Expression of CD97 and adhesion molecules on circulating leukocytes in patients undergoing coronary artery bypass surgery.
Eur. Surg. Res. 2006. 38: 149.
22. Cserepes B, Jancsó G, **Rácz B**, Gasz B, Ferencz A, Benkő L, Róth E. Cardioprotective effect of urocortin in the process of postconditioning.
Eur. Surg. Res. 2006. 38: 151-152.
23. Cserepes B, Jancsó G, **Rácz B**, Gasz B, Ferencz A, Benkő L, Borsiczky B, Füredi R, Ferencz S, Kürthy M, Gaszner B, Lantos J, Róth E. Cell protective role of urocortin in myocardial pre- and postconditioning.
J. Mol. Cell Cardiol. 2006. 40: 959-960.
24. Róth E, Cserepes B, Gasz B, **Rácz B**, Lantos J, Kürthy M, Gaszner B, Jancsó G. Ischaemic and pharmacological preconditioning induces heme oxygenase-1 expression in cultured myocardium.
J. Mol. Cell Cardiol. 2006. 40: 959.
25. Ferencz A, **Rácz B**, Gasz B, Kalmár-Nagy K, Tamás A, Reglődi D, Róth E. Intracellular signalling and histological examination of PACAP treatment on small bowel.
J. of FEBS. 2006. 273: 123.
26. Reglődi D, Tamás A, Kiss P, Lubics A, Gasz B, Borsiczky B, Jr. Gallyas F, Tóth G, Róth E, **Rácz B**. PACAP attenuates excitotoxic retinal injury by influencing apoptotic pathways in neonatal rats.
J. of FEBS. 2006. 273: 123.

Előadások

1. **Rácz B**, Reglődi D, Tamás A, Dénes V, Kiss P, Lengvári I, Gábrriel R. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Protect Against Monosodium Glutamate Toxicity In The Rat Retina. (poszter)
A Magyar Idegtudományi Társaság XI. Kongresszusa (MITT), Pécs, 2005. január 26-29.
2. **Rácz B**, Gasz B, Fodor B, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Osmotic stress induced signal transduction pathways in chondrocytes during acute haemarthrosis- an in vitro study. (előadás)
XXXX. Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), Konya, Törökország, 2005. május 25-28.
3. **Rácz B**, Reglődi D, Tamás A, Dénes V, Kiss P, Lengvári I, Gábrriel R. PACAP védő hatásának vizsgálata monosodium glutamate kezelés következtében kialakuló retinális károsodásban. (poszter)
A Magyar Anatómus Társaság XIII. Kongresszusa (MAT), Pécs, 2005. június 17-18.
4. **Rácz B**, Gasz B, Tamás A, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Activation of signal transduction pathways in chondrocytes under hyperosmotic conditions. (poszter)
30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, Budapest, Magyarország, 2005. július 2-7.
5. **Rácz B**, Gasz B, Cserepes B, Ferencz A, Fodor B, Dávid Sz, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Ozmotikus stressz indukálta jelátviteli útvonalak vizsgálata chondrocytákon. (előadás)
Magyar Sebész Társaság Kísérletes Sebészeti Szekció XX. Jubileumi Kongresszusa, 2005. szeptember 8-10, Hajdúszoboszló.
6. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Gallyas F Jr, Sümegi B, Róth E, Reglődi D. Possible signalling pathways involved in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion. (poszter)
7th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, Rouen, Franciaország, 2005. szeptember 11-14.

7. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Gallyas F Jr, Sümegi B, Róth E, Reglődi D. Possible signalling pathways involved in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion. (előadás)
Signaling Mechanisms of VIP, PACAP and Related Peptides: Contribution of Genomics, Proteomics and Bioinformatics, Mont-Saint-Aignan, Franciaország, 2005. szeptember 15.

8. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr., Tóth G, Róth E, Reglődi D. Signaling pathways involved in the protective effects of PACAP in MSG-induced retinal degeneration. (poszter)
International IBRO Workshop, Budapest, Magyarország 2006. január 26-28.

9. **Rácz B**, Reglődi D, Benkő L, Ferencz A, Cserepes B, Róth E, Borsiczky B. The effects of adenylate cyclase activating polypeptide and the possible signalling pathways involved in chondrocytes during hyperosmotic conditions. (előadás)
41st Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), Rostock, Németország, 2006. május 17-20.

10. **Rácz B**, Reglődi D, Fodor B, Gasz B, Benkő L, Ferencz A, Tamás A, Jr. Gallyas F, Róth E, Borsiczky B. PACAP increases chondrocyte survival through acting on apoptosis signalling pathways. (poszter)
31th FEBS Congress, Istanbul, Törökország, 2006. június 24-29.

11. **Rácz B**, Gasz B, Gallyas F Jr., Tamás A, Lubics A, Kiss P, Róth E, Tóth G, Hegyi O, Wittmann I, D Reglődi. Effects of PACAP in oxidative stress-induced damage in endothelial cells. (poszter)
23rd Conference of European Comparative Endocrinologist, Manchester, Anglia, 2006. augusztus 29-szeptember 2.

12. **Rácz B**, Gallyas F Jr., Gasz B, Tamás A, Lubics A, Kiss P, Róth E, Tóth G, Lengvári I, Hegyi O, Wittmann I, Reglődi D. A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid hatása az endothel sejtek túlélésében. (poszter)
XI. MITT Konferencia, Szeged, 2007. január 24-27.

13. **Rácz B**, Gasz B, Gallyas F Jr., Kiss P, A Tamás, Józsa R, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Róth E, Reglődi D. Common antiapoptotic mechanism in the neuro- and cardioprotective effects of PACAP. (poszter)
III. Neurotoxicity Society Meeting, Pucon, Chile, 2007. március 23-29.

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: 61,893

Összes publikációk impakt faktora: 35,4016

Témához kapcsolódó publikációk impakt faktora: 15,439

Összes idézettség: 26

Összes idegen idézettség: 10

**APOPTOSIS SIGNALING PATHWAYS AND ANTI-APOPTOTIC
EFFECTS OF PITUITARY ADENYLATE CYCLASE ACTIVATING
POLYPEPTIDE (PACAP) ON VARIOUS TISSUES AND CELL
LINES.
IN VITRO AND IN VIVO STUDIES.**

PhD Thesis

By

Boglárka Rác

Head of the Doctoral School: Judit Nagy MD, PhD, DSc.

Supervisor: Elizabeth Róth MD, PhD, DSc.

