

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**PACAP (HIPOFÍZIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ
POLIPEPTID) FOGFEJLŐDÉSRE GYAKOROLT
HATÁSAINAK VIZSGÁLATA ÁLLATMODELLEN**



Dr. Sándor Balázs

Témavezetők:

Dr. Tamás Andrea, egyetemi docens (PTE ÁOK Anatómiai Intézet)

**Dr. Nagy Ákos, egyetemi docens (PTE KK Fogászati- és Szájsebészeti
Klinika)**

Programvezető: Dr. Csernus Valér, egyetemi tanár

Doktori iskola vezetője: Dr. Lénárd László, egyetemi tanár

2017.

1. Bevezetés

1.1. PACAP (hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid)

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-PACAP) egy pleiotrop, multifunkcionális neuropeptid, melyet először 1989-ben birka hypothalamusból izoláltak ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) aktiváló hatása alapján. A PACAP a vazóaktív intesztinális peptid (VIP)/szekretin/növekedési hormont felszabadító hormon (growth hormon releasing hormon-GHRH)/glükagon szupercsalád tagja, két ismert biológiailag aktív variánsal, ami a PACAP-27 és a PACAP-38. A szupercsalád tagjai közül a PACAP aminosav szekvenciája és hossza a legkonzerváltabb, mely alapvető biológiai funkciók szabályozásában betöltött fontos szerepére utal. Három, eddig ismert receptora közül a PAC1 receptor (PACAP receptor 1-es típus, PAC1R) a PACAP-ra nézve nagy affinitással és VIP tekintetében alacsony affinitással rendelkezik. A VPAC1 (VIP/PACAP receptor 1-es típus) és a VPAC2 (VIP/PACAP receptor 2-es típus) receptorok egyforma affinitással kötik a PACAP-ot és a VIP-t. Alternatív splicing következtében a PAC1R-nak számos variánsa ismert, mely hozzájárul a PACAP pleiotrop hatásához. A PACAP és PAC1 receptor expressziója már az embrionális fejlődés nagyon korai szakaszában is megfigyelhető a neuroepitheliális sejtekben. Számos intracelluláris szignáltranszdukciós kaszkád szabályozásában szerepet játszik, mely neuronális sejtekben hatással van többek között a neurogenesisre, neuronális védelemre, migrációra, differenciációra és a szinaptikus kapcsolatok kialakulására. Legnagyobb mennyiségben a központi és perifériás idegrendszerben található, de a PACAP és receptorai jelenlétét kimutatták többek közt a légző, urogenitális, kardiovaszkuláris szervrendszerben, fülben valamint a fogak pulpájában és a parodonciumban is.

A PACAP szerepet játszik élettani folyamatok szabályozásában, mint például a termoreguláció, motoros aktivitás, táplálkozás és a cirkadián ritmus. Neurotrofikus, neuroprotektív és általános citoprotektív hatásai mellett anti-inflammatorikus és anti-apoptotikus hatásai ismertek. Általános citoprotektív hatását az idegrendszeren kívül is kimutatták, mely feltételezhetően anti-inflammatorikus és anti-apoptotikus hatásának köszönhető.

A PACAP-génhiányos (PACAP KO) egerekkel lehetőségünk van az endogén PACAP szerepének vizsgálatára fiziológias és patológias körülmények között. A vad-típusú,

heterozigóta és homozigóta PACAP-génhiányos egerek között makroszkópos morfológiai különbség nem mutatkozik, azonban finomabb módszerekkel (immunhisztokémia, elektronmikroszkópia) és funkcionális vizsgálatokkal jelentős eltérések igazolhatók. Az endogén PACAP hiánya biokémiai, magatartásbeli és funkcionális elváltozásokhoz vezet, és emellett neuronális fejlődési zavar is megfigyelhető. A homozigóta PACAP-génhiányos egereket érő káros hatások esetén nagyobb mértékű léziót írtak le vad-típusú társaikhoz képest, mint például bilaterális arteria carotis communis leköttét követően iszkémiás retina degeneráció nagyobb mértékű a génhiányos csoportban.

1.2.Fogak fejlődésének alapjai

A fogak az első garatív ectodermájából és dúcléc eredetű ectomesenchymális sejtekből fejlődnek. Az ectodermális eredet alapján feltételeztük, hogy a PACAP-génhiányos egerekben a PACAP hiánya a neuronális fejlődés mellett hatással lehet fogak fejlődésére is.

Az emberi és rágcsáló fogazat fejlődése hasonló. A fogfejlődés stádiumai a fogazattal rendelkező gerincesekben egy jól konzervált folyamat. A fogfejlődés négy fő egymást követő részre osztható: a fogléc kialakulása, a fogcsíra kialakulása, sapka stádium és a harang stádium. Munkánk első részében hét napos egerekben vizsgáltuk az első és második fejlődő moláris fogakat a késői harang stádiumban (1. ábra).

