

A PACAP központi idegrendszeri hatásainak vizsgálata tömegspektrometriás módszerekkel

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Maász Gábor

Témavezetők: Dr. Márk László, Prof. Reglődi Dóra

Doktori Iskola és programvezető: Prof. Sümegi Balázs



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Pécs, 2014.

Bevezetés

A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptidet (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide; PACAP) 1989-ben izolálták először birka hipotalamuszból, nevét a hipofízisben kifejtett adenilát cikláz enzim aktiváló hatásáról kapta. Az emlős szervezetben előforduló PACAP közel 90%-át a 38 aminosavból felépülő PACAP38 forma teszi ki, míg a 27 aminosavas forma csak kisebb mennyiségben van jelen. A PACAP a központi idegrendszerben legnagyobb mennyiségben a hipotalamuszban mutatható ki, de több agyrégióban is találhatóak PACAP tartalmú sejtek. Az is jól ismert, hogy a PACAP része a celluláris védelmi rendszernek. Mind az exogén, mind az endogén PACAP neuroprotektív hatást fejt ki. Citoprotektív hatásait egy összetett mechanizmus segítségével éri el: antiapoptotikus, antioxidáns és antiinflammatorikus hatása is van. Az apoptózis során gátolja a proapoptotikus faktorokat, míg serkenti az antiapoptotikus folyamatokat, többek között. Számos sejtvonalon (PC12, szemcsesej, kolinerg neuron, hátsó gyöki ganglionsej) leírták antiapoptotikus és sejttúlélést elősegítő hatásait. Védő hatásáról beszámoltak glutamát toxicitással szemben retina sejtekben beta-amiloid protein, 6-hidroxi-dopamin (6-OHDA), in vitro hipoxia és emelkedett Ca^{2+} szint okozta sejtkárosodással szemben is.

A vizsgálatokhoz használt PACAP KO egérpopuláció egyedein már fiatal korban is az öregedés jelei mutatkoznak, valamint növekedett érzékenységet mutatnak a külső stressz hatásokkal szemben. Néhány lehetséges biokémiai folyamatot leírtak, amelyek ezen jelenségek hátterében állhatnak, azonban nagyon keveset lehet tudni a folyamatok átfogó molekuláris hátteréről. Ennek a felderítésnek első lépése a kvalitatív és kvantitatív fehérjeösszetétel, illetve a folyamatban szerepet játszó fehérjeváltozások meghatározása. PACAP-hiányos egerekben ilyen jellegű vizsgálatokat még egyáltalán nem végeztek, ezért elvégeztük a vad típusú és a PACAP knockout egerek különböző agyterületeinek proteomikai profiljának feltérképezését és a közöttük létező kvantitatív különbségek felderítését és magyarázatát. Gél-elválasztáson alapuló MALDI TOF/TOF nagy áteresztőképességű rendszeren végeztük vizsgálatainkat. A molekuláris fehérje-összetétel vizsgálatán túl kíváncsiak voltunk a fehérjék lokális eloszlására is. Erre a célra kiválóan alkalmas a képkalkító tömegspektrometria, amely manapság még egy elterjedőben lévő technikának számít. A technika kiforratlansága miatt eredményeinket a már rutinszerűen alkalmazott és elfogadott technikának számító LC-MS technikával kívántuk megerősíteni.

A Parkinson-kór egy progresszív jellegű, neurodegeneratív kórkép, melyben a substantia nigra pars compacta területén a dopaminerg neuronok pusztulása és a nigrostriális pályarendszer degenerációja okozza a biokémiai jelátviteli rendszer átviteli zavarait. Munkacsoportunk már korábban is vizsgálta a PACAP hatását gerinces neurodegenerációs modellekben. Megfigyeltük, hogy a neurotoxikus lézió előtt a substantia nigrába beadott PACAP megvédi a dopaminerg sejtek közel 50%-át a substantia nigrában. A PACAP kezelt állatok szignifikánsan jobban teljesítenek a magatartási tesztekben, nem mutatnak súlyos hypoaktivitási jeleket, és az aszimmetrikus tünetek is szignifikánsan gyorsabban javulnak, mint a kontroll csoportban.

Számos modell sikeresen reprodukálja a kór néhány jellemző tünetét. A Parkinson kór kiváltása kísérletes körülmények között lehetséges például az inszekticid rotenon (mely egy mitokondriális toxin) és az oxidatív stressz kiváltására alkalmas 6-OHDA segítségével. Megállapították, hogy az ismételt rotenon kezelés a gerincesek Parkinson-kór tüneteire hasonló tüneteket vált ki a gerinctelenekben. Rotenon kezelés hatására a tirozin-hidroxiláz immunreaktivitása csökken az óriás dopaminerg neuronban (RPeD1), amely az egyik fő

dopamin-termelő sejt a csigák központi idegrendszerében. Ez a megfigyelés megerősíti, hogy a rotenon hat a dopaminerg rendszerre gerinctelen neurodegenerációs modellekben is. A központi idegrendszer dopamin tartalmának csökkenése progresszív és irreverzibilis mozgás és étvágy csökkenést, valamint élettartam rövidülést eredményez. A gerinctelen modellek használhatósága gyakran megkérdőjelezhető, mivel a gerinctelen idegrendszer neuroanatómiája jelentősen eltér a gerinces szervezetektől. Azonban molekuláris és sejt szinten az élettani folyamatokban számos hasonlóság van jelen a gerinctelen és a gerinces idegrendszerekben és a modellek hasonló működést mutatnak. A puhatestű idegrendszerek egyedi eszközt nyújtanak a sejtszintű események farmakológiai vizsgálataihoz, mechanizmusok tanulmányozására különböző viselkedési és betegség vizsgálatokban.

A dopaminerg neuronok pusztulásával jól korrelál a substantia nigra dopaminszint csökkenése, legnagyobb részt e monoamin szint csökkenés áll a tünetek kialakulásának hátterében. A dopamin a központi idegrendszer egyik legszélesebb eloszlást mutató és legszélesebb körben tanulmányozott neurotranszmittere, az összes jelentős állattörzset figyelembe véve. A másik jelentős monoamin a központi idegrendszerben a szerotonin (5HT). A puhatestűek idegrendszerében és a szívizomzatában is a dopamin és a szerotonin a legnagyobb mennyiségben jelen lévő monoaminok, koncentrációjuk pár μg -tól 30-40 $\mu\text{g}/\text{gramm}$ nedves szövet koncentrációig terjed. Újabban az a feltételezés is beigazolódni látszik, hogy a szerotonin közvetítette neurotranszmisszió is megváltozik Parkinson-kórban és feltételezik, hogy a különböző szerotonin receptor altípusoknak is szerepe lehet a betegség manifesztációjában.

Célkitűzések

- Első lépésben a PACAP KO és PACAP gént tartalmazó egerek agyi fehérje összetétel vizsgálatát kívántuk elvégezni SDS PAGE-n alapuló MALDI TOF/TOF tömegspektrometriás fehérje azonosítással.
- Célul tűztük ki, hogy a detektálható fehérje összetételbeli különbségeket figyelembe véve további PACAP-hoz köthető hatásmechanizmusokat keressünk.
- Célunk volt továbbá a fehérjék lokalizációját összehasonlítani a PACAP gént tartalmazó és a nem tartalmazó csoportok között.
- Kíváncsiak voltunk arra, hogy a PACAP-hoz köthető neuroprotektív hatások az evolúciós fejlődés során konzervált hatásként megfigyelhetőek-e, ezért az összehasonlításhoz gerinctelen modellállatként nagy mocsári csigát (*Lymnaea stagnalis*), míg gerinces modellállatként Wistar patkányt alkalmaztunk
- Célul tűztük ki annak a vizsgálatát, hogy a PACAP hatással van-e a gerinces és gerinctelen szervezetekben a központi idegrendszer monoamin (DA, 5HT) szintjének változására.
- Vizsgálni kívántuk a Parkinson-kór kialakulása során milyen fehérje szintű változások vannak jelen a központi idegrendszerben.
- Végezetül, vizsgálatokat terveztünk annak kiderítésére, hogy a PACAP vajon hatással van-e a dopamin metabolizmusára? Ez utóbbi kísérletet a dopamin metabolizálását végző enzimek (COMT, MAO-B) Western-blot technikával történő vizsgálatával végeztük a különböző mitokondriális toxinokkal kiváltott neurodegenerációs (Parkinson-kór) modellekben.