Consultant: Elizabeth Róth MD, PhD, DSc., Dóra Reglődi, MD, PhD

University of Pécs, Department of Surgical Research and Techniques

Hungary

Pécs

2007

I. INTRODUCTION

Apoptosis is a cell death process, which occurs during development and aging of animals and several other processes. Apoptosis (from the Greek words *apo* = from and *ptosis* = falling) is one of the main types of programmed cell death. Apoptosis is carried out in an ordered process that generally confers advantages during an organism's life cycle. But the balance about apoptosis is very important, because too much apoptosis causes cell-loss disorders, whereas too little results in uncontrolled cell proliferation, namely cancer, autoimmune disorders. This balancing process is part of the homeostasis. Between 50 and 70 billion cells die each day due to apoptosis in the average human adult. In a year, this amounts to the proliferation and subsequent destruction of a mass of cells equal to an individual's body weight. Homeostasis is achieved when the rate of mitosis (cell proliferation) in the tissue is balanced by cell death. The diseases in which apoptosis has been implicated can be grouped into 2 broad groups: those in which there is increased cell survival (i.e. associated with inhibition of apoptosis) and those in which there is excess cell death (where apoptosis is overactive). Signaling for apoptosis occurs through multiple independent pathways that are initiated either from triggering events within the cell or from outside the cell, for instance, by ligation of death receptors.

In our study we focused on the activation of members of mitogen activated protein kinase (MAPK) family: extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK1/2) and p38 MAPK; cAMP-responsive element binding protein (CREB); Bcl-2; phospho-Bad; apoptosis inducing factor (AIF); cytochrome c and caspase-3.

Analysis of these regulatory pathways has led to a better understanding of the etiology and pathogenesis of many human diseases and neurodegenerative/neurodevelopmental diseases. The mechanism by which factors protect the cells from degeneration is unclear and we tried to investigate the challenge of converting that understanding into new therapeutic modalities. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) could be one of the new therapeutic peptides which is why we investigated the effects of PACAP in different in vitro and in vivo models.

II. PITUITARY ADENYLATE CYCLASE ACTIVATING POLYPEPTIDE (PACAP)

PACAP was first isolated from ovine hypothalamus on the basis of its ability to stimulate cAMP formation in pituitary cells. PACAP exists in two forms, with 27 and 38 amino acid residues. PACAP belongs to the VIP/secretin/glucagon family of peptides and shares 68% identity with vasoactive intestinal peptide (VIP), but its adenylate cyclase stimulating activity is 1000-10000 times greater than that of VIP. The primary structure of PACAP-38 is identical among all mammalian species examined, and it also shows marked similarity with lower vertebrates examined, and nonvertebrates, with differences in only 1-4 amino acids. This suggests that the structure of PACAP has remained very conserved throughout phylogenesis and it may reflect its importance in fundamental functions in the nervous system. Despite the high similarity between VIP and PACAP, the distribution of these peptides is quite different. In mammalian tissues, the 38 amino acid form of PACAP is prevalent, constituting approximately 90% of the peptide. The PACAP receptors belong to the family of G protein-coupled receptors with seven transmembrane domains. There are two types of PACAP receptors: PAC1 receptor which binds PACAP with high affinity and VIP with a much lower affinity and VPAC1 and VPAC2 receptors which bind VIP and PACAP with similar affinities. Similar to other "brain-gut peptides" PACAP is localized not only in the central but in the peripheral nervous system and also in non-neural tissues, such as in endocrine glands and the gastrointestinal tract. PAC1 receptor is coupled to adenylate cyclase and phospholipase C (PLC). Through adenylate cyclase activation, it elevates cAMP, and activates protein kinase A (PKA), which can activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways.

PACAP is a potent anti-apoptotic agent. Its anti-apoptotic effects have been extensively studied in various neuronal cell lines against different toxic agents in vitro and in models of neuronal pathologies in vivo. Anti-apoptotic effects of the peptide have been demonstrated also in some non-neuronal cell cultures, but its effect on the survival of cardiomyocytes and endothelial cells is not known. The neuroprotective signaling mechanism influenced by PACAP is relatively well-known in vitro, but its effect on the possible protective signaling pathways in an in vivo system is not known.

III. AIMS

The aim of the thesis was to investigate apoptosis and its signaling pathways in different models *in vivo* and *in vitro*. PACAP could be one of the new therapeutic peptides and that is why we chose to investigate the effects of PACAP in cardiac, endothelial and retinal models.

1. PACAP has well-known neuroprotective effects, and one of the main factors leading to neuroprotection seems to be its anti-apoptotic effects. The peptide and its receptors are present also in the heart, but whether PACAP can be protective in cardiomyocytes, is not known. Therefore, the aim of the study was to investigate the effects of PACAP on oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes.

2. PACAP is known to stimulate production of vascular endothelial growth factor (VEGF) in some cell lines. However, no data are presently available on the direct effects of PACAP on endothelial cell survival. VIP, the structurally closest related peptide to PACAP, has been reported to promote survival of human corneal endothelial cells. Accordingly, the aim of the study was to investigate the effects of PACAP on endothelial cell survival and on oxidative stress-induced changes in the activation of members of the MAPK family.

3. PACAP and its receptors can be found in the retina and it is an important transmitter in the retinohypothalamic tract. The well-known neuroprotective effects of PACAP have also been shown *in vitro* in the retina in some pathological conditions such as hypoxia and optic nerve dissection. Elevated glutamate levels lead to retinal damage and PACAP is able to protect against glutamate-induced cell death in the retina *in vitro*. Recently, we have shown that this protective effect is also present *in vivo*, in monosodium-glutamate (MSG)-induced retinal degeneration. The underlying molecular mechanism of this protective effect is not yet known. Retinal cell death induced by over-stimulation of glutamate receptors is related to apoptosis. The aim of this part of the study was to further elucidate the possible signaling pathways involved in the protective effects of PACAP against MSG-toxicity *in vivo*.

IV. MATERIALS AND METHODS

PACAP protects cardiomyocytes and endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis- *in vitro* study

Cell culture

Primary culture of neonatal rat cardiomyocyte was obtained from ventricular myocytes of 2–4-day-old Wistar rats, using collagenase. Isolated cells were plated on collagen I-coated plates at the density of 200000 cm⁻². Cells were incubated in DMEM/F12 medium supplemented with 10% of fetal bovine serum. The following day, when the cells attached to the plate firmly, the medium was replaced with complete serum free medium (CSFM) containing the following supplements: BSA, insulin (1 μM), transferrin (5.64 μg/ml), selenium (32 nM) (insulin–transferrin–sodium–selenit media supplement, Sigma, Hungary), sodium pyruvate (2.8 mM), 3,3',5'-triiodo-L-thyronine sodium salt (1 nM), penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (0.1 mg/ml). Experiments started 48 h after incubation with CSFM and the medium was changed every 24 h.