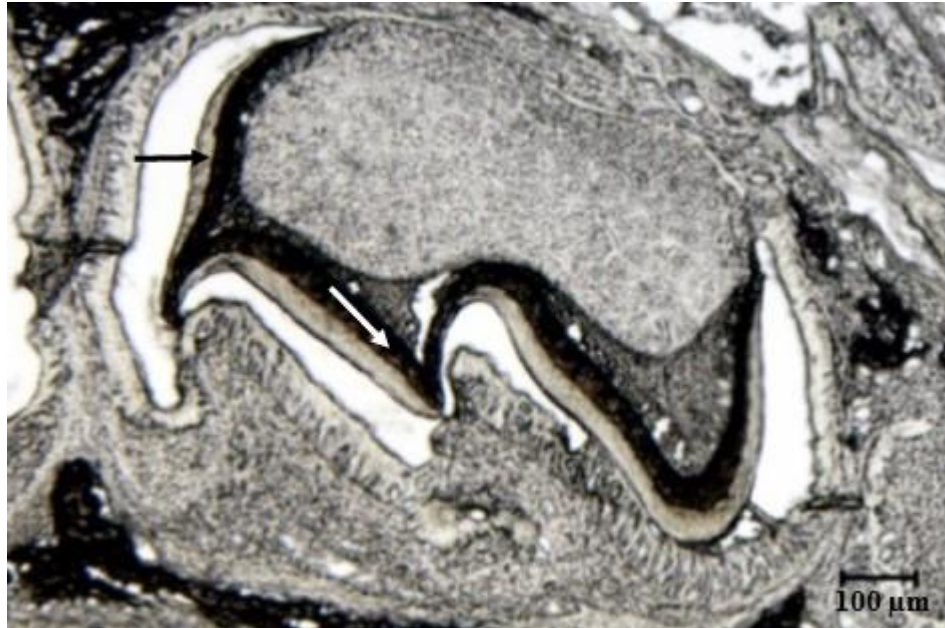
A fogfejlődés az epithelium és az alatta elhelyezkedő ectomesenchyma közötti, szigorúan szabályozott egymásra hatás következménye. Azon konzervált jelátviteli utak, melyek az embrionális fejlődés szabályozásáért felelősek, szükségesek a fogak fejlődéséhez is. A fogfejlődés kezdeti iniciációját és morfogenezisét ugyanazon molekulák szabályozzák, mint egyéb ectodermális szervek fejlődését. Eddig több, mint 300 gént azonosítottak fogfejlődésben. Az utóbbi időben jelentős előrelépés történt az epitheliális-mesenchymális „párbeszéd”-ben résztvevő kulcs fontosságú transzkripciós faktorok és jelátviteli molekulák azonosítása terén, köztük olyan peliotrop morfogéneket vizsgáltak, mint a csont-morfogenetikus-fehérjék (bone morphogenetic protein-BMP), fibroblaszt növekedési faktorok (fibroblast growth factor-FGF), sonic-hedgehog (SHH) és a Notch és Wingless fehérjecsaldok (WNT). Több vizsgálat is igazolta a PACAP és ezen faktorok interakcióját. SHH az ameloblaszt differenciáció és mátrix szekréció egyik kulcs fontosságú regulátora. Neuronális kísérleti modellekben igazolták a PACAP downstream targetjei és az SHH jelátviteli útvonal közötti interakciót. SHH faktor

receptorához (PTCH1) kapcsolódva Gli1 transzkripciós faktor aktivációt eredményez, ezáltal befolyásolja a sejtek proliferációját, és az extracelluláris mátrix képzését.

1.3. A fogak keményszöveteinek összetétele

Az érett zománc szerves anyag tartalma kevesebb, mint 1%, 96%-a szervetlen anyag (főleg hidroxipatit kristály-HAP) és 3%-a víz. A zománc fejlődésétől a maturációig a karbonát tartalom folyamatosan csökken, mely befolyásolja a zománc fizikai és kémiai tulajdonságait. A zománc szerves anyag mátrixát amelogenin (90%) és nem-amelogenin fehérjék (enamelin, ameloblastin) alkotják. Ezen fehérjéknek fontos szerepe van a zománc kristályosodásának szabályozásában.

A dentint egy csont jellegű szövet, melyet a teljes vastagságában áthaladó szorosan elhelyezkedő odontoblaszt nyúlványokkal kitöltött (Tomes-féle rostok) dentin tubulusok jellemeznek a pulpától a dentin-zománc junkcióig. A dentin alkotja a fog mineralizált szöveteinek fő tömegét. A dentin a zománcnál kevésbé, a csontszövetnél jobban mineralizált. Az érett dentinben, tömegszázalék tekintetében körülbelül 65-70%-ban anorganikus (HAP), 20%-ban organikus elem és 10%-ban víz alkotja. Szerves állományának nagy részét I-es típusú kollagén teszi ki (90%), emellett számos nem-kollagén, csont és dentin specifikus fehérjék találhatóak, melyek főként a dentin szialofoszfoprotein (DSPP) származékai. A kollagén a dentin szerkezeti vázát adja, míg a nem-kollagén fehérjék a kristályosodás szabályozásában játszanak szerepet (1. ábra).



1. ábra: Fejlődő felső második moláris reprezentatív képe hét napos egérben. Fekete nyíl a zománcot, fehér nyíl a dentint jelöli.

1.4. PACAP-pal kapcsolatos kutatások a fogakkal összefüggésben

Korábban PACAP immunoreaktív rostokat mutattak ki patkány és emberi fog pulpában az erek mentén, az odontoblaszt és subodontoblaszt rétegben. Egy másik korábbi vizsgálat szerint feltételezhető, hogy a PACAP szerepet játszik a parodontium regenerációjában luxációs sérülést követően. Kutatócsoportunk a homo- és heterozigóta PACAP-génhiányos és vad-típusú egerek posztnatális fejlődését megfigyelve tapasztalta, hogy hím állatok esetében a metszőfogak szignifikánsan korábban törnek elő a génhiányos egerek esetén összehasonlítva a vad-típusúakkal. A PACAP fogfejlődésre gyakorolt hatását korábban nem vizsgálták, ezért kutatásaink során célul tűztük ki ezen folyamatok feltérképezését.