Vizsgálati módszerek

Agyi fehérje összetétel vizsgálata

Az agyi fehérjeprofili meghatározásához vad típusú (PACAP^{+/+}, n=5) és homozigóta KO (PACAP^{-/-}, n=5) egeret használtunk fel. A vad típusú és a PACAP KO állatok agyát isoflurán anesztéziában távolítottuk el. Az agymintákból a következő 5 régiót preparáltuk ki: frontális kortikális régió, temporális lebeny–dienkefalon komplex, mezenkefalon, híd-nyúltvelő komplex, valamint kisagy. Az agymintákat szöveti homogenizátorral homogenizáltuk, majd sejtfeltárást végeztünk nagy energiájú ultrahangos feltárással. A feltárt mintákat centrifugáltuk. A tiszta felülúszókat új csöbe pipettáztuk át, majd -30°C-os kloroformot adtunk a mintákhoz. A kloroformot a fehérjék kicsapáshoz, ill. a nagy mennyiségben jelenlévő lipidek eltávolítására alkalmaztuk. A lipidek eltávolítása szükséges volt a majdani tömegspektrometriás ionizálás javítására. A kloroformos kétfázisú rendszert néhány másodpercig nagy sebességgel kevertettük egy emulziós rendszer eléréséig, hogy megfelelő érintkezési határfelület alakuljon ki a kellő minőségű fehérjekicsapás eléréséhez. Kloroform és fehérje mentesítettük az oldatokat.

Az Agilent 2200 TapeStation rendszerhez tartozó mintafeldolgozási protokollt követtük a teljes vizsgálat során. A vezérlést és a szemikvantitatív kiértékelést a 2200 TapeStation rendszerhez tartozó szoftverrel végeztük el.

Az egy- és kétdimenziós SDS-gélelektroforézis fehérje elválasztáshoz a mintákat homogenizáltuk, (első dimenzióként rehidratált IPG csíkon elvégeztük az izoelektromos fókuszálását) majd poliakrilamid gélben Laemmli módszere szerint SDS jelenlétében gélelektroforézist (PAGE) végeztünk. Molekulasúly standardként ProSieveTM QadColorTM fehérjemarkert alkalmaztunk 4,6–300 kDa közötti tartományban. A gélek festéséhez R-250 Coomassie Brilliant Blue oldatot használtunk. A géleket PharosFXTM kép szkennel segítségével rögzítettük és Quantity One, PDQuestTM 2-D analízis szoftverrel elemeztük. Az érdekes fehérjesávokat szikepengével kimetszettük a gélből, a fehérjéket DDT-vel redukáltuk, majd ezt követően jódecetamid oldattal alkiláltuk. A fehérjéket módosított tripszinnel megemésztettük. A keletkezett triptikus peptideket liofilizáltuk, majd MALDI TOF/TOF tömegspektrométerrel (Autoflex Speed-Bruker) fehérjeazonosítást hajtottunk végre. A visszaoldott, emésztett fehérjemintákhoz hígított CHCA mátrix oldatot adtunk. A visszazonosításhoz reflektrom módban PMF-t végeztünk, valamint LID, illetve CID fragmentációt hajtottunk végre. A műszer irányítását FlexControl 3.4 szoftverrel végeztük. A fehérjéket PMF módszerrel, az egyszeres pozitív töltésű ionok Swiss-Prot és NCBI adatbázisokban történő keresésével végeztük. A kereséseket MASCOT és Bruker Protein Scape szerverek segítségével végeztük. A PMF alapján beazonosított lehetséges fehérjéket LID és CID fragmentációval igazoltuk. A felhasznált azonosított triptikus peptidek közül fehérjénként minden esetben minimum háromnak azonosítottuk a szekvenciáját. Ezzel igazoltuk a fehérje tényleges jelenlétét.

Lokális agyi fehérje eloszlás vizsgálata IMS felhasználásával

A lokális agyi fehérje eloszlás vizsgálatához vad típusú (PACAP+/+, n=3) és homozigóta KO (PACAP-/-, n=3) egereket használtuk fel. Az állatokat fiziológiás sóoldattal perfundáltuk, hogy a vérmaradványok ne zavarják a tömegspektrometriás analízist. A metszés során parallel 12 mikrométer vastag metszeteket készítettünk a vad típusú és a PACAP-hiányos állatokból, melyeket „ITO coated” (Indium-titan-oxid) tárgylemezekre vettünk fel. Nissl festéssel ellenőriztük a megfelelő agyi sík elérését. A kéreg, hippocampus és hipotalamusz metszetből vettük fel mintáinkat és ezt a metszetet használtuk a lokális fehérje-változások megállapításához. Etanol mosással eltávolítottuk az ionizációt negatívan befolyásoló és nagymennyiségben jelen lévő lipideket. Az ITO lemezre felvett metszetet háromszor 30 másodpercig áztattuk, majd vákumban gondosan megszárítottunk. Következő lépésben a metszetek CHCA mátrixszal fedtük be, ami a molekuláris deszorpciót és ionizációt segíti elő. A mátrix felvitelére egy, az intézetünkben fejlesztett automatizált mátrixfelvivő berendezést használtunk. A mérést Bruker Daltonics Autoflex Speed tömegspektrométerrel végeztük. Méréseinket pozitív módú ionizációval végeztük, 5000-25000 Da mérési tartományban. A műszer irányítását Bruker Flex Control 3.4 szoftverrel végeztük, míg az adatok kiértékeléséhez és a mérési terület kijelöléséhez Bruker Flex Imaging 3.0 szoftvert használtunk. ClinPro Tools 3.1 szoftver segítségével különböző statisztikai kiértékelést végeztünk, ezzel ellenőriztük a különbségnek vélt adatok megbízhatóságát.

Megerősítő fehérje azonosítást végeztünk egydimenziós SDS PAGE-re épülő nanoLC-MS méréssel. A mintákat nanoLC-MS módszerrel analizáltuk: nanoACQUITY UPLC kromatográfias készüléket kapcsolunk nagy érzékenységű CaptiveSpray nanoESI ionforrással felszerelt Maxis 4G UHR-Q-TOF tömegspektrométerhez. A mintákat 1,7 μm szemcseátmérőjű BEH130 C18 analitikai oszlopon (100 μm x 100 mm) választottuk szét. A triptikus peptideket pozitív ion módban DDA fragmentálási mód használatával szekvenáltuk. A peptideket 200-2200 Da közötti tartományban detektáltuk. A készülékek irányítását Hystar (3.2 verzió) és TrapControl (7.1 verzió) szoftvereket használtunk. A mérések kiértékelését DataAnalysis (4.1 verzió) szoftverrel végeztük, a fehérjeazonosításhoz szükséges kereséseket MASCOT és Bruker Protein Scape szerverek segítségével végeztük.

Parkinson kór modell

Kísérleti állatként a gerinctelen modellben nagy mocsári csigát (*Lymnaea stagnalis*) használtunk. Az állatokat szűrt Balaton-vízzel (18-20 °C) töltött nagy tárolótartályokban tartottuk csoportonként. A kísérletekhez 3-4 hónapnál nem idősebb, fiatalnak számító csigákat használtunk. A csigákat négy csoportra osztottuk, mindegyik csoport 10-10 állatot tartalmazott. Az első csoportban lévő csigákat szűrt Balaton vízben tartottuk és nem injektáltuk semmivel (kontroll csoport). A második csoportban olyan csigák voltak, amelyeket 10 μg PACAP38-val injektáltunk és szűrt Balaton vízben tartottunk (PACAP-csoport). A harmadik csoportban lévő csigákat fiziológiás só oldattal injektáltunk és rotenont tartalmazó tartályban tartottuk (rotenon csoport). A negyedik csoportban a csigákat PACAP38-val injektáltunk és rotenont tartalmazó tartályban tartottuk (rotenon+PACAP csoport). A monoamin vizsgálatokhoz csoportonként 32-32 állatot használtunk, amelyek 5 napos kezelést kaptak (kontroll, rotenon és rotenon+PACAP csoport).

A gerinces modellben Wistar-patkányt használtunk kísérleti állatként. Az állatok (n=24) bal substantia nigráját aszkorbinsav tartalmú 6-OHDA-nal roncsoltuk. A sztereotaxiás műtét ideje alatt az altatáshoz intraperitonealisan beadott pentobarbitált használtunk. A PACAP kezelés során a patkányok (n=7) PACAP-38-at kaptak a 6-OHDA-os roncsolás előtt. A PACAP-ot fiziológias sóoldatban oldottuk fel, és Hamilton fecskendő segítségével juttattuk be a substantia nigrába. A kontrollként használt állatok (n=4) fiziológias sóoldatot kaptak, az ugyanolyan feltételek és behatások modellezése érdekében.