The EOMA CRL-2586 cell line was obtained from mouse hemangioendothelioma (ATCC). EOMA cells were cultured in DMEM/F12 medium, supplemented with 10 % of fetal bovine serum, 1 % penicillin-streptomycin. Cells were passaged by trypsinization (Trypsin/EDTA), followed by dilution in DMEM/F12 medium containing 10 % fetal bovine serum. Experiments started 48 hrs after incubation in humidified 95 % air and 5 % CO₂ mixture at 37 °C in the medium.

Cell viability assay

Viability of cells were determined by colorimetric MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). The assay is based on the reduction of MTT into a blue formazan dye by viable mitochondria. At the end of the treatments, the medium was discarded from plates and the cells were subsequently washed twice with phosphate buffered saline (PBS). Cells were then incubated with PBS containing 0.5 mg/ml of MTT for 3 hours at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. The solution was aspirated carefully and 1 ml of dimethylsulfoxide was added to dissolve the blue-colored formazan particles. Samples from duplicate wells were transferred to a 96-well plate and absorbance was measured by an ELISA reader, at 570 nm representing the values in arbitrary unit (AU). Results are expressed as percentage of control values.

Live/dead assay

Cell viability was also assessed by live/dead viability/cytotoxicity assay. Cells were incubated for 45 min in the live/dead (L/D) buffer, consisting of calcein-AM (5 μ l) and ethidium homodimer-1 (20 μ l) in PBS, as outlined by the manufacturer. Ethidium homodimer-1 is a high-affinity, red fluorescent nucleic acid stain that is only able to pass through the compromised membranes of dead cells. Calcein-AM is a fluorogenic esterase substrate that is hydrolyzed to a green-fluorescent product, thus green fluorescence is an indicator of living cells that have esterase activity as well as an intact membrane to retain the esterase products.

Annexin V and propidium iodide staining

First, the medium was discarded and wells were washed twice with isotonic sodium chloride solution. Cells were removed from plates using a mixture of 0.25 % trypsin, 0.2 % ethylene-diamin tetra-acetate (EDTA), 0.296 % sodium citrate, 0.6 % sodium chloride in distilled water. This medium was applied for 15 min at 37 °C. Removed cells were washed twice in cold PBS and were resuspended in binding buffer containing 10 mM Hepes NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂. Cell-count was determined in Burker's chamber for achieving a dilution in which 1 ml of solution contains 10⁶ cells. One hundred microliters of buffer (10⁵ cells) was transferred into 5 ml round-bottom polystyrene tubes. Cells were incubated for 15 min with fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated annexin V molecules and propidium iodide (PI). After this period of incubation, 400 μ l of annexin-binding buffer was added to the tubes, as described by the manufacturers. The samples were immediately measured by BD FacsCalibur flow cytometer.

Results were analyzed by Cellquest software. Quadrant dot plot was introduced to identify living and necrotic cells and cells in early or late phase of apoptosis. Necrotic cells were identified as single PI-positive. Apoptotic cells were branded as annexin V-FITC-positive only and cells in late apoptosis were recognized as double-positive for annexin V-FITC and PI. Cells in each category were expressed as percentage of the total number of stained cells counted.

Assessment of MAP kinases, phospho-Bcl-2, phospho-Bad and caspase-3 cleavage

Following the treatments in different groups, cells were harvested by trypsin-EDTA according to the protocol described at annexin V-PI staining. Cells were pelleted by centrifugation (175 g, 5 min) and then fixed in 1% formaldehyde in PBS for 10 min at 37 °C. After 1 min of chilling, cell suspensions were centrifuged again followed by permeabilization applying 90% methanol for 30 min at 4 °C. Each tube of cells was rinsed twice with 0.5% bovine serum albumin (BSA) and finally appropriate amounts of cells ($0.5-5 \times 10^6$) were resuspended in 0.5% BSA. Cells were then incubated for 10 min at room temperature. Subsequent to blocking of cells in BSA, an appropriate dilution of the primary antibody was added to the solution and was incubated for 45 min at room temperature. Polyclonal antibodies against active caspase-3, phospho-Bcl-2 and phospho-Bad were used at dilutions 1:1000 (ERK1/2), 1:50 (p38 MAPK), 1:50 (JNK1/2), 1:10 (caspase-3), 1:50 (Bcl-2) and 1:100 (Bad). After centrifugation, the supernatant was carefully aspirated and the cells were resuspended in 100 μ l 0.5% BSA containing FITC conjugated secondary antibody (Sheep anti rabbit IgG; anti-mouse IgG for ERK1/2) at a dilution of 1:50, and were incubated for 30 min. Fluorescent staining of samples was quantified by flow cytometric measurement of 10 000 cells. To determine the non-specific marking of cells, the secondary antibody was applied for 30 min without primary antibody following permeabilization. Our results were analyzed by Cellquest software measuring the appearance of phospho-ERK1/2, phospho-p38 MAPK, phospho-JNK1/2, caspase-3, phospho-Bcl-2 and phospho-Bad in the cells as mean fluorescence intensity (MFI).

***In vivo* neuroprotection by PACAP in excitotoxic retinal injury: effects on the apoptotic signal transduction**

Animals

Newborn Wistar rat pups were used for the experiments. All procedures were performed in accordance with the ethical guidelines approved by the University of Pécs (No: BA02/2000-31/2001) Laboratories and were maintained at room temperature, in an alternating 12-hr light and 12-hr dark cycle (lights on at 6 am).

Pups (n=40) were injected subcutaneously with 4 mg/g bodyweight MSG on postnatal days 1 and 5. Preceding each MSG treatment, 100 pmol PACAP1-38 in 5 μ l saline was injected unilaterally in the vitreous body with a Hamilton syringe, and the same volume of saline was injected into the other eye. In order to investigate the effects of PACAP1-38 and the PACAP antagonist PACAP6-38, a group of pups (n=20) received only PACAP1-38 (100 pmol) or PACAP6-38 (1 nmol) into one eye, while the other eyes served as saline-treated controls. The used doses of PACAP1-38 and PACAP6-38 were based on our previous studies. Retinas were removed 12 and 24 hours following each treatment and were processed for Western blot analysis.

Western blot analysis

Samples were homogenized in ice-cold isotonic Tris buffer (50mM, pH: 8.0) containing 0.5mM sodium-metavanadate, 1mM EDTA and Protease Inhibitor Coctail (1:1000). Cytosolic fractions prepared from aliquots of the homogenates by centrifuging them at 15000g for 10min at 4°C were used for demonstrating translocation of cytochrome-c and apoptosis inducing factor (AIF) from mitochondria to the cytosol. Other antigens were determined from the rest of the tissue homogenates following sonication. Proteins were precipitated by TCA, washed 3 times with -20°C acetone, dissolved in Laemli sample buffer, separated on 12% SDS-polyacrilamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking (2 hours with 3% nonfat milk in Tris-buffered saline), membranes were probed overnight at 4°C with antibodies recognizing the following phospho-specific antigens: Bad (Ser 136) (1:1000), SAPK/JNK (1:2000), ERK (1:2000), CREB (1:1000) and cleaved caspase-3 (1:1000), cytochrome c and AIF. Membranes were washed six times for 5 min in Tris-buffered saline (pH 7.5) containing 0.2% Tween (TBST) before addition of goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:3000). Protein bands were visualized with enhanced chemiluminescence labeling using an ECL Western blotting detection system. The developed films were scanned and the pixel volumes of the bands were determined by using NIH's Image J software. Loading of samples was confirmed even by anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase immunoblotting. Pixel volumes of the bands of interest were normalized to that of the appropriate loading control or the respective total protein, such as JNK1/2 (1:1000), caspase 3 (1:1000), Bad (Ser 136) (1:1000). Each experiment was repeated minimum three times.