2. Célkitűzések

Célul tűztük ki az endogén PACAP hiányának fogfejlődésre gyakorolt hatásának megismerését. Kutatásaink első szakaszában hét napos vad-típusú és homozigóta PACAP-génhiányos egerek fejlődő moláris fogait hasonlítottuk össze. Vizsgálataink során morfometriai és szerkezeti vizsgálatokat végeztünk szövettani és Raman mikroszkópia segítségével, melyet a fogfejlődés szabályozásának hátterében álló molekuláris biológiai útvonalak feltérképezése céljából immunhisztokémiával is kiegészítettünk.

A munkánk második szakaszban 1 éves vad-típusú és homozigóta PACAP-génhiányos egerek folyamatosan fejlődő alsó metszőfogait vizsgáltuk. Micro-CT segítségével morfológiai és denzitometriás méréseket végeztünk, majd a metszőfogakból készült csiszolatokat Raman mikroszkópia segítségével elemeztük.

3. Anyagok és módszerek

Vizsgálatainkat homozigóta PACAP-génhiányos és vad-típusú CD1 egereken végeztük. Vizsgálataink során az állattartás és a kísérletek kivitelezése a Pécsi Tudományegyetem BA02/2000-15024/2011 számú ellenőrzött protokolljának megfelelően történt.

3.1. Hét napos vad-típusú és homozigóta PACAP-génhiányos egerek fejlődő moláris fogainak összehasonlítása

3.1.1. Metszetkészítés morfometriai analízishez és Raman mikroszkópiához

Heterozigóta egerek pároztatását követően, a fejlődés standard körülményeinek biztosítása érdekében a különböző vizsgálati metódusokban alomtestvéreket használtunk. A genotípus meghatározása PCR (polymerase chain reaction) segítségével történt.

A fogak keményszöveteinek morfológiai és strukturális vizsgálatai során vad-típusú (PACAP+/+, n=6 morfológiai analízis, n=4 strukturális analízis) és homozigóta PACAP-génhiányos (PACAP-/-, n=6 morfológiai analízis, n=4 strukturális analízis) egerek fejlődő moláris fogait hasonlítottuk össze. A metszetkészítés fagyasztásos technikával készült. Az előkészített egér fejből szagittális irányban 10 µm vastag metszeteket készítettünk.

3.1.2. Morfometriai analízis

A posztnatális hetedik napon az egerek első és második őrlő fogai a késői harang stádiumban vannak. A fejlődő zománc és dentin vastagságát mértük a moláris fogak csücsökcsúcsain a natív metszeteken. A méréshez a metszetekről minden molárisról külön digitális felvételeket készítettünk. A felvételeken a felső első moláris, a felső második moláris, alsó első moláris és az alsó második moláris, zománc és dentin vastagságát mértük. Statisztikai analízisként kétmintás t-próbát alkalmaztunk.

3.1.3. Strukturális analízis Raman mikroszkópiával hét napos egerek molárisaiban

Méréseinket az előző vizsgálatban használt, natív fagyasztásos technikával készült metszeteken végeztük a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Ásványtani, Geokémiai és Kőzettani Tanszékén. Vad-típusú és homozigóta PACAP-génhiányos egerek moláris fogaiban hasonlítottuk össze a dentin és zománc összetételét, amihez Thermo Scientific DXR Raman mikroszkópot alkalmaztunk. A dentinből és zománcból felvett spektrumokon HAP és fehérje csúcsokat tudtunk azonosítani. Az adatok normalitásvizsgálatát követően a statisztikai kiértékelés kétmintás t-próbával történt. Az anorganikus komponensek spektrumának kiértékelését a kristályossági index meghatározásával végeztük, a PO_4^{3-} csúcsok félértékszéllesség (FWHM) értékeinek és egy referencia (magmatikus apatitban mért) PO_4^{3-} FWHM érték felhasználásával ($\text{CI}_{\text{Raman}}=4.9/\Gamma_s$). A magasabb FWHM (alacsonyabb CI_{Raman}) a hidroxipapatit kristályok nagyobb rendezetlenségére utal. A kristályok rendezettségét a relatív karbonát tartalom befolyásolja, melyet a karbonát csúcsok ($\nu_1 \text{CO}_3^{2-}$ $1072\pm 1 \text{ cm}^{-1}$) és a foszfát csúcsok ($\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ $960\pm 1 \text{ cm}^{-1}$) hányadosaként határoztunk meg. A rétegek fehérje spektrumának értékelése során az alábbi sávokat vizsgáltuk: amid I (νCO , $1665\pm 2 \text{ cm}^{-1}$), amid III ($\delta \text{C-N}$, $1240\pm 2 \text{ cm}^{-1}$; $\delta \text{N-H}$, $1272\pm 6 \text{ cm}^{-1}$ és δCH_2 , $1346\pm 3 \text{ cm}^{-1}$), metil (δCH_3) és metilén (δCH_2). Az amid I és amid III sávok a fehérjék másodlagos konformációjáról adnak információt.

3.1.4. Immunhisztokémiai vizsgálat

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat kollaborációban végeztük a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetével. Hét napos állatok (PACAP+/+, $n=3$, PACAP-/-, $n=3$) fejeiből szagittális irányban sorozatmetszés

készült 5 µm-es vastagságban. A metszeteken immunhisztokémiai festést végeztünk SHH, PTCH1, Gli1 expressziójának vizsgálatához. A metszeteken a vad-típusú és homozigóta PACAP-génhiányos egerek moláris fogcsíráit vizsgáltuk. Digitális felvételeken, három kutató egymástól függetlenül meghatározta a sejtek és az antitestek lokalizációját a fogcsírákban.

