

SZENT ISTVÁN EGYETEM
Állatorvos-tudományi Kar, Budapest

**THE GONADOTROPIN SURGE: ON THE ROLE OF ESTROGEN-
INDUCED SYNAPTIC PLASTICITY AND RAPID, NON-GENOMIC
REGULATORY MECHANISMS**

Doktori értekezés tézisei

Készítette:
Dr. Zsarnovszky Attila

Témavezető:
Dr. Sótonyi Péter

Budapest
2006

SZENT ISTVÁN EGYETEM
ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Iskolavezető:

Dr. Rudas Péter, az MTA doktora

Egyetemi tanár, tanszékvezető

SZIE-ÁOTK Élettani és Biokémiai Tanszék

Témavezető:

Dr. Sótonyi Péter, Kandidátus,

Egyetemi tanár, tanszékvezető

SZIE-ÁOTK Anatómiai és szövettani Tanszék

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezető	3
Célkitűzések	4
Anyag és módszerek	6
Eredmények	6
Megbeszélés	7
Új tudományos eredmények	9
Publikációk	10

Bevezető

Az emlősök reprodukív folyamatait hypothalamicus folyamatok szabályozzák. Nőivarúakban a reprodukív működések ciklicitása a neuroendokrin hypothalamusnak a fluktuáló ösztrogénszintre (E_2) adott válaszreakciójától, illetve a petefészkeknek a fluktuáló gonadotropinszintre adott válaszreakciójától függ. E ciklikus és egyben reciprok működés egymást váltó negatív- és pozitív feedback-elvű szabályozó mechanizmusok irányítják. A pozitív feedback kiesése az ovuláció hiányát és sterilitást eredményez. Az E_2 gonadotropin-felszabadulásra kifejtett hatását a mediobasal hypothalamus (MBH) egy komplex neuronális köre szabályozza.

A serkentő aminosavak (excitatory amino acid, EAA) által kiváltott neurotranszmisszió a gonadotrop-hormon serkentő hormon rendszerének meghatározó komponense. Mindazonáltal az ebben résztvevő neuronhálózat belső kapcsolatmintája kevésbé ismert. Jelen dolgozat első célja ezért annak meghatározása, hogy vajon AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) receptorok – az aszpartát/glutamáterg beidegzés indikátoraiként – jelen vannak-e a nucleus arcuatus (AN) főbb (neuropeptide-Y- (NPY), galanin- (GAL) és tyrosine-hydroxylase- (TH) tartalmú) neuron-populációiban.

Kísérleteink eredményei szerint a serkentő hatású aszpartáterg/glutamáterg rendszer közvetlen szerepet játszik az említett neuropeptid-tartalmú AN neuronok, de nem az MBH TH-immunoreaktív sejtjeinek működésére.

Korábbi adatok szerint egy E_2 által indukált szinaptikus plaszticitás (EISP) része az E_2 hypothalamicus neuronokra kifejtett szabályozó hatásainak. Hogy az EISP szabályozó mechanizmusát jobban megérthessük, azonosítottuk az EISP-ben résztvevő neuronokat, és az eredményeket összevetettük a szimultán zajló plazma E_2 és LH- (luteinizáló hormon) koncentráció-változásokkal. Az eredmények szerint majmokban (*Cercopithecus aethiops*) az E_2 az MBH axo-szomatikus szinapszisainak egy meghatározott mintájú számváltozását idézi elő, melynek meghatározó szerepe van a gonadotrop hormon-serkentő hormon (GnRH) felszabadulás szabályozásában.

Az MBH neuronjainak E₂-érzékenységét azok E₂ receptor-expressziójával magyarázzák. Mindazonáltal az előagy néhány E₂-függő, az ovariális ciklus közepén bekövetkező szabályozó mechanizmusa főként gyors és rövid ideig tartó folyamatokkal hozható összefüggésbe, melyek a pozitív feedback folyamán játszódnak le. Ezek az MBH neuronokban lejátszódó folyamatok már az E₂-hullámot követő percekben végbemennek, és lefolyásukat a génaktiválást megelőző szignálórendszerek mediálják. Ilyen rapid jellegű E₂-indukált hatásokat több agyterületen is megfigyeltek. Kísérleteiben fejlődő- és kifejlett kisgyi modellben (ellentétben a legtöbb agyterülettel, sem a fejlődő, sem pedig a kifejlett kisgyiban nem mutattak ki aromataz-aktivitást) vizsgáltuk az E₂ - egyébként az MBH-ban is megtalálható - ERK1/2-rendszerre kifejtett (extracellularly regulated kinases 1 and 2) rapid moduláló hatását.