A csiga minták esetében a teljes idegrendszer került preparálásra, míg a patkány minták esetében a substantia nigrát távolítottuk el. Dopamin és szerotonin extrakciót hajtottunk végre DTT-t tartalmazó hangyasavas acetonitril oldatban. A szövetet homogenizáltuk, majd nagy energiájú ultrahangos feltárást végeztünk. Ülepítés után a tiszta felülúszókat új mikrocentrifugacsőbe vittük át, a teljes oldószer mennyiséget eltávolítottuk, majd a visszaoldott extraktumot autosampler mintatartó üvegekbe vittük át és monoamin-szint meghatározást hajtottunk végre HPLC-MS rendszerrel. A HPLC-MS analízist egy kvaterner pumpával, gázmentesítő egységgel, UV detektorral és oszlop termosztáttal felszerelt komplex Ultimate 3000 mikro HPLC rendszerhez kapcsolt orbitrap analizátoros Q Exactive tömegspektrométerrel végeztük. A HPLC-s elválasztáshoz Kinetex PFP (100 mm x 2,1 mm i.d. szemcseméret 2,6 μm) oszlopot használtunk. A tömegspektrométert HESI ionforással szerelve használtuk, irányítását, az adatgyűjtést és az eredmények kiértékelését Xcalibur 2.2 SP1.48 és Tune 2.1 szoftverekkel végeztük. A kellő érzékenység eléréséhez SIM módú mérést alkalmaztunk, míg a szerkezet igazoláshoz fragmentálási mérési módszert (MS/MS mód) használtunk. A mennyiségi meghatározáshoz és a szerkezet igazoláshoz a következő tranzíciós átmeneteket használtunk: Da esetében 154,08 $[\text{M}+\text{H}^+] \rightarrow 137,06 [\text{F}+\text{H}^+] \text{ m/z}$, szerotonin estében 177,10 $[\text{M}+\text{H}^+] \rightarrow 160,08 [\text{F}+\text{H}^+] \text{ m/z}$.

A statisztikai elemzésekhez IBM SPSS Statistics- 20. verzió szoftvert használtunk. Az adatsorok normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel, a csoportok szórásának egyenlőséget pedig Levene teszttel vizsgáltuk. Egy-utas ANOVA teszttel és Scheffé és Tukey vagy Tamhane post hoc teszttel vizsgáltuk a csoportok átlagának eltérését.

A Western blot vizsgálatokat párhuzamosan csiga és patkány mintákon is elvégeztük. Három antitestet alkalmaztunk anti-MAO B antitestet, anti-COMT antitestet és a módszerellenőrzésre szolgáló anti-Aktin antitestet. A csiga minták esetén anti-aktin, anti-COMT és anti-MAO-B antitestekkel dolgoztunk, MAO-B enzimet nem tudtunk detektálni, ezért a továbbiakban a COMT enzimre fókuszáltunk. Az eredmények denzitometriás kiértékeléséhez Fiji Image J szoftvert használtunk.

Proteomikai elemzést végeztünk egydimenziós SDS PAGE-re épülő nanoLC-MS méréssel. nanoACQUITY UPLC kromatográfiás készüléket kapcsoltunk nagy érzékenységgű CaptiveSpray nanoESI ionforrással felszerelt Amazon SL ioncsapda tömegspektrométerhez. Az azonosított proteomikai különbséget „Szendvics” ELISA méréssel erősítettük meg. A méréshez speciális PARK7/DJ-1 DuoSet ELISA Kittet alkalmaztunk. A kialakult pozitív színreakciót adó immunkomplexeket optikai denzitometriás vizsgálattal elemeztük. Mikroplate leolvasóval 450 nm-n analizáltuk a mintákat. Korrekciós hullámhosszként 550 nm-n végeztünk leolvasását, hogy a mintatartótálca felületi egyenlőtlenségeiből származó hibákat kiküszöböljük.

Eredmények

Agyi fehérje összetétel vizsgálata

A különböző agyrégiók (frontális lebeny régió, temporális lebeny–diencephalon komplex, mezenkefalon, híd-nyúltvelő komplex, valamint kisagy) proteomikai profiljának felállításához kezdetben az Agilent 2200 TapeStation egy dimenziós automata gél futtató rendszert használtuk. Ezen rendszer alkalmas egy gyors, szemikvantitatív mérés elvégzésére, de korlátozott felbontással rendelkezik. Ezen elektroferogramok kiértékelésével tudtunk szemikvantitatív következtetéseket levonni és kiválasztani az érdekes és jelentős különbségeket mutató agyrégiókat. Találtunk két olyan agyrégiót, amelyekben jelentős fehérje összetételbeli különbséget sikerült detektálnunk a két populáció összehasonlítása során, ezek voltak a mezenkefalon és a temporális lebeny-diencephalon komplex.

Az Agilent rendszer előnyeit kihasználva képesek voltunk egy gyors, egyszerű minta-előkészítést igénylő analízis elvégzésére, amely során ki tudtuk választani a nagy különbségeket mutató régiókat. Azonban a pontos fehérjeösszetétel megállapításához a rendszer limitált spektrális felbontása miatt a későbbiekben a hagyományos egydimenziós SDS-PAGE elválasztást alkalmaztuk. A mezenkefalon régióknál a fő különbségek 40-70 kDa közötti mérettartományban jelentkeztek. Ebben a tartományban nyolc fehérje (kb. 39, 40, 45, 47, 50, 55, 60, 70 kDa) mutatott intenzitásbeli különbséget a két populáció között. A temporális lebeny-diencephalon komplex esetében 35-55 kDa között találtunk hat olyan fehérjét (kb. 35, 36, 37, 40, 47, 55 kDa), amely jelentős intenzitásbeli eltérést mutatott. A jelentős eltéréseket mutató fehérjefoltokat a gélből való kivágás után tripszines emésztésnek tettük ki és tömegspektrometriás analízissel fehérjeazonosítást végeztünk. A fehérjeazonosítás során több olyan fehérjefoltot is találtunk, amelyből egyes fehérjék visszaazonosíthatók voltak, ezért a pontos minőségi és mennyiségi viszonyok felállításához szükséges volt a kétdimenziós elválasztás elvégzése.

A kétdimenziós fehérje elválasztás lehetővé tette a fehérjék izoelektromos pontja szerinti elválasztást 3-10 pH tartományban az első elválasztási dimenzióban, míg a molekulatömeg szerinti szeparálást 4,6 és 300 kDa tartományban a második elválasztási dimenzióban. Mindkét agyi régió esetében a két populációból készült kétdimenziós géleket pontosan egymásra vetítettük és a különbséget mutató fehérjék kivágását, tripszines emésztését és tömegspektrometriás analízisét is elvégeztük. A tömegspektrometriás fehérje azonosítás során 22 olyan fehérjét azonosítottunk, amelyek egyértelmű minőségbeli és mennyiségbeli különbséget mutattak a két vizsgált populáció között. +A knockout mintákban a 22 azonosított fehérjénél 14 esetben találtunk kisebb koncentrációt a vad típusú populációhoz képest (peptidilprolil izomeráz A, glutation S-transzferáz, malát dehidrogenáz 1, enoláz 2, aldoláz 1, aszpartát aminosztransferáz, leucin-gazdag ismétlődéseket tartalmazó 9 izoforma, foszfoglicerát mutáz 1, piruvát kináz, akonitáz-2, hemoglobin béta-1 alegység, albumin 1, hiszton (H1) domén, szekretin receptor). Négy fehérje esetében (citokrom c oxidáz, gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz, microphthalmia-asszociált transzkripció faktor, neurofaszcin) nem találtunk jelentős különbséget a két populáció között. Négy olyan fehérjét is találtunk (ATP szintáz, tubb2 fehérje–tubulin béta-2 lánc, spektrin alfa lánc, vinculin), amelyek nagyobb koncentrációban voltak jelen a knockout populációban a vad típusúhoz képest.

Lokális agyi fehérje eloszlás vizsgálata -IMS felhasználásával

A képzési vizsgálataink során Autoflex Speed MALDI TOF/TOF tömegspektrométert használtunk méréseinkhez. A három lépcsős mátrixfelviteli eljárásra a következők miatt van szükség: a metszeten egy kellően homogén mátrixréteget kell létrehozni, mert ha ez a réteg nem kielégítően homogén, a felületi egyenlőtlenségek miatt lehetetlenné válik az ionizált molekulák pontos tömegmeghatározása, valamint nem biztosított az egységes szöveti extrakció. Az inkubációs periódus a mátrixfelviteli eljárás egyik kulcslépése, ugyanis ebben a szakaszban történik a fehérjemolekulák extrakciója: a szövetfelületből a felvitt mátrixcseppekbe való átdiffundálása. A harmadik, nitrogénes szárítási periódusban az immáron extrahált molekulákat is tartalmazó mátrixcseppek szárazra párolása történik. Meghatározó lépés lehet ez is, ugyanis a következő mátrix felviteli periódus előtt a cseppméretek minimalizálása szükséges, mert a megfelelő térbeli felbontás eléréséhez különálló minimális méretű cseppek előállítására szükséges, nem engedhetjük meg a cseppek összefolyását. Ha bármely lépés a három közül nem kellően precíz, nem teljesül a cseppek különálló homogén felvitele és a térbeli felbontásunk romlani fog. Több mátrixfajtát kipróbáltunk méréseinkhez, a CHCA mátrix bizonyult a legmegfelelőbbnek fehérje mérésekhez, ezért a továbbiakban ezt a mátrixtípust használtuk. Méréseinket 5 000 - 25 000 Da között végeztük, a kriosztáttal történt paralell metszés során egy speciális ITO tárgylemezre metszettünk PACAP knockout és vad típusú agymetszetet, amely azonos síkból származtak, ezzel biztosítottuk, hogy metszeteink azonos anatómiai struktúrákat tartalmazzanak. Ezt sztereotaxiás atlasz és Nissl festéssel történt mikroszkópos vizsgálattal erősítettük meg.