3.2. Felnőtt (1 éves) homozigóta PACAP-génhiányos és vad-típusú egerek alsó metszőfogainak strukturális és morfolometriai összehasonlítása

A fogfejlődésben érintett faktorok hiánya a moláris fogak és a metszőfogak fejlődését és mineralizációját eltérő módon befolyásolja. Ebben a vizsgálatunkban 1 éves homozigóta PACAP-génhiányos (PACAP -/-; n=6) és vad-típusú (PACAP +/+; n=5) egerek alsó metszőfogainak összehasonlítása történt morfolometriai analízissel, melyet mikro-CT segítségével végeztünk. A metszőfogak strukturális összehasonlítására mikro-CT denzitometriát és Raman mikroszkópot alkalmaztunk.

3.2.1. Mikro-CT-vel végzett morfolometriai és denzitometriai vizsgálat

A vizsgálathoz mikro-CT gyártójának (Skyscan 1176, BrukerMicroCT, Kontich, Belgium) utasításainak megfelelően előkészítettük az egerek mandibuláit. Az alsó állcsontokat fogászati viaszba ágyaztuk szkenneléshez (9 µm-es voxel mérettel). Szöveti ásványi anyag sűrűség méréséhez fantom rudat alkalmaztunk kalibráció céljából. Az ásványi anyag sűrűséget a kalcium-hidroxiapatit térfogati sűrűség meghatározásával végeztük gramm per köbcentiméterben (g/cm^3).

Összehasonlítottuk a dentin, a zománc és a pulpa térfogatát homozigóta PACAP-génhiányos és vad-típusú egerek között. A fog teljes méretét egy standardizált 900 µm-es régióban három térfogat összegeként adtuk meg (zománc térfogat+pulpa térfogat+dentin térfogat). A pulpa méretének meghatározására a relatív értéket használtunk (pulpa volumen/dentin volumen) a fog méretbeli különbségeinek kizárása érdekében. Az analízáló szoftverben a mandibula csont, a zománc és a dentin területét megjelöltük a denzitometriai mérések elvégzéséhez. Statisztikai kiértékelésként kétmintás t-próbát alkalmaztunk.

3.2.2. Strukturális analízis Raman mikroszkópiával 1 éves egerek alsó metszőfogaiban

A micro-CT vizsgálatban használt mandibulából standardizált módon frontális csiszolatokat készítettünk. A spektrumokat a zománctól és a dentintől tíz-tíz diszkrét pontban vettük fel. A zománctól hidroxipatit sávot, a dentinben hidroxipatit és fehérje sávot (amid III sáv) azonosítottunk. A zománctól azonosított hidroxipatit sávokat figyelmen kívül hagytuk a vizsgálat során, a változatos strukturális összetétel miatt, amely a folyamatosan fejlődő metszőfogakat jellemzi, mind apico-incisális irányban, mind a zománc vastagságában. A dentin hidroxipatit sávjának spektrális analízise során a karbonát és foszfátsúcsok alatti területek arányát vizsgáltuk ($v1 \text{ CO}_3^{2-}/v1 \text{ PO}_4^{3-}$), mely a hidroxipatit struktúra karbonát tartalmára utal. A dentin protein spektrumának vizsgálata során az amid III sávokat analizáltuk.

4. Eredmények

4.1. Hét napos egerek fejlődő moláris fogainak vizsgálata

4.1.1. Morfometriai analízis

A vad-típusú és homozigóta PACAP-génhiányos egerek zománc és dentin rétegvastagságának összehasonlítása során nem találtunk szignifikáns különbséget a felső első moláris fogakban. Szignifikánsan vékonyabb dentint találtunk a PACAP-génhiányos egerekben a felső második moláris fogak első ($p < 0,05$), az alsó első molárisok első ($p < 0,001$) és az alsó második moláris fogak első és második ($p < 0,01$) csücskei esetében.

4.1.2. Strukturális analízis Raman mikroszkópiával hét napos egerek molárisaiban

A dentin szerves fázisának vizsgálata során szignifikáns különbséget találtunk a foszfát csúcsok FWHM értékében a vad-típusú és a PACAP-génhiányos egerek között. A génhiányos csoportban az értékek szélesebb skálán helyezkedtek el ($p < 0,01$). A kristályossági indexek összehasonlítása során a vad-típusú egerekben az értékek 0,33 és 0,4 között csoportosultak nagyobb mértékben, a génhiányos csoportban alacsonyabb értékek körül (0,25 és 0,3), mely különbség itt is szignifikánsnak bizonyult ($p < 0,05$). A dentin relatív karbonát tartalmának ($\nu_1 \text{CO}_3^{2-}/\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$) meghatározása során szintén különbségeket találtunk. Bár a vad-típusú egér fogaiban az értékek 0,12 és 0,29 között, míg a PACAP-génhiányos egerek esetében pedig egy szűkebb skálán (0,13 és 0,23 között) helyezkednek el, a PACAP-génhiányos egerekben az intenzitás hányadosok magasabb értékeknél csoportosulnak. A dentin organikus (fehérje) fázisában nem találtunk szignifikáns különbséget. A zománc vizsgálata során a fehérje spektrumok összehasonlítása során találtunk szignifikáns különbséget ($p < 0,05$). Az $1240 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ és $1272 \pm 6 \text{ cm}^{-1}$ amid III csúcsok hányadosában találtunk különbséget. A kapott értékek a vad-típusú egerek esetében széles skálán helyezkednek el (0,47-1,3), ezzel szemben a PACAP-génhiányos egerekből kapott értékek sokkal szűkebb skálán (0,6-0,8) találhatóak. Egyéb fehérje sávokban, valamint az zománc anorganikus fázisában szignifikáns különbséget nem találtunk.