In vitro és in vivo kísérleteink bizonyították, hogy az E₂ rapid módon képes a neuronok - nagy valószínűséggel az MBH esetében is - ERK-szignáló rendszerét modulálni.

Célkitűzések

1. A serkentő neurotranszmisszió által is szabályozott MBH neuronok karakterizálása nőstény patkényban:

- a.** A GluR1 és GluR2/3 AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) receptorok (mint az aszpartáterg/glutamáterg beidegzés indikátorai) immunohisztokémiai meghatározása a nőstény patkány nucleus arcuatusában;
- b.** Az AMPA receptorok neuropeptide-Y (NPY), galanin (GAL) and tyrosine-hydroxylase-zal (TH) történő ko-lokalizálása;
- c.** Az EAA-neurotranszmisszió hatásának megítélése a neuroendokrin hypothalamusban;

- 2.** Az EISP majom és patkány AN-ában történő kimutatása és analízise:
 - a.** Az EISP-ben résztvevő neuronok azonosítása;
 - b.** A GnRH- és egyéb neuronokon lévő szinapszisok számának meghatározása ovariektomizált, valamint ovariektomizált és E₂-kezelt majmokban;
 - c.** Az AN GAD-IR (glutamic-acid-decarboxylase-immunoreactive) GABAerg gátló sejtjein található szinapszisok számának meghatározása majmokban;
 - d.** Az EISP gonadotropin-felszabadulásban játszott szerepének elemzése;

- 3.** A gyors, nem-genomiális E₂-hatások meghatározása és karakterizálása nem-endokrin neuronokban: E₂-indukálta rapid ERK1/2-moduláló hatások a patkány cerebellumában:
 - a.** Rapid E₂-hatások meghatározása primér neuron-tenyészetben;
 - b.** Az aktivált ERK1/2-rendszer térbeli és időbeli megoszlásának meghatározása patkány cerebellumában;
 - c.** Az E₂ ERK1/2-re kifejtett direkt aktiváló hatásának meghatározása a patkány cerebellumában in vivo: a koncentráció és a kor szerepének elemzése.

Anyag és módszerek

Immunhisztokémiai módszereket alkalmaztunk a GluR1 és GluR2/3 AMPA receptorok kimutatásához, valamint ezek NPY-al, GAL-al és TH-al történő ko-lokalizálásának meghatározásához. A ko-lokalizáció mértékét sztereológiai módszerekkel határoztuk meg.

Elektron mikroszkópos vizsgálattal kiegészített immunhisztokémiai módszereket alkalmaztunk a hypothalamusban végbemenő EISP megállapításához.

Idegsebészeti beavatkozásokkal kiegészített immunhisztokémiai- és különböző in vitro laboratóriumi módszereket alkalmaztunk a genomiális és rapid, nem-genomiális E₂-hatások meghatározásához a kisagy neuronjaiban.

Eredmények

A neuroendokrin hypothalamus különböző ionotróp AMPA-típusú glutamát receptorainak meghatározása révén két fő neuron-populációt mutattunk ki az AN-ben: az egyik AMPA receptorok által mediált EAA neurotransmisszió direkt hatása alatt áll, míg a másik, dopaminerg sejjpopuláció nem rendelkezik AMPA receptorokkal.

Kimutattuk, hogy az E₂ jól meghatározott mintájú változást idéz elő a neuronendokrin hypothalamus szinaptológiájában, és azt is kimutattuk, hogy az AN egy GABAerg neuronpopulációja az, amelyik a gonadotropin feedback folyamán részt vesz az EISP-ben.

Ugyancsak kimutattuk, hogy a pozitív gonadotropin feedback során lejátszódó folyamatok részeként az ERK1/2 MAPK szignáló-rendszer nagy valószínűséggel szerepet játszik a rapid, nem-genomiális E₂-hatások mediálásában. Hogy elkerüljük a “de novo” E₂-szintézis zavaró hatásait, az említett eredményekhez az agy egy nem-endokrin területének vizsgálataútján jutottunk, és kimutattuk, hogy az E₂ képes az ERK-rendszer rapid modulálására. In vitro egyértelműen különválasztottuk a gyors, nem-genomiális valamint a “lassú”, E₂ receptorok által mediált E₂-hatásokat.