Statistical analysis

In vitro data were presented as mean±S.E.M. from three independent experiments, analyzed with one-way ANOVA followed by Neuman–Keul's *post hoc* analysis, and were considered significant at $P<0.05$.

All in vivo data were expressed as the mean ± S.D. Differences between groups were assessed with one-way ANNOVA. Statistical analysis was performed by analysis of variance and Student's *t* test.

V. PITUITARY ADENYLATE CYCLASE ACTIVATING POLYPEPTIDE PROTECTS CARDIOMYOCYTES AGAINST OXIDATIVE STRESS-INDUCED APOPTOSIS

Results

To establish whether PACAP influences viability of cells exposed to H₂O₂, mitochondrial viability in cardiac cells was measured by MTT assay. Administration of H₂O₂ alone resulted in manifest decrease in cell viability compared to control values ($58.2 \pm 11.0\%$). Treatment with PACAP1-38 and PACAP6-38 alone did not alter cell viability. However, when H₂O₂-treated cells were incubated with PACAP1-38, cell viability significantly increased ($85.8 \pm 15.8\%$ of control) when compared to the viability of H₂O₂-treated cells. Incubation of cultured cells with the PACAP receptor antagonists, PACAP6-38, significantly attenuated the beneficial effect of PACAP1-38 on cell viability ($56.1 \pm 11.9\%$ of control values).

The control group had $90.5 \pm 1.3\%$ of intact, living (annexin V and PI negative) cells and $5.4 \pm 1.6\%$ of cells in early phase of apoptosis (annexin V positive and PI negative). An increase of apoptotic cells ($21.6 \pm 3.8\%$) was observed in the H₂O₂-treated group with a lower number of living cells ($76.7 \pm 3.6\%$). PACAP1-38 and PACAP6-38 administration alone caused no changes in the percentage of living and apoptotic cells related to control values. PACAP1-38 administration led to a significant increase in the percentage of living cells ($91.1 \pm 0.9\%$ of control) and a reproducible decrease in the rate of apoptosis ($6.7 \pm 1.7\%$) in cells exposed to H₂O₂. This beneficial effect of PACAP1-38 was diminished by PACAP6-38 (living cells: $81.8 \pm 1.2\%$, apoptotic cells: $14.1 \pm 1.8\%$).

The rate of apoptosis was further examined by measuring caspase-3 activity and the level of phospho-Bcl-2 and phospho-Bad using flow cytometry. Neither PACAP1-38

nor PACAP6-38 alone altered the examined apoptotic markers. Regarding the proapoptotic marker of caspase cleavage, we found that the applied concentration of H₂O₂ stimulated massive up-regulation of active caspase-3 levels. The amount of active caspase-3 was markedly reduced by PACAP1-38 in cells exposed to H₂O₂. The PACAP antagonist could abolish the advantageous effect of PACAP1-38 on caspase activation as compared to the control group and the group receiving co-treatment with PACAP1-38 and H₂O₂. The dramatic reduction in phosphorylated Bcl-2 was induced by H₂O₂. PACAP1-38 was able to up-regulate Bcl-2 in cells treated with H₂O₂. This could be inhibited by PACAP6-38 and Bcl-2 was detected around the level of the H₂O₂ treated group. It is known that oxidative stress provokes a decrease in the level of phospho-Bad agreeing with our findings which demonstrated significant reduction in phospho-Bad level as a result of H₂O₂ administration. Co-incubation of H₂O₂ and PACAP1-38 led to the significant up-regulation of phospho-Bad, thus its level reached approximately control values. PACAP receptors antagonists, PACAP6-38, treatment in such a condition was associated with lower phospho-Bad levels.

VI. PROTECTIVE EFFECTS OF PITUITARY ADENYLATE CYCLASE ACTIVATING POLYPEPTIDE IN ENDOTHELIAL CELLS AGAINST OXIDATIVE STRESS-INDUCED APOPTOSIS

Results

Viability of EOMA cells after H₂O₂ was measured by MTT assay. H₂O₂ treatment alone led to a manifest decrease of cell viability compared to control values. Treatment with PACAP1-38 and PACAP antagonist, PACAP6-38 alone did not alter cell viability. Cell viability significantly increased when H₂O₂-treated cells were co-incubated with PACAP1-38. Incubation of cultured cells with the PACAP antagonist, PACAP6-38, significantly attenuated the beneficial effect of PACAP1-38 on cell viability. This effect of PACAP was further verified by qualitative live/dead assay, which clearly showed that H₂O₂ treatment increased the number of dead cells compared to the control group. PACAP1-38 treatment was able to counteract this effect of H₂O₂ treatment, while PACAP6-38 inhibited the effects of PACAP1-38.

Using annexin V and propidium iodide staining, we found that the control group had more than 90% of intact, living cells and only less than 10% of cells in the early and late phases of apoptosis. An increase of apoptotic cells was observed in the H₂O₂-treated

group with a lower number of living cells. PACAP1-38 and PACAP6-38 administration alone caused no changes in the percentage of living and apoptotic cells compared to control values. PACAP1-38 administration led to a significant increase in the percentage of living cells and a reproducible decrease in the rate of apoptosis in cells exposed to H₂O₂. This beneficial effect of PACAP1-38 was diminished by PACAP6-38. EOMA cells were incubated with 0.5 mM H₂O₂ for 10, 30, and 60 minutes. ERK1/2, p38 MAPK and JNK1/2 activation appeared at all time-points and maximal peak was reached at the 30-minute time-point. Using flow cytometry, the phosphorylation of ERK1/2, p38 MAPK and JNK1/2 was examined. 0.5 mM H₂O₂ reduced the activation of ERK1/2 and induced that of the pro-apoptotic markers p38 and JNK1/2. Neither PACAP1-38 nor PACAP6-38 alone significantly altered the phosphorylation of these examined markers. However, the phosphorylation of p38 MAPK and JNK1/2 was markedly reduced by PACAP1-38 in cells exposed to H₂O₂. Also, PACAP1-38 was able to increase the phosphorylation of ERK1/2 in H₂O₂-treated cells. PACAP receptors antagonists, PACAP6-38, decreased the advantageous effect of PACAP1-38 in levels of all three markers.