A mérési eredményeket vizsgálva elmondhatjuk, hogy csak kismértékű morfológiai eltéréseket figyeltünk meg, azonban néhány fehérje esetében találtunk különbséget. A legjelentősebb eredményünk, amelyhez biológiai jelentőséget is tudtunk kapcsolni a béta-szinuklein fehérje lokális eloszlásában és mennyiségében jelentkezett. A vad típusú mintában jóval kiterjedtebb a fehérje jelenléte a knockout mintához képest. A fehérje tényleges igazolásához a jelen agyi síkból fehérje extrakciót végeztünk és gélelektroforézis elválasztást követő nanoLC-MS fehérje azonosítást végeztünk a párhuzamos mintákból. A fehérje azonosítás során összesen 37 fehérjét azonosítottuk vissza, amely az elfogadási feltételt (Mascot Score ≥ 80) meghaladó keresési biztonsággal rendelkezik, köztük a beta-szinukleint 14 043 Da molekulatömeggel, amely jól korrelál az IMS során mért molekulatömeggel. A béta-szinukleint csak a vad típusú mintákból sikerült visszaazonosítanunk, a knockout mintákban detektálási limit alatti koncentrációban lehet jelen. A másik fontos fehérje, az alfa-szinuklein 14 476 Da molekulatömeggel. Ezt a fehérjét mindkét populáció mintáiból visszaazonosítottuk, a fehérjét alkotó három triptikus peptid nagyságrendileg azonos intenzitással és görbe alatti területtel rendelkeztek, ebből arra következtetünk, hogy nagyságrendileg azonos koncentrációban voltak jelen.

Parkinson kór modell

Monoaminok analitikai meghatározása

A kvantitatív meghatározáshoz 5 pontos kalibrációs görbét használtunk, dopamin esetében 56; 111; 556; 834; 1112 pmol/ml koncentrációjú standard oldatokat és 122; 305; 610; 1200; 2100 pmol/ml koncentrációjú szerotonin standard oldatokat. A kalibrációs görbe illeszkedése a kalibrációs pontokra 99,56-99,89 % (r^2) között volt MS és MSMS módban is. Módszerünk kimutatási határa 2,9 pmol/ml (LOD), mennyiségi meghatározási határ 5,8 pmol/ml (LOQ) volt dopamin esetében, szerotoninra 6,2 és 9,4 pmol/ml-s értékeket mértünk. A monoaminok meghatározását MS módban mért pontos molekulatömeg, valamint az irodalmi fragmentációs átmenettel megegyező fragmens molekulatömegazonosításával végeztük el. A mérési eredmények kvantitálását ellenőrzésképpen párhuzamosan MS és MSMS módban is elvégeztük. A dopamint 1,94 perces retenciós idővel, az anyai protonált formájában $[M+H]^+$ azonosítottuk 154,09 m/z értéknél, a protonált formájú fragmens ionját $[F+H]^+$ 137,06 m/z értéknél. A szerotonint 3,9 perces retenciós idővel, 177,10 m/z protonált anyai tömeggel $[M+H]^+$ és 166,8 m/z protonált fragmens ion $[F+H]^+$ tömeggel azonosítottuk. Ezek az adatok alapulnak a további monoamin koncentráció meghatározások mind a gerinctelen, mind a gerinces modellben.

*Gerinctelen modell – *Lymnaea stagnalis**

A PACAP neuroprotektív hatásait vizsgáltuk rotenon indukálta gerinctelen Parkinson modellben. A csigákat 0,5 μ M rotenonnal kezeltük, az egyik csoportot 10 μ g PACAP38-al injektáltuk, amely 100 μ l fiziológiás só oldatban volt feloldva, a kezelést 12 napon keresztül végeztük. A kezelést túlélő csigák kontroll csoportonként (PACAP nem injektált és PACAP injektált) 10 db és 9 db volt. A fiziológiás sóoldat injektált rotenon tartalmú vízben tartott csigák az 5. napon kezdtek elpusztulni és a 12. napra az összes csiga elpusztult. Bár a rotenon kezelt és PACAP injektált csigák a kezelés korábbi szakaszában kezdtek elhullani (3-4. nap), azonban jóval több állat élt túl a 12. napra, a populáció 50%-a életben maradt a kezelés befejeztére.

A következő kísérletben az átlagos monoamin koncentrációkat határoztuk meg a kontroll állatok teljes központi idegrendszerében HPLC-MS rendszerrel, amely 3,33 \pm 0,76 μ g/g szövet (DA) és 9,87 \pm 1,87 μ g/g szövet (5HT) volt. A rotenon csoportban megfigyeltük a dopamin szint 44,7 \pm 12,15 %-os csökkenését (n=28). Ezzel szemben a rotenon+PACAP csoportban a csökkenés szignifikánsan alacsonyabb volt (26,5 \pm 11,5 %, n=30), amely újra a neuroprotektív hatás megfigyelésére utal. Ellenben a szerotonin tartalom a rotenon+PACAP csoportban tovább csökkent a rotenon csoporthoz képest. A rotenon csoportban a teljes idegrendszer tartalma 35,5 \pm 9,70 %-kal csökkent (n=28), míg a PACAP injektált csoportban 49,9 \pm 8,60 %-ra csökkent (n=30). Látszólag a PACAP ellenkezőleg befolyásolja a dopamin és a szerotonin tartalmat a csiga idegrendszerben.

Western blot kísérletekben vizsgáltuk a metabolizáló enzim (COMT) mennyiségét a kontroll, rotenon és rotenon+PACAP csoportokban. A másik fontos monoamin metabolizáló enzimet, a MAO-B-t vizsgáltuk, de nem tudtuk azonosítani a mérések során. Az irodalomban jól ismert, hogy a gerinctelen idegrendszerekben nem található meg ez az enzim, azonban ezzel ellentétes adatok is egyaránt megtalálhatóak. Az elfogadott legújabb álláspont, ha az enzim jelen is van, csak nagyon kis szerepe lehet a metabolizmusban. Mivel mi sem tudtuk az enzimet azonosítani, ezért a vizsgálatok során a COMT enzimre fókuszáltunk. Az összfehérje tartalom egyenlőségét anti-aktin antitesttel ellenőriztük a nyers extraktumon (40kDa). A

COMT enzim szint a kezelésektől (rotenon és rotenon+PACAP) függőnek bizonyult. Pozitív immunreakciót mutató sávokat figyeltünk meg 23 és 26 kDa-nál, amely eredmények jól korrelálnak a gyártó által megadott adatokkal. A 23 kDa-s csúcs reprezentálja a szolubilis COMT enzimet (S-COMT) a 26 kDa-s a membrán kötött COMT (MB-COMT) enzimet mutatja. A denzitometriás kiértékelés szignifikáns különbséget mutatott a szolubilis COMT enzim mennyiségében, ez az enzim módosulat a rotenon és a rotenon+PACAP csoportokhoz képest a kontroll csoportban volt jelen nagyobb mennyiségben (normális eloszlású, egymintás t teszt, $p < 0,001$). A membrán kötött COMT enzimforma a rotenon csoportban szignifikánsan nagyobb mennyiségben volt jelen mind a kontroll, mind a rotenon+PACAP csoporthoz képest (normális eloszlású, egymintás t teszt, $p < 0,001$). Ezek a tapasztalatok megerősítik a rotenon hatását a dopamin metabolizmusára.