4.1.3. Immunhisztokémiai vizsgálat

Immunhisztokémiai módszerekkel a fogstruktúrákban és azok körül intenzívebb jel látható mind az SHH, a PTCH1 és Gli1 esetében a PACAP-génhiányos egerekből készült metszeteken. Fokozott SHH immunpozitivitás mutatható ki a szekréción ameloblasztok és a stratum intermedium területén, fokozott PTCH1 expresszió detektálható az odontoblaszt nyúlványok és az ameloblasztok területén és intenzívebb intracelluláris Gli1 expresszió figyelhető meg a szekréción ameloblasztok apikális területén a PACAP-génhiányos csoportban összehasonlítva a vad-típusú egerekkel.

4.2. Felnőtt (1 éves) PACAP-génhiányos és vad-típusú egerek alsó metszőfogainak strukturális és morfológiai összehasonlítása

4.2.1. Mikro-CT-vel végzett morfológiai és denzitometriai vizsgálat

A fogak méretének (pulpa volumen+zománc volumen+dentin volumen) összehasonlítása során szignifikánsan kisebb fogakat találtunk a PACAP-génhiányos csoportban a vad-típusú egerekhez képest ($p < 0,05$). A pulpa volumen/dentin volumen összehasonlítása során a PACAP-génhiányos csoportban szignifikánsan alacsonyabb értékeket kaptunk ($p < 0,05$) a vad-típusú állatokhoz viszonyítva. A denzitometriai méréseink során összehasonlítottuk a fog körüli csont, a zománc és a dentin denzitását. Szignifikánsan alacsonyabb denzitást mértünk a PACAP-génhiányos egerek dentinjében ($0,396 \pm 0,033 \text{ g/cm}^3$) összehasonlítva a vad-típusú egerek metszőfogainak dentinjével ($0,542 \pm 0,062 \text{ g/cm}^3$) ($p < 0,05$).

4.2.2. Strukturális analízis Raman mikroszkópiával 1 éves egerek alsó metszőfogaiban

A dentin hidroxipatit sávjának vizsgálata során szignifikáns eltérést találtunk a karbonát és foszfát csúcsok arányában ($v_1 \text{ CO}_3^{2-}/v_1 \text{ PO}_4^{3-}$) a vad-típusú és PACAP-génhiányos egerek metszőfogai között ($p < 0,05$). A vad-típusú egerekben ez az arány 0,1-0,27 közötti értékeket mutatott, 0,16-os átlagértékkel, míg a PACAP-génhiányos csoport esetében az értékek 0,12-0,26 közé estek 0,18 átlagértékkel. A dentin fehérje struktúráját vizsgálva az amid III deformációs rezgési sávok alatti terület arányának összehasonlítása során ($1240/1270 \text{ cm}^{-1}$) szintén szignifikáns eltérést találtunk ($p < 0,05$). Vad-típusú egerekben az arány 0,14-1,57 értékek közé esett 0,77 átlagértékkel, míg a PACAP-génhiányos csoportban az értékek egy

szűkebb intervallumban 0,28-1,24 között helyezkedtek el egy alacsonyabb 0,61 átlagértékkel.
A zománc anorganikus fázisát a korábban részletezett okok miatt elvetettük.

5. Megbeszélés

Vizsgálataink során szignifikáns különbségeket találtunk hét napos vad-típusú és homozigóta PACAP-génhiányos egerek fejlődő molárisainak és felnőtt (1 éves) állatok metszőfogainak vizsgálata során, mind strukturálisan, mind morfológiai analízissel. A hét napos állatokban morfológiai összehasonlítással a homozigóta PACAP-génhiányos egerekben vékonyabb dentin réteget találtunk. A vékonyabb dentin réteg a génhiányos csoportban a fejlődés késésére utalhat, mely szembetűnőbb a második molárisok esetében, mivel azok a fejlődés korábbi stádiumában vannak. A dentin fejlődése a nem mineralizált prekürzornak tekinthető pre-dentin kialakulásával kezdődik, mely a későbbiekben apatit kristályok lerakódásával mineralizálódik. A mineralizáció és pre-dentin képződésének egyensúlyában keletkező zavar patológiás elváltozásokhoz vezethet, mint a csökkent dentin vastagság. Az egy éves (felnőtt) vad-típusú és homozigóta PACAP-génhiányos egerek alsó metszőfogai között is morfológiai különbségeket találtunk mikro-CT vizsgálattal. A mérések eredményeként a homozigóta PACAP-génhiányos egerek metszőfogai kisebb méretűnek bizonyultak (zománc, dentin és pulpa volumen összege), a pulpa dentinhez viszonyított relatív mérete kisebb volt az 1 éves PACAP-génhiányos egerekben. Az egy éves állatokban talált kisebb fogméret összhangban van kutatócsoportunk korábbi eredményeivel, miszerint a homozigóta PACAP-génhiányos egerek elmaradnak növekedésben (csökkent súlynövekedés) vad-típusú társaikhoz viszonyítva. A pulpakamra szűkülése a kor előrehaladtával fiziológiásnak tekintendő, de előfordulhat védekező reakcióként a pulpát érő káros behatásokkal szemben. Esetenként a pulpa teljes obliterációja is előfordulhat fogfejlődési rendellenességekben, mint például a dentinogenezis imperfecta.