VII. IN VIVO NEUROPROTECTION BY PACAP IN EXCITOTOXIC RETINAL INJURY: EFFECTS ON THE APOPTOTIC SIGNAL TRANSDUCTION

Results

We showed that the presently applied MSG treatment protocol led to a severe degeneration of the inner retinal layers which could be significantly ameliorated by local pre-MSG PACAP administration. In our earlier study, the phosphorylation i.e. the activation of ERK1/2 and CREB (p-ERK1/2 and p-CREB) was monitored 12 and 24 h after treatments. There was a gradual increase in both proteins following MSG treatments. PACAP treatments led to further, significant increases in the level of p-ERK1/2 and p-CREB 12 h after the first and the second PACAP treatments. There was no further elevation after the third treatment in either control or PACAP-treated retinas. Interestingly, PACAP increased the ERK 1/2 and CREB phosphorylation 12 h, but not 24 h after the first and second treatments. It suggests that during the first two MSG challenges PACAP induced a transient increase in the activation of ERK 1/2 and of its downstream target CREB, which disappeared by 24 h after the treatment. Then the

phosphorylation reached a plateau value, and did not increase any further. These results are in accordance with our earlier histological observations using the same experimental setup. In that study we showed that in order to achieve significant amelioration in MSG-induced degeneration at least two PACAP treatments are necessary, but there was no further amelioration after the third treatment.

JNK activity was slightly decreased by PACAP treatment alone, however, it was increased by the PACAP receptors antagonists, PACAP6-38, 12 hours after administration. MSG-treatment elevated JNK activation that was prevented by PACAP, although these changes were not significant during the first 12 hours after MSG injection. However, JNK phosphorylation was significantly elevated 24 hours after the first treatment and 12 hours after the second one. PACAP abolished the MSG-induced elevation of JNK activation, while PACAP6-38 completely counteracted the effect of PACAP.

Phosphorylation and thus inactivation of the pro-apoptotic protein, Bad was not altered by PACAP treatment alone, although it was significantly decreased 24 hours after the PACAP receptors antagonists, PACAP6-38, administration. MSG induced a significant decrease in Bad phosphorylation, which was abolished by PACAP administration. This effect of PACAP could be blocked by adding PACAP6-38.

Translocation of AIF from the mitochondria to the cytosol signals for the induction of caspase-independent apoptosis mechanism was also investigated. PACAP1-38 treatment by itself significantly reduced the cytoplasmic translocation of AIF, especially 12 hours after the treatment indicating that by a yet uncharacterized mechanism PACAP1-38 can inhibit even the unstimulated release of apoptotic signal from the mitochondria. MSG induced an elevation in AIF translocation 12 and 24 hours after the first treatment. This elevation was inhibited by PACAP1-38, and the effect of PACAP1-38 was counteracted by the PACAP antagonist PACAP6-38. The inhibitory effect of PACAP1-38 on the MSG-induced AIF translocation was less pronounced 24 than 12 hours after the first MSG treatment, and AIF levels in the cytoplasm showed a decreasing tendency that was not affected by either MSG or PACAP after the second treatment.

Release of cytochrome c from the mitochondria is an early event in the caspase-mediated apoptotic process, and cytosolic cytochrome c levels resulted from the different treatments showed a pattern somehow different from that of AIF. Namely,

PACAP1-38 induced a late decrease (24 hours after the treatment), while PACAP6-38 achieved an early increase (12 hours after the treatment) in cytochrome c release. MSG caused a significant elevation of cytoplasmic cytochrome c which could be prevented by PACAP1-38 administration. Again, PACAP6-38 could block the effect of PACAP. Similarly to AIF translocation, MSG-induced cytochrome c release was much more pronounced 12 than 24 hours after the treatment. However, unlike in case of AIF, the second MSG treatment induced an elevation in cytosolic cytochrome c that was higher in extent than in case of the first one. Again, PACAP1-38 attenuated the effect of MSG, and the cytochrome c levels were much decreased 24 hours after the treatment as compared to the 12 h values.

Cleavage of caspase 3 is a good indicator of caspase activation. PACAP1-38 treatment did not cause significant changes, while PACAP6-38 significantly increased caspase activation 12 and 24 hours after injection. MSG administration caused a significant increase in cleaved caspase-3 after the first treatment, with no further elevation after consecutive treatments. At these time-points, PACAP-treatment inhibited the MSG-induced caspase activation, and this inhibition could be blocked by PACAP6-38 treatment.

VIII. SUMMARY OF NEW FINDINGS

1. Treatment with PACAP markedly attenuates oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes via reducing the activation of caspase-3 and increasing the activation of Bcl-2 and phospho-Bad. Our results show, for the first time, that the well known anti-apoptotic effects of PACAP in various neuronal cell lines is also present in cardiomyocytes (Fig.1).

2. PACAP enhances endothelial cell survival, thus the cytoprotective, anti-apoptotic effect of PACAP is also present in these cells. Furthermore, we showed, for the first time, that PACAP influences the MAPK pathway, including ERK-, JNK-, and p38-signaling pathways to promote survival of endothelial cells (Fig.1).

3. The MSG-induced degeneration of the retina is partly due to the decrease of anti-apoptotic, and increase of proapoptotic molecules. Local PACAP treatment attenuates these MSG-induced changes in apoptotic signaling pathways: PACAP

increases the levels of the anti-apoptotic phospho-ERK and CREB and phospho-Bad, and reduces the proapoptotic signaling molecules such as JNK, AIF, cytochrome-c and caspase-3 in the retina. These results may serve as a background for further studies attempting to reduce retinal degeneration induced by various agents (Fig.1).