Gerinces modell – patkány

Első lépésként a 6-hydroxi-dopamin toxin használatával a dopamin hiány kialakulásának időfüggését vizsgáltuk meg. Műtét után 1, 3, 7, 9, 12, 14, 16 nappal kerültek az állatok feldolgozásra, azonnal kipreparáltuk a vizsgált agyrégiót (substantia nigra). Mintafeldolgozás után LC-MS vizsgálattal megállapítottuk az agyi régiók dopamin koncentrációját. A műtét és a toxin sajátsága miatt (féloldali lézió) azonos állatból származó kontroll mintával is rendelkezünk (jobb oldali félteke). A baloldali félteke dopamin koncentrációját hasonlítottuk össze a jobb oldali kontroll félteke dopamin koncentrációjával, megállapítottuk a féltekék közti dopaminszint különbséget. A dopaminszint drasztikus mértékű csökkenését (~ 50 %) a műtét utáni 7. napon feldolgozott mintákon figyeltük meg a kezdeti ~ 10 %-os csökkenéshez képest (1-3 nap), a dopamin szint további csökkenését nem tapasztaltuk a 7-16 nap között, ezért a műtét után a hetedik napra a Parkinson-kórra jellemző dopaminszint csökkenést teljes mértékben kialakulnak tekintettük. Ezért a továbbiakban a PACAP hatását - a felállított időfüggő vizsgálatok eredményeit felhasználva – a 7 napos állatokon vizsgáltuk (műtét után 7. napon távolítottuk el a substantia nigra-t). Elvégeztük a kontroll csoport (álműtött) substantia nigra régiók átlagos monoamin koncentrációinak meghatározását, dopamin $4,24 \pm 0,7$ $\mu\text{g/g}$ szövet ($n=4$), szerotonin esetén $3,53 \pm 0,45$ $\mu\text{g/g}$ ($n=4$) szöveti koncentrációt mértünk. A 6-OHDA injektált csoportban a dopamin tartalom $51,3 \pm 4,65$ %-ra való csökkenését figyeltük meg ($n=6$), míg a 6-OHDA+ PACAP injektált csoportban szignifikánsan alacsonyabb csökkenést ($26,1 \pm 4,31$ %, $n=7$) tapasztaltunk. A substantia nigra szerotonin tartalma a 6-OHDA injektált csoportban $40,4 \pm 4,77$ %-ra csökkent ($n=6$), míg a 6-OHDA+PACAP csoporté $57,6 \pm 9,70$ %-kal csökkent ($n=30$). Ezen adatok arra engednek következtetni, hogy a PACAP kompenzálja a Parkinson kórban fellépő dopamin hiányt és a monoamin szinteket hasonlóan befolyásolja mind a gerinces, mind a gerinctelen szervezetekben.

A dopamin metabolizmusában szerepet játszó két metabolizáló enzim Western blot mérését is elvégeztük. Az egységes mintafelvitel biztosításához első lépésben fehérjekoncentráció mérést végeztünk, majd aktin koncentrációra pontosítottuk a felvitt minták mennyiségét, 40 kDa-nál figyeltük meg az aktin antitest-antigén komplex. A MAO B antigén-antitest komplex 55 kDa-nál jelentkezett, a COMT antigén-antitest komplex két sávban jelentkezett 23 és 26 kDa-nál (ezek a mólsúlyok a gyári antitest leírásokkal megegyező adatok). A 6-OHDA csoportban szignifikánsan (normal eloszlású, egymintás t test, $p < 0,001$) alacsonyabb értékeket kaptunk a bal oldali agyféltekében, mint a jobb oldaliban, a kontroll és a 6-OHDA+PACAP csoportoknál nem tapasztaltunk különbséget.

Elvégeztük a Parkinson kór kialakulását követő proteomikai vizsgálatainkat is. A substantia nigra homogenizátumon egydimenziós SDS-PAGE futtatásokat végeztünk, minden vizsgálati napon, legkevesebb három alkalommal ismételve. A denzitometrás kiértékelés során fehérje

szintű eltérést nem tapasztaltunk az azonos agyféltekék különböző napos mintái között, vagy az azonos napon történt mintavétellel, de különböző agyféltekéket vizsgálva sem, valamint a különböző csoportok (kontroll, 6-OHDA-, 6-OHDA+PACAP injektált) mintái között sem.

A pontos proteomikai térkép felállításához és a kis különbségek felderítéséhez nanoLC-MS vizsgálatokat végeztünk. Jelentős számú fehérjét azonosítottunk vissza az adatbázis keresésekkel (95 db fehérje), azonban mindösszesen egy jelentős különbséget találtunk a csoportok között. Az SDS-PAGE alapú nanoLC-MS mérés során a PARK7/DJ-1 fehérje mutatott mennyiségi különbséget, de a fehérje a kimutatási határ körüli koncentrációban volt jelen, ezért a pontos változások megállapításához specifikus nagyobb érzékenységgű „szendvics” ELISA mérést végeztünk a csiga és a patkány minták esetében is. Mindkét toxin (6-OHDA, rotenon) hatására a fehérje mennyisége szignifikánsan csökkent. Azonban a PACAP csak a gerinces modell esetében volt képes e csökkenés kivédésére.

Megbeszélés

Agyi fehérje összetétel vizsgálata

Elsőként végeztünk tömegspektrometriára épülő proteomikai elemzést PACAP KO egereken. A vizsgálatokkal a korábbi tanulmányokból ismert és megfigyelt jelenségekre próbáltunk magyarázatot keresni. Megfigyelték, hogy ha a PACAP KO egereket valamilyen káros behatás éri, például hipoxia/ischémia, trauma vagy valamilyen toxikus behatás, nagyobb sérülést szenvednek el, mint az endogén PACAP-ot tartalmazó egerek. Ez bebizonyosodott több kísérletes modellben is, például autoimmun encephalomyelitis, agyi, retina ischémia, és retina excitotoxicitás. Ezenkívül az endogén PACAP-ot nem tartalmazó egerekben csökkent regenerációs képességet figyeltek meg a gerincvelő és perifériás idegek sérülésekor. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a háttérben kell állnia olyan biokémiai változásoknak, amelyek képesek kompenzálni e hatásokat PACAP hiányában, abban az esetben, ha nem éri különösebb stressz hatás az állatokat. Azonban, e kompenzáló hatások nem elegendőek a stressz hatások, sérülések által kiváltott folyamatok kivédésére és a celluláris védelem fenntartására.

Eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP-hiányos egerekben vannak olyan fehérjék, amelyek kisebb, mások pedig nagyobb mennyiségben vannak jelen a KO egerekben. A két egér populáció között olyan fehérjékben találtunk mennyiségi különbségeket, amelyek szerepet játszanak az oxidatív stressz kivédésében és az antioxidáns kapacitás fenntartásában (peptidilprolil izomeráz A, glutation S-transzferáz). E fehérjéknek csökkent szintjét detektáltuk a PACAP knockout egerekben. A Peptidilprolil izomeráz A (PPIase), például kulcsszerepet játszik a hő-sokk fehérjék által indukálta stressz válaszban. A Glutation S-transzferáz fontos a detoxifikációban és a már említett antioxidáns kapacitás fenntartásában. Ezek az eredmények összhangban vannak azon korábbi megfigyelésekkel, amelyek azt mutatták, hogy a PACAP-hiányos egerekben fokozott oxidatív stressz hatásra emelkedett malondialdehyd-, illetve csökkent glutation és szuperoxid-dizmutáz szint figyelhető meg. Továbbá, míg fiatal korban a PACAP knockout és a vad típusú egérpopulációk szérum antioxidáns kapacitása és a szérum reaktív szabadgyök szintje között nem figyelhető meg különbség, idős egerek összehasonlításánál csökkent antioxidáns kapacitást és fokozott reaktív szabadgyök termelődés figyelhető meg a génhiányos állatokban. Egy nemrég készült tanulmányban megvizsgálták a PACAP indukálta változásokat agyi ischémiában. A kutatók

az antioxidáns hatású molekulák szintjének emelkedését figyelték meg PACAP kezelés hatására. Egy korábbi tanulmányban PACAP kezelés alkalmazását követően a hő-sokk fehérje-27 expressziójának emelkedését, míg a neurotoxikus hő-sokk fehérjék expressziójának csökkenését figyelték meg. Ezen proteomikai eredmények részben molekuláris magyarázatot szolgáltathatnak a PACAP-hiányos egerek növekedett sebezhetőségére és az öregedés fokozott mértékére és e során bekövetkezett változások felgyorsulására. Összeségében a fehérjék e csoportját vizsgálva elmondhatjuk, hogy az endogén PACAP egy fontos ágens lehet az oxidatív stressz kivédésére szolgáló mechanizmusok megfelelő működéséhez.

A fehérjék egy másik csoportja, amelyben jelentős különbségeket találtunk a két populáció agyi fehérje összetételében, a glikolitikus enzimek csoportjába tartoznak. Malát-dehidrogenáz 1, enoláz 2, aldoláz 1, foszfoglicerát-mutáz 1 (PGM) és piruvát-kináz (PK) szintjének csökkenését, míg az ATP szintáz szintjének emelkedését figyeltük meg. Hasonlóan az oxidatív stressz markerekhez, a glikolitikus enzimek változásai is összhangban állnak korábbi megfigyelésekkel, hogy az exogén PACAP befolyásolja a glikolízisben szerepet játszó enzimeket és a PACAP kezelés pozitívan hathat az energia homeosztázis fenntartására és védelmet biztosíthat az ischémiás sérülésekben. Ezen eredmények és jelen megfigyeléseink megerősítik, hogy az endogén PACAP szükséges a megfelelő energiaháztartás fenntartásához. Ennek a szabályozási mechanizmusnak hiányában zavar áll fenn az energia egyensúlyban és így sebezhetővé válik a szervezet az ártalmas ingerekre (hipoxia, ischémia, öregedés, toxinok, neurodegeneratív kórképek). Ezek az eredmények összhangban állnak azzal, hogy ennek az enzimikus gépezetnek a stimulálása neuroprotektív hatással van a hipoxia állapotában.

Eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP-hiányos állatokban az ATP-szintáz szint emelkedése egy kompenzációs mechanizmus eredménye lehet, mely a sérült energia egyensúly kompenzálására szolgál intakt vagy stresszmentes körülmények között. Ez korábbi megfigyelésekkel összhangban áll, amelyekben már leírták, hogy ehhez hasonló kompenzáló mechanizmusokat megfigyeltek fiatal knockout egerekben oxidatív stressz kiváltásakor (csökkent reaktív-oxidatív metabolit szintek és emelkedett antioxidáns kapacitás), viszont ezt a mechanizmust időszerű egyedekben nem figyelték meg. Találtunk néhány olyan különbséget a fehérje összetételben, amelyeket strukturális fehérjék és a vérképzésben résztvevő fehérjék okoznak, ezen különbségek pontos értelmezése még további vizsgálatok tárgyát képezi.

A kompenzációs mechanizmusok a PACAP knockout állatok esetében még nem teljesen világosak. Számos kísérletet tettek a PACAP hiányában jelentkező kompenzációs mechanizmusok tisztázására. Az első ilyen jellegű vizsgálatokban nem találtak eltéréseket a monoaminerg neurotranszmitter rendszerben. Azt feltételezték, hogy a kompenzációs mechanizmusok a VIP család egyéb tagjaihoz köthetők, mivel e peptidok állnak legközelebb a PACAP-hoz a szerkezeti homológiát tekintve. Annak ellenére, hogy ez az elméleti lehetőség fennállt, az agyban nem találtak ilyen kompenzáló mechanizmusokat a VIP expresszióját vizsgálva. Ezért még mindig nem ismert, hogy milyen mechanizmus kompenzálja az endogén PACAP hiányát. Legújabb tanulmányok szerint például a kalcium kötő fehérjék is eltérő expressziót mutatnak a belső fülben, ami ugyancsak fokozott védelmet nyújthat káros behatásokkal szemben. Így valószínű, hogy egy összetettebb kompenzációs mechanizmus van jelen, több fehérje is eltérő módon expresszálódik, melynek szerepe lehet a felbomlott energiaháztartás kompenzálásában. Ennek a része lehet az általunk leírt ATP szintáz emelkedés is.

Lokális agyi fehérje eloszlás vizsgálata IMS felhasználásával

A molekulák térbeli eloszlása egy plusz információt hordoz a pontos biológiai mechanizmusok tisztázásában. A képképző tömegspektrometria új, fejlődésben és elterjedésben lévő tömegspektrometriás technikának számít még napjainkban. Az IMS technika egy jelölésmentes mérést tesz lehetővé, azonban a metodikai limitációk miatt csak nagy átgondolás mellett alkalmazható, kiegészítésként pedig szerkezet igazoló és megerősítő vizsgálatok szükségesek. Erre a célra nanoLC-MS méréseket végeztünk.

Méréseink igazolták a PACAP-hiányos állatok mezenkefalon régiójában a béta-szinuklein fehérje csökkent jelenlétét, azonban az alfa-szinuklein fehérje mindkét populációban közel azonos mennyiségben volt megtalálható. A szinuklein fehérje család biológiai szerepe és lokális előfordulása 1988-ban Maroteaux által került publikálásra. Az alfa- és béta-szinuklein fehérjék megjelenését az agykéreg-, hippokampusz-, talamusz-, kiagyi régiókban írták le, a neuronok preszinaptikus oldalán. Azóta több neurodegeneratív betegségben leírták szerepüket, többek között az Alzheimer-kórban és a Parkinson-kórban. A Parkinson-kór kialakulásában és súlyosságának lefolyásában fontos szerepet játszanak a Lewy testek, melyek abnormális fehérje aggregátumok. A béta-szinuklein szerepet játszik a Lewy testeket kialakító alfa-szinuklein aggregációjának gátlásában, ezzel neuroprotektív hatást fejt ki. Korábbi tanulmányokban jól definiált hatásmechanizmust állapítottak meg a béta-szinuklein neuroprotektív hatása hátterében, ezeket rotenon és 6-OHDA indukálta neurodegenerációs modellekben írták le. A béta-szinuklein és az Akt között kialakuló direkt kapcsolat hatására az Akt jelátviteli út emelkedett működését figyelték meg. Ezen megfigyelések jól magyarázzák a neuroprotektív hatás kialakulását. A fenti példákból jól látszik, hogy amennyiben a PACAP hiánya a béta-szinuklein fehérje megjelenését csökkenti, fontos védekező mechanizmusok sérülhetnek, amellyel a neurodegeneratív kórképek kialakulásának esélye nagymértékben növekedhet.

Eredményeinkből a PACAP Parkinson-kórban betöltött lehetséges védőhatására következtetünk, ezért vizsgálatainkat ennek a betegségnek az állatmodelljében folytattuk. Ebben a modellben vizsgáltuk a PACAP KO egereket és megfigyeltük, hogy a tünetek jóval súlyosabban jelentkeztek. Azonban nehezíti az egér modell alkalmazását, hogy a viselkedési vizsgálatok nem megfelelően működtek a modellben, ezért a továbbiakban patkány állatmodellben folytattuk a PACAP Parkinson kórban kifejtett hatásának vizsgálatát.

Parkinson kór modell

Első lépésként elvégeztük a Parkinson-kór kialakulásért felelős substantia nigra dopaminszint csökkenésének vizsgálatát. A kórra jellemző dopamin szint csökkenés teljes kialakulását a vizsgálatok alapján a 3. és 7. nap közötti időpontban figyeltük meg, ez az irodalommal jól korrelál. A továbbiakban a műtét utáni 7. napon vizsgáltuk az állatokat, amikor a dopamin szint csökkenés már betegséget kiváltó szintre csökkent, ezért a PACAP kezelt állatokat is a 7. napon vizsgáltuk. Megfigyeltük, hogy mind a 6-OHDA, mind a rotenon indukálta PD modellben a dopamin és a szerotonin monoaminok szintje szignifikánsan csökkent a kontroll csoportokhoz képest. Azoknál a csoportoknál, amelyek kaptak PACAP kezelést, a PACAP képes volt ellensúlyozni a toxinok károsító hatását a dopaminerg rendszert tekintve, mivel megakadályozta dopamin csökkenést mindkét modell esetében. Ez a megfigyelés magyarázza részben azt, hogy korábbi patkányban végzett tanulmányokban egyes Parkinson kór

modellben jellegzetes magatartásjelek egyáltalán nem voltak megfigyelhetők (pl. hipokinézia) vagy sokkal korábban mutattak javulást PACAP kezelés hatására, mint a kontroll állatok esetében. Ezzel az adattal kiegészítve már teljesebb képet kaphatunk arról, hogy a PACAP neuroprotektív hatása hogyan javítja a tüneteket, hiszen a súlyos dopaminszint csökkenés megakadályozásával csökkenthető az akut klinikai tünetek súlyossága amellet, hogy a krónikus tüneteket is javítja illetve a PACAP neuroprotektív hatása következtében kevesebb sejt pusztul el. Eredményeink így összhangban vannak a korábbi megfigyelésekkel, kiegészítik azokat és további adattal szolgálnak a neuroprotektív hatásmechanizmus megértéséhez neuroprotektív betegségekben

Az agyi szerotonin koncentrációkat vizsgálva elmondhatjuk, hogy a PACAP kezelés hatására nem tapasztaltunk a dopamin szintek vizsgálatánál tapasztaltakhoz hasonló mérsékelt monoamin szinteket. A dopaminerg rendszerhez képest a szerotoninerger rendszer különböző reakciójának oka jelenleg még ismeretlen. A Parkinson-kórban az agyi szerotonin rendszer vizsgálatokban, egyes tanulmányok szerotonin szint csökkenést, mások emelkedést állapítottak meg. A korábbi vizsgálatokban nem állapítható meg egyértelmű változás. Az alfa-szinuklein másik Parkinson-kórban súlyosbító szerepet játszó tulajdonsága, hogy a neurotransmitterként szolgáló dopaminnal és szerotoninnal stabil aggregátumot képez, ezzel is csökkentve a már egyébként is alacsony rendelkezésre álló dopamin és szerotonin szintet. A PACAP kezelés hatására a béta-szinuklein általi szerotonin szint csökkenés mérséklésére számítottunk, azonban az LC-MS mérésekből arra következtetünk, hogy ez a mechanizmus nincs jelen. Valószínűsítjük, hogy a korábban leírt mechanizmussal magyarázható a szerotonin szint csökkenése, miszerint a szerotonin gátló szerepet játszik a dopamin felszabadulásában, ezért a szerotonin szint csökkenés egy kompenzációs mechanizmus lehet a sérült dopaminerg rendszer fenntartásához.