Raman mikroszkópiával végzett strukturális összehasonlítás eredményeként a hét napos egereknél a zománc réteg fehérjéiben, illetve a dentin hidroxipatit fázisában találtunk szignifikáns eltéréseket. A foszfát sávok ($\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$) FWHM értéke a dentinben szignifikáns különbséget mutatott a vad-típusú és PACAP-génhiányos egerek között. A felvett Raman spektrumon ez a sáv $959\text{-}960 \text{ cm}^{-1}$ között található, mely jellemző a biológiai apatitokra. A foszfát sávokban talált eltérések a kristályok rövidtávú atomos rendezettségében való különbségekre utal. Szignifikánsan magasabb FWHM értékeket találtunk homozigóta PACAP-génhiányos egerek dentinjében, mely a hidroxipatit kristályok magasabb fokú

rendezetlenségére utal. A rendezetlenség mértéke a kristályok méretével és a hidroxiapatit kristályok relatív karbonát tartalmával hozható összefüggésbe. Raman spektrumon a nanométeres mérettartományú apatit kristályokban a foszfát csúcsok FWHM értéke magasabb, míg a nagyobb méretű kristályok esetén a ν_1 PO_4^{3-} sávok alacsonyabb FWHM értéket mutatnak. A kristályok rendezettségében és méretében való eltérés lehet a „ β szubsztitúció” következménye, mely során a molekuláris struktúrában a foszfát csoportok (PO_4^{3-}) karbonát csoportokkal (CO_3^{2-}) helyettesítődnek. A karbonát (CO_3^{2-}) vibrációs mód, azon hidroxiapatit kristályokra jellemző, ahol a kristályrácsszerkezetben a foszfát csoportok „ β szubsztitúciója” előfordul. Az ionos szubsztitúció és a kis kristályméret nem független egymástól, mindkettő a rendezetlenséget növeli. A „ β szubsztitúció” mértékének meghatározására a karbonát és foszfát (ν_1 CO_3^{2-}/ν_1 PO_4^{3-}) sávok relatív intenzitása használható. A homozigóta PACAP-génhiányos egerek dentinjében mért magasabb értékek a hét napos egerek moláris fogaiban magasabb ionos szubsztitúcióra utal (karbonát foszfát helyére) az apatit kristályban, ami összefüggésbe hozható a dentin csökkent mértékű kristályosságával a génhiányos csoportban, melyet a kristályossági index (CI_{Raman}) eredményei is alátámasztanak. A „jól” kristályosodott hidroxiapatit sávok keskenyebbek (alacsonyabb FWHM érték), míg csökkent kristályosodás esetén a sáv kiszélesedik (magasabb FWHM érték). Az eredmények tükrében elmondhatjuk, hogy a PACAP-génhiányos egerek dentinjét kevésbé kristályosodott, rendezetlenebb, kisebb kristallit méretű bioapatit jellemzi.

A hét napos egerek fejlődő molárisainak zománcában kimutatott különbség az amid III sávok deformációs rezgéseinek (kötésszög változás) intenzitás hányadosában, a fehérjék másodlagos szerkezetének eltérésére utal. Ez az eredmény a rendezett és rendezetlen ún. „random coil” (nem valós másodlagos konformáció) szakaszok arányában való eltérést jelöli. Vad-típusú egerekben a rendezett és rendezetlen szakaszok nagyobb fokú diverzitását észleltük összehasonlítva a homozigóta PACAP-génhiányos egerekkel. A zománcfehérjék másodlagos szerkezetének csökkent diverzitása a PACAP-génhiányos csoportban hatással lehet a fog zománc mineralizációjára. A zománcfehérjék 90%-át az amelogenin teszi ki, melynek kritikus szerepe van a zománc mineralizáció szabályozásában. Az amelogenin másodlagos struktúrája befolyásolja a kristályok irányított növekedését a zománcprizmán belül, ezáltal a normális zománcfejlődést. Amelogenen z is imperfecta egy zománcfejlődési rendellenesség, mely az amelogenin másodlagos struktúrájában bekövetkező destabilizáció következménye.

Az egy éves egerek Raman mikroszkópos vizsgálata során is szignifikáns eltéréseket találtunk a dentinben, mind a fehérje, mind a hidroxipatit fázisban. Ezen eredmények szerint a homozigóta PACAP-génhiányos egerek dentinjében a karbonát/foszfát arány magasabb volt, mely nagyobb fokú β -típusú szubsztitúciót jelent. Hasonlóan a hét napos egereknél leírtakhoz, ebben az esetben is ez az eredmény kisebb méretű kristályokra és a kristályszerkezet nagyobb fokú rendezetlenségére utal. A dentin magasabb karbonát tartalma összhangban van a hét napos egerekben leírtakkal, és összefüggésben lehet az 1 éves egerekben talált denzitometriai eredményeinkkel, mely szerint a homozigóta PACAP-génhiányos egerek dentinjének kalcium-hidroxipatit térfogati sűrűsége szignifikánsan alacsonyabb volt. Keményszövetek sűrűségének mérése során a röntgensugár gyengülése feltételezhetően függ az anyag kalcium-hidroxipatit tartalmától. Bár nem találtunk adatot arra vonatkozólag, hogy van-e összefüggés a karbonát/foszfát arány és a szöveti ásványi anyag denzitás között, osteoporózis esetén a magasabb karbonát/foszfát tartalomhoz alacsonyabb denzitometriai eredmények társulnak.

A Raman mikroszkópia az egy éves egerek metszőfogainak dentinjének fehérje struktúrájában is különbségeket mutatott a két csoport összehasonlítása során. Az amid III 1240/1270 csúcsok arányai a vad-típusú egerekben szélesebb skálán helyezkedik el, ami egy nagyobb fokú strukturális diverzitásra (több „random coil”) utal a fehérjék másodlagos konformációját illetően. Hasonlóan a zománcfehérjéknél leírtakhoz, a szerkezeti különbség itt is hatással lehet a mineralizációra. A dentin fehérjék predominant alkotóeleme az I-es típusú kollagén. Az egyéb fehérjéket a dentinben a nem-kollagén fehérjék (NCP-non-collagenous protein) csoportjába soroljuk. Az NCP és ezen belül is a kis integrin kötő N-glikolizált fehérjék (SIBLING-small-integrinbindingligand, N-linked glycoproteins) fontos szerepet játszanak a kristálynövekedés és a mineralizáció szabályozásában. Bár a dentin fejlődés és mineralizáció pontos mechanizmusa még nem teljesen ismeret, változás mutatható ki a dentin mátrix protein-1 (DMP1, SIBLING fehérjecsald tagja) konformációjában, a hidroxipatithoz való kötődése során. A SIBLING fehérjék „random coil” struktúrái lehetővé teszik a kötődést az ásványi anyagokhoz, a kollagénhez és a sejtfelszínhez.