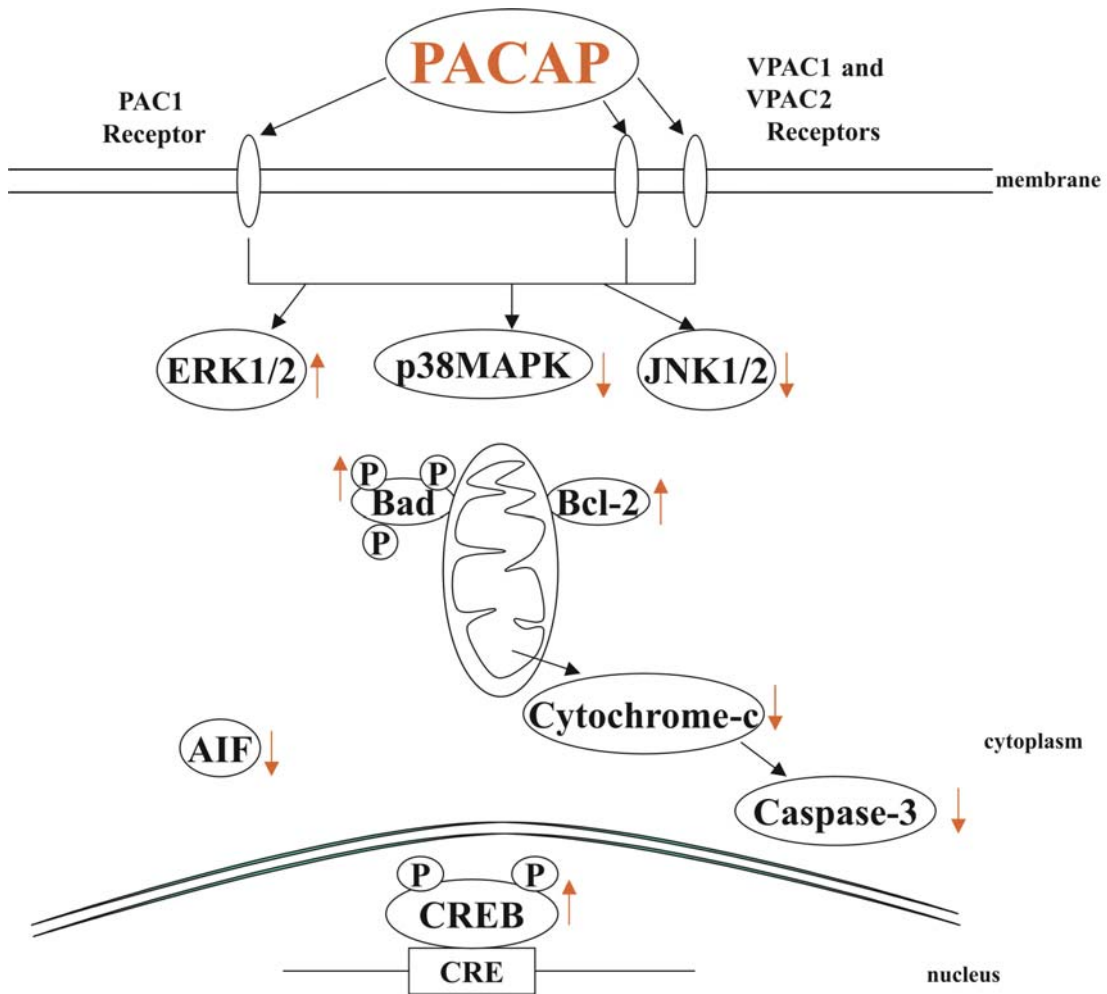


Fig.1. Schematic figure about signaling pathways of PACAP. Effects of PACAP on the investigated signaling pathways on cardiomyocyte, endothelial cells and in the retina. The upper arrows indicate increased or decreased levels of investigated proteins.

IX. ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank the Department of Surgical Research and Techniques, the Department of Anatomy and the Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pecs, especially my program leader Prof. Dr Róth Erzsébet and my colleagues Dr Borsiczky Balázs and Dr. Gasz Balázs for having given the possibility to work on this project and giving me support.

I would like to thank Dr Reglődi Dóra for her tutorial work.

I would also like to acknowledge the help of Dr Gallyas Ferenc Jr. at the Department of Biochemistry and Medical Chemistry.

At last but not least, this work would have never been realized without the support and help of my family.

X. PRESENTATIONS AND PUBLICATIONS

Publications related to the thesis

1. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Gallyas F Jr, Róth E, Reglődi D. Involvement of ERK and CREB signalling pathways in the protective effect of PACAP on monosodium glutamate-induced retinal lesion. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2006. 1070: 507-511. IF: 1,93.
2. **Rácz B**, Gallyas F Jr, Kiss P, Tóth G, Hegyi O, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Róth E, Tamás A, Lengvári I, Lubics A, Reglődi D. The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involves inhibition of proapoptotic signaling pathways. *Regul. Pept.* 2006. 137: 20-26. IF: 2,442.
3. **Rácz B**, Reglődi D, Kiss P, Babai N, Atlasz T, Gábrriel R, Lubics A, Gallyas F Jr, Gasz B, Tóth G, Róth E, Hegyi O, Lengvári I, Tamás A. In vivo neuroprotection by PACAP in excitotoxic retinal injury: review of effects on retinal morphology and apoptotic signal transduction. *Int. J. Neuroprot. Neuroregen.* 2006. 2: 80-85.
4. **Rácz B**, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Tamás A, Józsa R, Lubics A, Kiss P, Róth E, Ferencz A, Tóth G, Hegyi O, Wittmann I, Lengvári I, Somogyvári-Vigh A, Reglődi D. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2007. 153:115-123 . IF: 2,487.
5. Tamás A, Gábrriel R, **Rácz B**, Dénes V, Kiss P, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium-glutamate. *Neurosci. Lett.* 2004. 372: 110-113. IF: 2,019.

6. Gasz B, **Rácz B**, Róth E, Borsiczky B, Ferencz A, Tamás A, Cserepes B, Lubics A, Gallyas F Jr, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides* 2006. 27: 87-94. IF: 2,701.
7. Gasz B, **Rácz B**, Róth E, Borsiczky B, Tamás A, Boronkai Á, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. PACAP inhibits oxidative stress-induced activation of MAP kinase dependent apoptotic pathway in cultured cardiomyocytes. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2005. 1070: 293-297. IF: 1,93.
8. Kiss P, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Szalai M, Hauser D, Horváth Z, **Rácz B**, Gábel R, Babai N, Tóth G, Reglődi D. Effects of systemic PACAP treatment in monosodium glutamate-induced behavioral changes and retinal degeneration. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2006. 1070: 365-370. IF: 1,93.