A monoaminok metabolizációjában résztvevő egyik enzimet, a MAO-B-t vizsgáltuk, de a csiga mintákból nem tudtuk azonosítani, csak a patkány mintákból. Egyrészt az irodalomban számos helyen megtalálható, hogy a gerinctelen idegrendszerekben nem található meg ez az enzim, másrészt azonban ezzel ellentétes irodalmak is egyaránt megtalálhatók. Az elfogadott legújabb álláspont az, ha az enzim jelen is van, csak nagyon kis szerepe lehet a metabolizmusban. Mivel mi sem tudtuk az enzimet azonosítani, ezért a vizsgálatok során a COMT enzimre fókuszáltunk. A mindkét fajban megtalálható metabolizáló enzim (COMT) vizsgálatánál hasonló változásokat tapasztaltunk a gerinces és a gerinctelen modellek esetében. A 6-OHDA és rotenon modellekben egyaránt megfigyeltük az S-COMT szint szignifikáns csökkenését, amely PACAP segítségével nem volt visszaállítható. Ellenben, az MB-COMT szintje szignifikánsan növekedett a toxinok hatására, de ez a hatás PACAP alkalmazásával visszafordítható volt. Feltételezzük, hogy az MB-COMT növekedett szintje hozzájárult a toxin csoportokban megfigyelt dopaminszint csökkenéshez. A két enzimforma funkciója között jelentős különbségek vannak: az MB-COMT elsődleges funkciója a dopaminerg neurotranszmisszió gátlása, ezért valószínűsítjük, hogy mind a 6-OHDA patkány, mind rotenon csigamodellekben párhuzamosan megfigyelt MB-COMT enzimváltozások hozzájárulnak a dopaminerg neurotranszmisszió csökkenéséhez. Mivel az agyban a dopaminszintek legfőbb regulatora a COMT enzim és szoros összefüggésben állhat a viselkedési és kognitív folyamatok megjelenésében.

A gerinctelen modellben megfigyeltük, hogy a csak PACAP kezelt csoportban az egyedek elhullása nem különbözött a kezelést nem kapott kontroll állatokétól. A csak rotenon kezelést kapott csigák a 12 napos kezelés végére teljes mértékben elpusztultak, míg a rotenon+PACAP kezelt állatok 50%-a életben maradt. Ez a megfigyelés alátámasztja a PACAP neurodegenerációs modellekben kifejtett neuroprotektív hatását. Ezen kívül megfigyeltük, hogy a 3-8. napig a rotenon+PACAP kezelt állatok nagyobb arányban halnak el, mint a csak

rotenon kezelést kapott csigák. Valószínűsítjük, hogy a rotenon+PACAP kezelés egy krónikus (kisebb mértékű) stressz reakciót vált ki, amely a kezelés első pillanatától kezdve jelen van, ezért folyamatos az egyedek elhullása. Ezzel szemben a rotenon kezelés egy akut választ (nagyobb mértékű) vált ki, amely ellen beindulnak kompenzáló mechanizmusok, de ezek a 8. napra kimerülnek és utána jóval nagyobb stresszként jelentkeznek, ezért az egyedek elhullása felgyorsul.

A nanoLC-MS vizsgálatok során 95 fehérjét azonosítottuk, azonban csak egy fehérje esetében találtunk különbséget a csoportok között, ez a fehérje a PARK7/DJ-1 fehérje volt. A PARK7/DJ-1 fehérje C56 peptidáz fehérjecsalád tagja, az androgén receptor függő transzkripció pozitív regulátora. Redox-érzékeny chaperon fehérjék közé tartozik, valamint oxidatív stressz érzékelő funkciót lát el. Korábbi tanulmányok 3 lehetséges hatásmechanizmust állapítottak meg, amelyekeken keresztül a DJ-1 fehérje neuroprotektív hatást képes kifejteni. Egyrészt a DJ-1 fehérje stabilizálja a NRF2 fehérjét, amely egy transzkripciós faktor és a sejt szintű antioxidás védekező rendszer legfőbb szabályozója és ezáltal az oxidatív stressz általi sejt elhalást meggátolja, ezzel gátolva a Parkinson-kór kialakulását. Másrészt a DJ-1 gátolja a fehérje-asszociált splicing faktort (PSF), amelynek normál esetben transzkripció csendesítő hatása van és ezzel fokozza a neuronális apoptózist. Harmadrészt a mutáns alfa-szinuklein aggregációt gátolja, ezáltal nem tudnak a kór kialakításában nagy szerepet játszó Lewy testek kialakulni.

Az ELISA mérések során a PARK7/DJ-1 fehérje csökkent koncentrációban volt jelen a 6-OHDA és a rotenon kezelt csoportokban a kontroll csoportokhoz képest. A gerinces modellben a kontrollhoz képest a PACAP csoportnál is azonos mennyiségben detektáltuk a PARK7/DJ-1 fehérjét, azonban a gerinctelen modellben ezt a védőhatást nem tapasztaltuk. Feltételezzük, hogy a védőhatás elmaradása az alkalmazott toxinok közti különbségből vagy különböző jelátviteli utak aktiválásából adódott.

Összességében megállapítottuk, hogy a PACAP neurodegenerációs modellekben kifejtett neuroprotektív hatása összefüggésben áll a neurotranszmitter monoamin szintek változásaival. Elmondható, hogy a PACAP hatására olyan evolúciósan konzervált molekuláris és sejtes mechanizmusok indulnak el, amelyek hatására neuroprotektív hatások jelentkeznek. A neurotranszmitter monoaminok és a metabolizáló enzimek szintjén azonos változások figyelhetők meg mind a gerinces, mind a gerinctelen neurodegenerációs modellben, azonban ez a PARK7/DJ-1 fehérjét vizsgálva nem mondható el. Megállapítottuk, hogy a PACAP-PARK7/DJ-1 fehérje jelátviteli kapcsolat csak a gerinces modell esetében vizsgálható. Megállapítottuk, hogy a gerinctelen rotenon modell a neurodegenerációs Parkinson kór néhány tünetét sikeresen modellezi és alternatívát kínál a PACAP védőhatás molekuláris mechanizmusainak tanulmányozására.

Új tudományos eredmények

- Elvégeztük a PACAP gént tartalmazó és az endogén PACAP gént nem tartalmazó egerek agyi fehérjeösszetételének feltérképezését.
- Sikertült néhány olyan fehérjeszintű változást azonosítanunk, amelyek segítségével részben magyarázhatók a PACAP-hiányos egerek növekedett sebezhetősége és az öregedés fokozott mértéke. Ilyenek voltak a glikolitikus enzimek, az antioxidáns kapacitás fenntartásában, valamint az oxidatív stressz elleni védelemben szerepet játszó enzimek. Rámutattunk az esetlegesen fenálló kompenzáló mechanizmusok jelenlétére, mint például az emelkedett ATP szintézis szint.
- MALDI IMS technika segítségével megállapítottuk a béta-szinuklein fehérje csökkent jelenlétét a PACAP KO állatokban, ismertettük a lehetséges PACAP-béta-szinuklein kapcsolat protektív hatásait.
- Megállapítottuk, hogy a gerinctelen állatok esetében használt rotenon indukálta neurodegenerációs modell monoamin és enzim szinten hasonlóan alkalmas a molekuláris vizsgálatok elvégzésére, mint a 6-OHDA indukálta neurodegenerációs modell a gerinces állatok esetében.
- Igazoltuk, hogy a korábban közölt PACAP neurodegenerációs modellekben kifejtett neuroprotektív hatása korreláltható a neurotranszmitterek mennyiségi változásával.
- Megvizsgáltuk a dopamin metabolizáló enzimek mennyiségi változásait, valamint megállapítottuk, hogy a MAO-B enzim a *Lymnea stagnalis*-ban nincs jelentős mennyiségben jelen, így a dopamin metabolizmusában sem játszik jelentős szerepet.
- Proteomikai elemzést végeztünk a gerinces modellben és megállapítottuk, hogy csak a DJ-1 fehérje esetében állapítható meg mennyiségi különbség a kezelési csoportok között.
- Elsőként vizsgáltuk a PARK7/DJ-1 fehérje – PACAP kapcsolatot. „Szendvics” ELISA méréssel megállapítottuk a PARK7/DJ-1 fehérje pontos mennyiségi változását a modellekben. Elsőként igazoltuk a PARK7/DJ-1 fehérje *Lymnaea stagnalis*-ban való jelenlétét.
- Rámutattunk a szerotonin szint változásának egy lehetséges magyarázatára, miszerint a szerotonin gátló szerepet játszik a dopamin felszabadulásában, ezért a szerotonin szint csökkenés egy kompenzációs mechanizmus lehet a sérült dopaminerg rendszer fenntartásához.