In vivo körülmények között gyors ERK-aktiváló hatása időben egybeesett a fejlődő kisagyban zajló szinaptogenezissel és szinaptikus éréssel. A kifejlett kisagyban az E₂ ERK-aktiváló hatása nagy valószínűséggel a cerebellum belső neuronköreinek működését illetve az ezek útján történő információ-áramlást befolyásolja.

Megbeszélés

Kísérleteink konklúziójaként egy az ovulációhoz vezető, LH-hullámot szabályozó neuronális és celluláris szabályozó mechanizmus-modellt állítottunk fel. E mechanizmus-modellt mind a jelen kísérleti eredmények, mind pedig az eddig elvégzett előkísérletek és a vonatkozó szakirodalom alátámasztják.

Az ösztroz ciklus szakaszainak legnagyobb részében a hypothalamicus GnRH- (és hypophysealis LH) felszabadulás egy E₂-érzékeny neuronhálózat negatív feedback-szabályozása alatt áll. A ciklus-középi E₂-hullám idején, a késői proösztrozskor, a vér E₂-koncentrációja élesen emelkedik, és gyors lefolyású folyamatok játszódnak le. A cerebellumban végzett kísérleteink szerint a közvetlen E₂-hatások mind idő, mind pedig koncentráció-függőek.; ezenfelül a korai rapid hatások egy biomodális koncentráció-függőséget is mutatnak. Eredményeink szerint a kulcsfontosságú E₂-indukálta hatások, melyek a negatív feedback-et a pozitív feedback-be fordítják, az intracelluláris szignálórendszerek, köztük az ERK1/2 MAPK rendszer aktiválásában manifesztálódnak. A gyors ERK-aktiválás egyúttal különféle módokon serkenti a glutamáterg neurotranszmissziót, például bizonyos citoskeletális struktúrák szintézise révén, melyek a serkentő szinapszisok poszt-szinaptikus szerkezetének funkcionális elemei. Ezzel egyidejűleg a gyorsan emelkedő plazma E₂-szint megemeli az EAA receptorok (AMPA) expresszióját. Korábbi eredmények bizonyították, hogy a glutamáterg neurotranszmisszió (mely a pozitív feedback elindításáért felelős) a hypothalamicus GABAerg sejtekben (melyek egyúttal AMPA-pozitívak és az egyedüli sejtpopuláció, amelyben az EISP megfigyelhető) következik be. Mindazonáltal, amint előbb említve lett, egy másik sejt-populáció, a dopaminerg (DAerg) sejtek azok, amelyek a hypothalamus beta-endorphin (beta-END) sejtjein végződve azokat gátolni tudják akkor, amikor ők maguk felszabadulnak a gátló hatások alól.

Ezért, a hypothalamus eddig ismert neuronális kapcsolatmintája alapján a legvalószínűbb, hogy a kezdeti EAA neurotranszmisszió hatására a GABA sejtek egy csoportja más, szekunder GABA sejteket gátol, melyek viszont felszabadítják a DAerg sejteket a korábbi gátló hatás alól; Ennek következményeként a DAerg sejtek gátolni képesek a beta-END neuronokat, melyek pedig megszüntetik addigi, a mediális preoptikus régióban (patkányban) vagy az AN-ben (primátesekben) helyeződő GnRH sejtekre kifejtett gátló hatásukat. Ez végül hypothalamicus GnRH és hypophyseális LH-felszabadulást eredményez. E gyors változásoknak a részeként és eredményeként is a pozitív feedback tartama alatt a hypothalamicus szinapszisoknak a száma gyorsan növekszik.

Eközben a plazma E_2 -koncentrációja tovább növekszik, az E_2 pedig hozzákapcsolódik a specifikus receptoraihoz ($ER\alpha$) az AN neuronjaiban. Az E_2 -ER komplex transzaktiváló hatására a hypothalamicus szinapszisok számának kezdeti növekedése megáll, majd csökkenésbe vált. E szinapsziszám csökkenés tovább folytatódik, miközben a plazma E_2 -szintje is esni kezd. A szinapsziszám-emelkedés csökkenésbe való átváltását a rapid E_2 -hatások megszünte előzi meg, ami a pozitív feedback negatív feedback-be való átváltását eredményezi. A negatív feedback során megfigyelt jellegzetes szinapsziszám-változás arra enged következtetni, hogy az E_2 az, amely az AN GABA neuronokon lejátszódó szinaptikus plaszticitást irányítja, míg az ennek következtében a GnRH sejteken lejátszódó szinaptikus plaszticitás felelős a hypohpyiseális LH-felszabadulás indukálásáért.