Publication not related to the thesis

1. **Rácz B**, Reglődi D, Fodor B, Gasz B, Lubics A, Gallyas F Jr, , Róth E, Borsiczky B. Hyperosmotic stress-induced apoptotic signaling pathways in chondrocytes. *BONE* 2007. 40: 1536-1543. IF: 3,829.
2. **Rácz B**, Gasz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tamás A, Szántó Z, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Hegyi O, Róth E, Reglődi D. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regul. Pept.* 2007; (in press). IF: 2,442
3. **Rácz B**, Gasz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Róth E, Tóth G, Hegyi O, Verzár Z, Fabricsek C, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the PKA-Bad-14-3-3 signaling pathways in glutamate-induced retinal injury in neonatal rats. *Neurotox. Res.* 2007; (in press). IF: 2
4. Ferencz A, **Rácz B**, Gasz B, Benkő L, Jancsó G, Kürthy M, Róth E. Intestinal ischemic preconditioning in rats and NF-kappaB activation. *Microsurgery* 2006. 26: 54-57. IF: 0,711
5. Gasz B , Lénard L, **Rácz B** , Benkő L, Borsiczky B, Cserepes B, Gál J, Jancsó G, Lantos J, Ghosh S, Szabados S, Papp L, Alotti N, Róth E. Effect of cardiopulmonary bypass on cytokine network and myocardial cytokine production. *Clin. Cardiol.* 2006. 29: 311-315. IF: 0,989.
6. Borsiczky B, Fodor B, **Rácz B**, Gasz B, Sára J, Róth E. Rapid leukocyte activation following intraarticular bleeding. *J. Ortop. Res.* 2006. 24: 684-689. IF: 2,784.
7. Ferencz A, **Rácz B**, Gasz B, Kalmár-Nagy K, Horváth ÖP, Róth E. Threshold level of NF-kB activation in small bowel ischemic preconditioning procedure. *Transplant. Proceed.* 2006. 38: 1800-1802. IF: 0,962.

8. Ferencz A, **Rácz B**, Cserepes B, Róth E. A korai és késői ischémiás prekondícionálás hatása az oxidatív stresszre vékonybél autotranszplantációs modellben.
Magy Seb 2005; 58: 245-249.
9. Cserepes B, Jancsó G, Gasz B, **Rácz B**, Ferencz A, Benkő L, Borsiczky B, Kürty M, Ferencz S, Lantos J, Gál J, Arató E, Míseta A, Wéber Gy, Róth E. Cardioprotective action of urocortin in early pre- and postconditioning.
Ann. NY. Acad. Sci. 2007. 1095: 228-239. IF: 1,93.
10. Jancsó G, Cserepes B, Gasz B, Benkő L, Borsiczky B, Ferencz A, Kürty M, **Rácz B**, Lantos J, Gál J, Arató E, Sinayc L, Wéber Gy, Róth E. Expression and protective role of heme oxygenase-1 in delayed myocardial preconditioning.
Ann. NY. Acad. Sci. 2007. 1095: 251-261. IF: 1,93.
11. Kiss P, Hauser D, Tamás A, Lubics A, **Rácz B**, Horváth Z, Farkas J, Zimmermann F, Stepien A, Lengvari I, Reglődi D. Changes in open-field activity and novelty-seeking behavior in periadolescent rats neonatally treated with monosodium glutamate.
Neurotox. Res. 2007; (in press). IF: 2

Abstracts

1. **Rácz B**, Gasz B, Fodor B, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Osmotic stress induced signal transduction pathways in chondrocytes during acute haemarthrosis- an in vitro study.
Eur. Surg. Res. 2005; 37: 61.
2. **Rácz B**, Gasz B, Tamás A, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Activation of signal transduction pathways in chondrocytes during hyperosmotic conditions.
J. of FEBS. 2005. X: 312.
3. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Sümegi B, Róth E, Reglődi D. Possible signalling pathways involved in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion.
Regul. Pept. 2005. 130: 174.
4. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Sümegi B, Róth E, Reglődi D. Possible signalling pathways involved in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion.
Regul. Pept. 2005. 130: 187.
5. **Rácz B**, Gasz B, Cserepes B, Ferencz A, Fodor B, Dávid Sz, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Ozmotikus stressz indukálta jelátviteli útvonalak vizsgálata chondrocytákon.
Magy. Seb. 2005. 58: 270.
6. **Rácz B**, Tamás A, Dénes V, Kiss P, Lengvári I, Gábel R, Reglődi D. PACAP attenuates the monosodium-glutamate-induced retinal degeneration in the rat.
Clin. Neurosci/Ideggy. Szmlé. 2005. 58(S1): 78.
7. **Rácz B**, Reglődi D, Benkő L, Ferencz A, Cserepes B, Róth E, Borsiczky B. The effects of adenylate cyclase activating polypeptide and the possible signalling pathways involved in chondrocytes during hyperosmotic conditions.
Eur. Surg. Res. 2006. 38: 60.

8. **Rácz B**, Reglődi D, Fodor B, Gasz B, Benkő L, Ferencz A, Tamás A, Gallyas F Jr, Róth E, Borsiczky B. PACAP increases chondrocyte survival through acting on apoptosis signalling pathways.
J. of FEBS. 2006. 273:123.
9. Reglődi D, Tamás A, **Rácz B**, Dénes V, Kiss P, Lengvári I, Gábrriel R. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects against monosodium-glutamate toxicity in the rat retina.
Regul. Pept. 2004. 122: 36.
10. Gasz B, Jancsó G, Lantos J, **Rácz B**, Lénárd L, Szabados S, Papp L, Róth E. Oxidative stress and PARP activation in patients undergone coronary surgery.
Shock 2005. 23: 52.
11. Gasz B, **Rácz B**, Lénárd L, Cserepes B, Jancsó G, Szabados S, Lantos J, Sümegi B, Alotti N, Papp L, Róth E. POLY (ADP-RIBOSE) Polymerase enzim aktivációjának összehasonlítása extrakorporális keringéssel, illetve off-pump technikával végzett koszorúsérműtétek állatkísérletes modelljében.
Cardiol. Hun. 2005. 35: A 40.
12. Gasz B, **Rácz B**, Lénárd L, Cserepes B, Jancsó G, Szabados S, Sümegi B, Alotti N, Papp L, Róth E.: Off-pump technikával végzett koszorúsérműtétek csökkentik a poly (ADP-ribose) polymerase enzim aktivációját.
Magy. Seb. 2005. 58: 283.
13. Borsiczky B, **Rácz B**, Fodor B, Gasz B, Dávid Sz, Benkő L, Róth E. Intraarticularis citokin túltermelődés akut haemarthrosban.
Magy. Seb. 2005. 58: 258.
14. Ferencz A, **Rácz B**, Benkő L, Róth E. Rövid ciklusú ischémiás prekondicionálás hatása az NF-kB aktivációra bélsejtekben.
Magy. Seb. 2005. 58: 282.
15. Cserepes B, Jancsó G, Gasz B, **Rácz B**, Balatonyi B, Gaszner B, Róth E. Az urocortin a szívizomzat iszkémiás prekondicionálásában.
Magy. Seb. 2005. 58: 281.
16. Ferencz A, **Rácz B**, Gasz B, Benkő L, Róth E. Effects of brief ischemic preconditioning protocol to NF-kB activation in bowel cells.
Eur. Surg. Res. 2005. 37: 104.
17. Cserepes B, Jancsó G, Gasz B, Ferencz A, **Rácz B**, Gaszner B, Lantos J, Róth E. Urocortin expression after ischaemic preconditioning in cardiac cells.
J. Mol. Cell Cardiol. 2005. 38: 1014.
18. Ferencz A, **Rácz B**, Gasz B, Cserepes B, Tamás A, Reglődi D, Róth E. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on the ischemia/reperfusion injury in rat small bowel.
Eur. Surg. Res. 2006. 38: 140.