A génhiányos csoport dentinjében talált szerkezeti eltérések mind a hét napos, mind az 1 éves csoport esetén (nagyobb mértékű karbonát szubsztitúció, csökkent kristályosság, nagyobb rendezetlenség) a dentin csökkent ellenállásra utal, mivel a kisebb kristallit méret a specifikus

felszín növekedésével jár, ezáltal nagyobb felszínt biztosítva a savas behatásoknak, megnövekedett szolubilitással. A felnőtt egerek esetében ez lehet oka a metszőfogakban talált szűkebb pulpa kamrának.

A metszőfogak morfológiáját, a kemény szövetek kialakulását és a fogak méretét a fogfejlődésben résztvevő jelátviteli útvonalak finom összehangolt egyensúlya határozza meg. A teljes mechanizmus nem tisztázott, és fogtípusok között is jelentős eltérések vannak a molekuláris szabályozásban. Korábban más szövetben igazolták, hogy a PACAP képes egyes, a fogfejlődésben szerepet játszó, faktorok expresszióját befolyásolni. A legtöbb vizsgálatban a PACAP az SHH és a BMP4 antagonistájaként viselkedett. A PACAP kiváltotta protein kináz A (PKA) aktiváció a Gli1 transzkripciós funkcióját gátolja, ezért neuronális szövetekben a PACAP-ot a SHH jelátvitel szupresszoraként tartjuk nyilván. Homozigóta PACAP-génhiányos hét napos egerek moláris fogaiban a csökkent PAC1 szignáltranszdukciós kaszkád „downstream target” aktivációja fokozott SHH jelátviteli útvonal expressziót eredményezett. Mivel az SHH jelátviteli útvonal szabályozza az ameloblasztok és odontoblasztok differenciációját, növekedését, polarizációját, a fogak csücskének morfológiáját a fogfejlődés során, a PACAP-génhiányos csoportban az útvonal fokozott expressziója felelős lehet a Raman mikroszkópiával észlelt mineralizáció és fehérjestruktúra eltéréseiért. Ezen eredményeink alapján a PACAP hiányában a fogfejlődésben szerepet játszó faktorok érzékeny egyensúlya diszharmonikussá válhat.

Mesenchymális WNT/ β -catenin jelátvitel gátolja az FGF10 antiapoptotikus hatását a metszőfogak „nyaki hurka” (cervical loop) körül található mesenchymában (apikális papilla). Kimutatták, hogy a megváltozott FGF10 expresszió (FGF10 génhiányos egerek, késői FGF10 expresszió) a metszőfogak csökkent méretéhez vezet. A PAC1 receptor ligand independens intrinsic/nyugalmi aktivációja kulcsfontosságú szerepet játszik a WNT/ β -catenin jelátviteli út aktivációjában és szabályozásában a PAC1 receptor dimer képződése révén. Felvetődik a lehetősége, hogy a PACAP gátolja a PAC1 receptor dimerizációját, ezáltal blokkolva a ligand független aktivitását. Ezek alapján feltételezzük, hogy PACAP hiányában, a génhiányos egerekben a ligand independens hatás és ennek következtében a WNT/ β -catenin jelátviteli út serkentődik, mely felelős lehet a PACAP-génhiányos egerekben talált kisebb méretű metszőfogakért.

A fogfejlődésben szerepet játszó faktorok közül a BMP-k szerepe jelentős. A BMP-k expressziójának pontos hangolása elengedhetetlen a fogfejlődés morforegulációjában, ameloblasztok és odontoblasztok differenciációjában. A PACAP hatással van ezen útvonalakra is. Osteosarcoma sejtvonalban (UMR-106) az oszteogenezis során az exogén PACAP fokozza a BMP-k és egyik fő receptorának (BMPRI) expresszióját.

A mineralizációban és morfológiában tapasztalt eltérések esetén kérdéses, hogy a fogakban mért különbség a génhíányos csoportban a PACAP hiányának direkt hatása, vagy az egyéb fiziológiás funkciókban bekövetkezett változások következménye-e. Kutatócsoportunk PACAP-génhíányos csoportban lassabb súlynövekedést figyelt meg. Ugyanebben a vizsgálatban a metszőfogak korábbi előtörését tapasztaltuk a génhíányos csoportban. Bár ezek alapján feltételezhető, hogy a PACAP hiánya indirekten befolyásolja a fogak fejlődését, a hét napos egereken a fogfejlődésben résztvevő jelátviteli útvonalakon végzett immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei direkt hatást igazolnak.

Kutatásainkkal elsőként sikerült igazolni, hogy az endogén PACAP hiánya eltérésekhez vezet a fogak fejlődésében, mineralizációjában. Megállapításunk, hogy az endogén PACAP hatással van a fogfejlődésre, nem meglepő annak tükrében, hogy a PACAP fontos szerepet játszik az idegrendszer fejlődésében, és a fogak egyes részei (dentin, cement pulpa, és parodontális struktúrák) is a neuroectodermából fejlődnek.