Arra a kihívó kérdésre is megpróbáltunk választ találni, hogy mi lehet az oka annak, hogy az E_2 szelektíven, az AN-nak csak bizonyos ER-tartalmú sejtjein indukál szinaptikus plaszticitást, míg más sejteken, még ha rendelkeznek is ER-ral, nem változtatja meg a szinapszisok számát: Az EISP-ben résztvevő sejtek kell, hogy rendelkezzenek mind a pozitív feedback (gyors second messenger rendszer), mind pedig az ER-mediálta negatív feedback eseményeihez szükséges molekula-arsenállal.

Membrán-impermeabilis bovine serum albuminhoz (BSA) konjugált E_2 alkalmazásával in vitro bizonyítottuk, hogy az E_2 rapid ERK-aktiváló hatását plazmamembránba épült ER mediálja, mely receptornak a szerkezetét azonban még nem sikerült megállapítani. Mások kutatásai is valószínűsítik membrán-ER-ok létezését a hypothalamusban.

Laboratóriumunk jelenlegi kutatásai többek között arra irányulnak, hogy azonosítsák azon membrán ER-okat, amelyek a pozitív gonadotropin feedback indukálásáért, és következményesen a hypophysealis gonadotrop-hullám kiváltásáért felelősek

Új tudományos eredmények

Az elvégzett kísérlet sorozatban:

- azonosítottuk azokat az AN neuronokat, amelyek EAA neurotranszmisszió hatása alatt állnak;
- azonosítottuk azokat az AN neuronokat, amelyek részt vesznek az EISP-ben;
- meghatároztuk az AN neuronok szinaptikus státusát a gonadotropin feedback tartama alatt;
- kiértékeljük az EISP-nek a gonadotropin-felszabadulás szabályozásában játszott szerepét;
- kimutattuk, hogy in vitro, az E₂ modulálja az ERK1/2 MAPK szignálórendszert neuronokban;
- meghatároztuk a cerebelláris ERK1/2-aktiválás térbeli és időbeli aspektusait;
- kimutattuk, hogy in vivo az E₂ modulálni képes a neuronális ERK1/2 MAPK szignáló rendszer rapid aktiválását.

Publikációk

- 1)** Hajos F, Zilles K, **Zsarnovszky A**, Sotonyi P, Gallatz K, Schleicher A. (1998) Modular distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat barrel cortex: changes induced by neonatal removal of vibrissae. *Neuroscience*. 85 (1): 45-52.
- 2)** **Zsarnovszky A**, Scalise TJ, Horvath TL, Naftolin F. Estrogen effects on tyrosine-hydroxylase-immunoreactive cells in the ventral mesencephalon of the female rat: further evidence for the two cell hypothesis of dopamine function. *Brain Research*. 868 (2): 363-366, 2000.
- 3)** **Zsarnovszky A**, Horvath TL, Naftolin F, Leranath L. (2000) AMPA-receptors colocalize with neuropeptide Y- and galanin-containing, but not with dopamine neurons of the female rat arcuate nucleus: a semiquantitative immunohistochemical colocalization study. *Experimental Brain Research*. 133 (4): 532-537.
- 4)** **Zsarnovszky A**, Horvath TL, Garcia-Segura LM, Horvath B, Naftolin F. (2001). Oestrogen-induced changes in the synaptology of the monkey (*Cercopithecus aethiops*) arcuate nucleus during gonadotropin feedback. *Journal of Neuroendocrinology*. 13 (1): 22-28.
- 5)** Szalay F, **Zsarnovszky A**, Fekete S, Hullar I, Jancsik V, Hajos F. (2001) Retarded myelination in the lumbar spinal cord of piglets born with spread-leg syndrome. *Anatomy and Embriology*. 203: 53-59.
- 6)** **Zsarnovszky A**, Szalay F, Hajos F. (2001) Meningeal allografts of the 6-day-old rat pineal: a model for a pineal deprived of intracerebral innervation. *Neurobiology*. 9 (1): 23-30.
- 7)** **Zsarnovszky A**, Belcher SM. (2001) Identification of a developmental gradient of estrogen receptor expression and cellular localization in the developing and adult female rat primary somatosensory cortex. *Developmental Brain Research*. 129 (1): 39-46.
- 8)** Belcher SM, **Zsarnovszky A**. (2001) Estrogenic actions in the brain: Estrogen, phytoestrogens and rapid intracellular signaling mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 299 (2) 408-414.