A disszertáció témájában megjelent közlemények

Folyóiratban megjelent közlemények

Maász G, Pirger Z, Reglődi D, Petrovics D, Schmidt J, Kiss P, Rivnyák Á, Hashimoto H, Avar P, Jambor É, Tamás A, Gaszner B, Márk L (2014) Comparative protein composition of the brains of PACAP-deficient mice using mass spectrometry-based proteomic analysis. *J Mol Neurosci* 54:310-19 (**IF: 2.891**)

Maász G, Zríny Z, Petrovics D, Rivnyák Á, Márk L, Kiss T, Pirger Z, Reglődi D, Tamás A (2014) Evolution conserved neuroprotective function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in dopamine-based neurodegeneration. (**közlés alatt**)

Márk L, **Maász G**, Pirger Z (2011) High resolution spatial distribution of neuropeptides by MALDI imaging spectrometry in the terrestrial snail, *Helix pomatia*. *Acta Biologica Hungarica* 2:113-22 (**IF: 0.793**)

Brubel R, Kiss P, Vincze A, Varga A, Várnagy A, Bodis J, Márk L, Jambor É, **Maász G**, Hashimoto H, Helyes Z, Tóth G, Tamás A, Koppán M, Reglődi D (2012) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on human sperm motility. *J Mol Neurosci* 48:623-30 (**IF: 2.504**)

Sárvári M, Deli L, Kocsis P, Márk L, **Maász G**, Hrabovszky E, Kalló I, Gajari D, Vastagh Cs, Sümegi B, Tihanyi K, Liposits Zs (2014) Estradiol and isotype-selective estrogen receptor agonists modulate the mesocortical dopaminergic system in gonadectomized female rats. *Brain Research* 1583:1-11 (**IF: 2.828**)

Előadások összefoglalói

Maász G: Neuropeptidok vizsgálata tömegspektriával, MKE Fiala Analitikusok Előadóülése 2010, Budapest, 2010.február 25

Maász G, Jambor É, Bóna Á, Ohmacht R, Márk L: Endokrin neuropeptidok LC-MS vizsgálata, Elvlasztástudományi Vándorgyűlés, Tapolca Hunguest Hotel Pelion, 2010.11.10-12

Reglődi D, Kiss P, Helyes Zs, Márk L, Büki A, Dóczy T, Czeiter E, Bukovics P, Brubel R, Biró Zs, Jambor É, **Maász G**, Koppán M, Várnagy Á, Ertl T, Gyarmati J, Szántó Z, Tarczai I, Tamás A: PACAP klinikai alkalmazásának jövőbeli lehetőségei, FAME 2011, Pécs, 2011.06.08-11

Márk L, **Maász G**, Schmidt J: A sejtszintű analitika új lehetőségei in-vitro és in-vivo képzési tömegspektriával, XLIV. Kromatográfiai Továbbképző Tanfolyam, Szeged 2013.01.28-30

Maász G, Schmidt J, Márk L: In-vivo, ex-vivo és in-vitro tömegspektriás képzési technikák a sejtszintű analitikában, MKE Tömegspektriái Társaság Szakmai Nap, Labortechnika kiállítás, Budapest 2013.04.09-11

Maász G, Pápai Z, Schmidt J, Pirger Zs, Vertes Á, Márk L: Tissue and single cell mapping by laser ablation imaging mass spectrometry, 31th IMMS 2013, Palermo, Italy 2013.05.05-08

Maász G, Pápai Z, Jámbor É, Petrovics D, Bóna Á, Cseharovszky R, Schmidt J, Márk L: Hibernációs neuropeptidok, évszakfüggő anyagcsere változások tömegspektrometriás vizsgálata, Peptidkémiai Munkabizottság tudományos ülése, Balatonszemes, 2013.05-31

Maász G: Comparative peptide-protein composition of the brains of PACAP-deficient mice using mass spectrometry based proteomic analysis, Brasil-Hungary Symposium, Sao Paolo, 2013.11.17

Maász G: Comparative peptide-protein composition of the brains of PACAP-deficient mice using mass spectrometry based proteomic analysis, Symposium and Postgraduate program in Experimental and Physiopatology Clinic, Rio de Janeiro, 2013.11.21

Márk L, **Maász G**, Schmidt J: A sejtszintű analitika új lehetőségei in-vitro és in-vivo képalkotási tömegspektrometriával, XLV. Kromatográfias továbbképzős tanfolyam, 2014.01.27-29

Maász G, Schmidt J, Reglődi D, Márk L: A PACAP hatása a központi idegrendszer fehérje összetételére, 16. Labortechnika Kiállítás, Tömegspektrometriai Szakmai nap, Budapest, 2014.03.19

Poszter-prezentációk

Bóna Á, **Maász G**, Pirger Zs, Lubics A, Reglődi D, László Z, Kiss T, Márk L: Neuropeptid profil vizsgálata csigákban (*Helix pomatia*) MS segítségével, Elválasztástudományi Vándorgyűlés, Tapolca Hunguest Hotel Pelion, 2010.11.10-12

Reglődi D, Kiss P, Helyes Zs, Márk L, Büki A, Dóczy T, Czeiter E, Bukovics P, Brubel R, Biró Zs, Jámbor É, **Maász G**, Koppán M, Várnagy Á, Ertl T, Gyarmati J, Szántó Z, Tárcazi I, Tamás A: Future perspectives of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in clinical research, *Acta Physiologica* 202:(S684) p. 101. (2011)

Bóna Á, Pirger Z, **Maász G**, Jámbor É, László Z, Márk L: Three-dimensional, high resolution MALDI MS imaging investigation of neuropeptides in the pond snail, *Lymnaea Stagnalis*, Pittcon 2012 Conference and Expo, Orlando FL 2012.03.11-15

Pápai Z, **Maász G**, Schmidt J, Bóna Á, Böddi K, Petrovics D, Márk L: nHPLC-MS determination of DA and DA metabolites in mouse brain, 31th IMMS 2013, Palermo, Italy 2013.05.05-08

Maász G, Petrovics D, Schmidt J, Reglődi D, Pirger Z, Hashimoto H, Nagy AD, Kiss P, Szalontai B, Rivnyák Á, Tamás A, Márk L: Peptide and protein composition of the brains of PACAP-deficient mice, The 11th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, Pécs, 2013.08.27-31

Rivnyák Á, **Maász G**, Reglődi D, Schmidt J, Pirger Z, Mihalik A, Kiss P, Gaszner B, Tamás A, Hashimoto H, Márk L: Imaging mass spectrometry of the brain of PACAP deficient and wild-type mice, The 11th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, Pécs, 2013.08.27-31

Maász G, Petrovics D, Schmidt J, Reglődi D, Pirger Z, Magy AD, Kiss P, Szalontai B, Rivnyák Á, Tamás A, Márk L: Comparative proteomic study of PACAP KO mice brain regions, 9th Balaton symposium on high-performance separation methods, Siófok, 2013.09.4-6

Petrovics D, Pápai Z, **Maász G**, Schmidt J, Avar P, Reglődi D, Pirger Z, Kiss P, Rivnyák Á, Tamás A, Márk L: The brains of PACAP-deficient mice - comparative proteomics study, 2nd Internal Doctoral Workshop on Natural Sciences, Pécs, 2013.09.11-12

Rivnyák Á, **Maász G**, Reglődi D, Schmidt J, Pirger Z, Mihalik A, Kiss P, Gaszner B, Tamás A, Hashimoto H, Márk L: Imaging mass spectrometry of the brain of pacap deficient and wild-type mice, IBRO Workshop 2014, Debrecen, 2014.01.16-17

Maász G, Pápai Z, Petrovics D, Schmidt J, Reglődi D, Pirger Z, Hashimoto H, Kiss P, Rivnyák A, Tamás A, Márk L: A PACAP hatása a központi idegrendszer fehérje összetételére, 44. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2014.05.20-23

Maász G, Pápai Z, Petrovics D, Schmidt J, Reglődi D, Pirger Z, Hashimoto H, Kiss P, Gaszner B, Rivnyák Á, Tamás A, Márk L: Effect of PACAP to the protein composition of central nervous system, 32nd Informal Meeting on Mass Spectrometry, Balatonszárszóc, 2014.05.11-14

Maász G, Pápai Z, Petrovics D, Schmidt J, Reglődi D, Pirger Z, Hashimoto H, Kiss P, Rivnyák Á, Tamás A, Márk L: A PACAP hatása a központi idegrendszer fehérje összetételére, 44. Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 2014.05.20-23

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Márk László egyetemi docensnek, aki TDK-s korom óta felügyelte munkámat, végezte szakmai irányításomat és megteremtette a munkámhoz szükséges feltételeket és lehetőségeket. Köszönöm Prof. Reglődi Dóra egyetemi tanárnak a kísérletek megtervezésében nyújtott segítségét, értékes tanácsait, rám való odafigyelését és önzetlen segítségét. Hálás vagyok a dolgozat megírásához nyújtott segítségéért és munkám támogatásáért. Dr. Pirger Zsoltnak is köszönöm a gerinctelen vizsgálatokban nyújtott segítségét és szakmai irányítását, tanácsait.

Szeretnék köszönetet mondani a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet valamennyi dolgozójának, ezen belül is kiemelten az Analitikai Biokémia Tanszéken dolgozó kollégáimnak, ahol baráti környezetben végezhettem munkámat és támogatásukat élvezhettem az itt eltöltött szép évek alatt.

Köszönöm családomnak és páromnak, hogy mindvégig mellettem álltak, támogattak és bátorítottak.