19. Benkő L, Danis J, Ferencz A, **Rácz B**, Cserepes B, Lőrinczy D, Róth E. Differential scanning calorimetric examination of the esophagus after 2 different stent implantations. Early results with a new stent, designed for the management of acute esophagus variceal bleeding.
Eur. Surg. Res. 2006. 38: 143-144.
20. Reglődi D, Tamás A, Kiss P, Lubics A, Gasz B, Borsiczky B, Jr. Gallyas F, Tóth G, Róth E, **Rácz B**. PACAP attenuates excitotoxic retinal injury by influencing apoptotic pathways in neonatal rats.
J. of FEBS. 2006. 273:123.
21. Gasz B, Jancsó G, Bertók Sz, **Rácz B**, Alotti N, Róth E. Expression of CD97 and adhesion molecules on circulating leukocytes in patients undergoing coronary artery bypass surgery.
Eur. Surg. Res. 2006. 38: 149.
22. Cserepes B, Jancsó G, **Rácz B**, Gasz B, Ferencz A, Benkő L, Róth E. Cardioprotective effect of urocortin in the process of postconditioning.
Eur. Surg. Res. 2006. 38: 151-152.
23. Cserepes B, Jancsó G, **Rácz B**, Gasz B, Ferencz A, Benkő L, Borsiczky B, Füredi R, Ferencz S, Kürthy M, Gaszner B, Lantos J, Róth E. Cell protective role of urocortin in myocardial pre- and postconditioning.
J. Mol. Cell Cardiol. 2006. 40: 959-960.
24. Róth E, Cserepes B, Gasz B, **Rácz B**, Lantos J, Kürthy M, Gaszner B, Jancsó G. Ischaemic and pharmacological preconditioning induces heme oxygenase-1 expression in cultured myocardium.
J. Mol. Cell Cardiol. 2006. 40: 959.
25. Ferencz A, **Rácz B**, Gasz B, Kalmar-Nagy K, Tamás A, Reglődi D, Róth E. Intracellular signalling and histological examination of PACAP treatment on small bowel.
J. of FEBS. 2006. 273: 123.
26. Reglődi D, Tamás A, Kiss P, Lubics A, Gasz B, Borsiczky B, Jr. Gallyas F, Tóth G, Róth E, **Rácz B**. PACAP attenuates excitotoxic retinal injury by influencing apoptotic pathways in neonatal rats.
J. of FEBS. 2006. 273: 123.

Presentations

1. **Rácz B**, Reglődi D, Tamás A, Dénes V, Kiss P, Lengvári I, Gábor R. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Protect Against Monosodium Glutamate Toxicity In The Rat Retina. (poster)
A Magyar Idegtudományi Társaság XI. Kongresszusa (MITT), Pécs, 2005. január 26-29.
2. **Rácz B**, Gasz B, Fodor B, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Osmotic stress induced signal transduction pathways in chondrocytes during acute haemarthrosis- an in vitro study. (oral presentation)

XXXX. Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), Konya, Turkey, 25-28 May 2005.

3. **Rácz B**, Reglődi D, Tamás A, Dénes V, Kiss P, Lengvári I, Gábrriel R. PACAP védő hatásának vizsgálata monosodium glutamate kezelés következtében kialakuló retinális károsodásban. (poster)
A Magyar Anatómus Társaság XIII. Kongresszusa (MAT), Pécs, 2005.június 17-18.
4. **Rácz B**, Gasz B, Tamás A, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Activation of signal transduction pathways in chondrocytes under hyperosmotic conditions. (poster)
30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, Budapest, Hungary 2-7 July 2005.
5. **Rácz B**, Gasz B, Cserepes B, Ferencz A, Fodor B, Dávid Sz, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Ozmotikus stressz indukálta jelátviteli útvonalak vizsgálata chondrocytákon. (oral presentation)
Magyar Sebész Társaság Kísérletes Sebészeti Szekció XX. Jubileumi Kongresszusa, 2005. szeptember 8-10, Hajdúszoboszló.
6. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Gallyas F Jr, Sümegi B, Róth E, Reglődi D. Possible signalling pathways involved in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion. (poster)
7th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, Rouen, France, 11-14 September 2005.
7. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Gallyas F Jr, Sümegi B, Róth E, Reglődi D. Possible signalling pathways involved in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion. (oral presentation)
Signaling Mechanisms of VIP, PACAP and Related Peptides: Contribution of Genomics, Proteomics and Bioinformatics, Mont-Saint-Aignan, France, 15 September 2005.
8. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr., Tóth G, Róth E, Reglődi D. Signaling pathways involved in the protective effects of PACAP in MSG-induced retinal degeneration. (poster)
International IBRO Workshop, Budapest, Hungary, 26-28 January 2006.
9. **Rácz B**, Reglődi D, Benkő L, Ferencz A, Cserepes B, Róth E, Borsiczky B. The effects of adenylyl cyclase activating polypeptide and the possible signalling pathways involved in chondrocytes during hyperosmotic conditions. (oral presentation)
41st Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), Rostock, Germany, 17-20 May 2006
10. **Rácz B**, Reglődi D, Fodor B, Gasz B, Benkő L, Ferencz A, Tamás A, Jr. Gallyas F, Róth E, Borsiczky B. PACAP increases chondrocyte survival through acting on apoptosis signalling pathways. (poster)
31th FEBS Congress, Istanbul, Turkey, 24-29 June 2006.

11. **Rácz B**, Gasz B, Gallyas F Jr., Tamás A, Lubics A, Kiss P, Róth E, Tóth G, Hegyi O, Wittmann I, D Reglődi. Effects of PACAP in oxidative stress-induced damage in endothelial cells. (poster)
23rd Conference of European Comparative Endocrinologist, Manchester, England, August 29-September 2 2006.
12. **Rácz B**, Gallyas F Jr., Gasz B, Tamás A, Lubics A, Kiss P, Róth E, Tóth G, Lengvári I, Hegyi O, Wittmann I, Reglődi D. A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid hatása az endothel sejtek túlélésében. (poster)
XI. MITT Konferencia, Szeged, 2007. január 24-27.
13. **Rácz B**, Gasz B, Gallyas F Jr., Kiss P, A Tamás, Józsa R, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Róth E, Reglődi D. Common anti-apoptotic mechanism in the neuro- and cardioprotective effects of PACAP. (poster)
III. Neurotoxicity Society Meeting, Pucon, Chile, 23-29 March 2007.

Cumulative impact factor: 61,893

Impact factor of publications: 35,016

Impact factor of publications related to the thesis: 15,439

All citation: 26

Cited by others: 10