Összefoglalás

Munkánk során a következő új eredményeket mutattuk ki a homzigóta PACAP-génhiányos és vad-típusú egerek fogfejlődésének összehasonlítása során:

1. Morfometriai mérés alapján hét napos homzigóta PACAP-génhiányos egerek moláris fogaiban a dentin fejlődése elmarad a vad-típusú alomtestvérek moláris fogaihoz képest.
2. Strukturálisan Raman mikroszkópiával eltérés mutatkozott a hét napos vad-típusú és génhiányos egerek moláris fogainak zománcában és dentinjében.
3. A hét napos egerek immunhisztokémiai vizsgálatával az SHH jelátviteli útvonalban eltérés mutatkozott. A génhiányos csoportban fokozottabb SHH/PTCH1/Gli1 expressziót találtunk, mely az irodalommal összhangban van, mely szerint a PACAP antagonizálja az SHH jelátviteli útvonalat.
4. Felnőtt (1 éves) egerek vizsgálata során mikro-CT-vel végzett morfometriai összehasonlítással eltérést találtunk a fogak méretében, a pulpa méretében, a dentin denzitásában. A homzigóta PACAP-génhiányos egerek alsó metszőfogai szignifikánsan kisebbek, a pulpa a dentinhez viszonyítva kisebb és a dentin denzitása alacsonyabb a vad-típusú egerekhez képest.
5. Strukturális vizsgálattal a metszőfogak dentinjében magasabb karbonát tartalmat, nagyobb fokú rendezetlenséget találtunk. A dentin fehérjék összehasonlítása során a homzigóta PACAP-génhiányos egerekben alacsonyabb fokú diverzitást találtunk a másodlagos struktúrában.

További céljaink vizsgálni a PACAP és a fogfejlődésben résztvevő jelátviteli útvonalak összefüggéseit, illetve a PACAP anti-inflammatorikus és antiapoptotikus hatásait a fogak pulpájában.

7. Közlemények

7.1. PhD értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

Sandor B, Fintor K, Felszeghy S, Juhasz T, Reglodi D, Mark L, Kiss P, Jungling A, Fulop BD, Nagy AD, Hashimoto H, Zakany R, Nagy A, Tamas A (2014) Structural and morphometric comparison of the molar teeth in pre-eruptive developmental stage of PACAP-deficient and wild-type mice. *J Mol Neurosci.* 54:331-341. (IF: 2.343)

Sandor B, Fintor K, Reglodi D, Fulop DB, Helyes Z, Szanto I, Nagy P, Hashimoto H, Tamas A (2016) Structural and morphometric comparison of lower incisors in PACAP-deficient and wild-type mice. *J Mol Neurosci.* 59:300-308. (IF: 2.229)

Reglodi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gabriel R, Horvath G, Szakaly P, Sandor B, Lubics A, Laszlo E, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, Helyes Z, Welke L, Lakatos A, Tamas A. (2012) PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. *J Mol Neurosci.* 48:482-492. (IF: 2.293)

7.2. Egyéb közlemények

Farkas J, Sandor B, Tamas A, Kiss P, Hashimoto H, Nagy AD, Fulop BD, Juhasz T, Manavalan S, Reglodi D (2017) Early neurobehavioral development of mice lacking endogenous PACAP. *J Mol Neurosci.* 61:468-478. (IF:2.229²⁰¹⁶)

Szanto I, Mark L, Bona A, Maasz G, Sandor B, Gelencser G, Turi Z, Gallyas F Jr (2012) High-throughput screening of saliva for early detection of oral cancer: a pilot study. *Technol Cancer Res Treat.* 11:181-188. (IF: 1.962)

8. Köszönetnyilvánítás

Hálámat és köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, **Dr. Tamás Andrea** egyetemi docensnek és **Dr. Nagy Ákos** egyetemi docensnek, továbbá a MTA PACAP Kutatócsoport vezetőjének és a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar Anatómiai Intézet vezetőjének, **Prof. Dr. Reglódi Dórának** támogatásukért és kutatásaim során, valamint dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom **Dr. Fintor Krisztiánnak**, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar, Ásványtani, Geokémiai és Kőzettani Tanszék tudományos munkatársának; **Dr. Juhász Tamás** egyetemi adjunktusnak és **Dr. Felszeghy Szabolcs** egyetemi docensnek a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetéből, **Dr. Papp Tamás** a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Radiológiai Klinika rezidens orvosának; **Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna** egyetemi tanárnak, **Dr. Nagy Péternek** és **Kiss Tamásnak** a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet és Szentágothai János Kutatóközpont munkatársainak; **Dr. Márk László** egyetemi docensnek a PTE Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet munkatársának, **Dr. Markovics Dórának** a PTE ÁOK Fogászati és Szájsebészeti Klinika egyetemi tanársegédének, **Dr. Hani Eszter** fogorvosnak, szerzőtársaimnak, és a PTE ÁOK Anatómiai Intézet dolgozóinak.

Szeretném, megköszöni a Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Fogászati és Szájsebészeti Klinika Gyermekfogászati Osztálya dolgozóinak támogatásukat és megértésüket.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni feleségemnek és gyermekeimnek, Gergőnek és Pannának szeretetüket, támogatásukat és türelmüket.

Támogatások:

OTKA K104984, PD109644, NKFI K119759 TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 „Nemzeti Kiválóság Program” TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0024; Arimura Alapítvány; Bolyai Ösztöndíj; MTA-PTE „Lendület Program”; Debreceni Egyetem belső kutatási pályázata (RH/885/2013); GINOP-2.3.2-15-2016-00050 “PEPSYS”; UNKP-16-4-IV Új Nemzeti Kiválóság Program a Nemzeti Erőforrás Minisztérium Támogatásával; MTA TKI 14016 Program.