- 9) Zsarnovszky A, Smith T, Hajos F, Belcher SM. (2002) Estrogen regulates GFAP-expression in specific subnuclei of the female rat interpeduncular nucleus: a potential role for estrogen receptor beta. Brain Research. 958 (2): 488-496.**
- 10) Parducz A., Zsarnovszky A, Naftolin F., Horvath TL. (2003) Estradiol affects axo-somatic contacts of neuroendocrine cells in the arcuate nucleus of adult rats. Neuroscience. 117 (4): 791-794.**
- 11) Wong JK., Le HH., Zsarnovszky A, Belcher SM. (2003) Estrogens and ICI182,780 (Faslodex) modulate mitosis and cell death in immature cerebellar neurons via rapid activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase. The Journal of Neuroscience. 23 (12): 4984-4995.**
- 12) A. Zsarnovszky, S.M. Belcher (2004) Spatial, temporal, and cellular distribution of the activated extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in the developing and mature rat cerebellum. Dev. Brain Res. 150 (2): 199-209.**
- 13) Kirby M, Zsarnovszky A, Belcher SM. (2004) Estrogen receptor expression in a human primitive neuroectodermal tumor cell line from the cerebral cortex: estrogen stimulates rapid ERK1/2 activation and receptor-dependent cellular migration. Biochemical and Biophysical Research Communications 319: 753-758.**
- 14) A. Zsarnovszky, H. H. Le, H.-S. Wang, S. M. Belcher (2005) Ontogeny of rapid estrogen-mediated ERK1/2 signaling in the rat cerebellar cortex in vivo: potent non-genomic agonist and endocrine disrupting activity of the xenoestrogen bisphenol A. Endocrinology. 146 (12): 5388-5396.**
- 15) Naftolin F, Garcia-Segura LM, Zsarnovszky A, Demir N, Fadiel A, Horvath T. The estrogen-induced gonadotrophin surge (EIGS). AR Genazzani, J Schenker J, Artini PG, T Simoncini (Eds.): Human Reproduction: 12th World Congress, Venice, March 10-13, 2005, Rome, CIC Edizioni Internazionali, pp188-97, 2005.**
- 16) S. M. Belcher, A. Zsarnovszky, P.A. Crawford, H. Hemani, L. Spurling, T.L. Kirley (2005) Immunolocalization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (NTPDase3) in rat brain: implications for modulation of multiple homeostatic systems including feeding and sleep-wake behaviors. Neuroscience. 137 (4): 1331-1346.**

Orális publikációk

- 1) Zsarnovszky A, Horvath TL, Garcia-Segura LM, Horvath B, Naftolin F. (2000) Plasticity of the hypothalamic GABA system and its relationship to GnRH neurons during positive gonadotrophin feedback in non-human primates. Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Abstract.**
- 2) Zsarnovszky A, Horvath TL, Garcia-Segura LM, Horvath B, Naftolin F. (2000) Plasticity of the hypothalamic GABA system and its relationship to GnRH neurons during positive gonadotrophin feedback in non-human primates. Annual Meeting of the Endocrine Society, Abstract.**
- 3) Zsarnovszky A, Horvath TL, Garcia-Segura LM, Horvath B, Naftolin F. (2000) Estrogen-induced changes in the synaptology of the monkey (Cercopithecus Aethiops) Arcuate nucleus. Annual Meeting of the Endocrine Society, Abstract.**
- 4) Zsarnovszky A, Belcher SM. (2001) Estrogen receptor β (ER β) in the female rat barrelfield: developmental and functional concerns. Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Abstract.**
- 5) Zsarnovszky A, Belcher SM. (2003) Estrogen rapidly modulates the phosphorylation of ERK1/2 in the rat cerebellum in vivo. Abstract. 33rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience.**
- 6) Belcher SM, Zsarnovszky A. (2003) Distribution of activated extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in the developing and mature rat cerebellum. Abstract. 33rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience.**
- 7) Zsarnovszky A, Belcher SM (2004) Comparative analysis of rapid estrogen and bisphenol A activation of ERK-signaling in rat cerebellar neurons. Abstract. 34th Annual Meeting of the Society for Neuroscience.**
- 8) Zsarnovszky A (2005) The mechanism of endogenous and exogenous estrogen effects on reproductive biology. 16th Annual Meeting of the Hungarian Association for Buiatrics (Balatonfüred).**

