

A nesfatin-1/NUCB2 szerepének vizsgálata a központi idegrendszerben

Doktori tézisek

Könczöl Katalin

Semmelweis Egyetem

Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Tóth Zsuzsanna, Ph.D.

Hivatalos bírálók:

Dr. Hrabovszky Erik, D.Sc.
Dr. Kocsis Katalin, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Köves Katalin, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Papp Edit, Ph.D.
Dr. Oláh Márk, Ph.D.

**Budapest
2014**

1. BEVEZETÉS

Az élőlények számára az energiaegyensúly megteremtése alapvető jelentőségű. Az állatok az életfunkcióik fenntartásához (alapanyagcsere) az energiát az elfogyasztott táplálékból nyerik, aminek egy részét hő és mozgási energia formájában leadják. Amennyiben az energia bevitel nagyobb, mint az elhasznált mennyiség, az hízáshoz vezet, fordított esetben testsúlycsökkenés jön létre. Mind az elhízás, mind a kóros soványság veszélyezteti az egészséget, és számos betegség rizikófaktorát jelenti.

Az energia bevitel táplálékfelvétellel történik, melynek szabályzásában több tényező is szerepet játszik. A szervezet energetikai állapotáról és a gyomor teltségéről humorális és idegi úton az információ a központi idegrendszerbe jut. A különböző információk feldolgozását és integrálását legfelsőbb szinten a hypothalamus végzi. A hypothalamuson belül az információközvetítést az idegsejtek által termelt különböző orexigén (táplálékfelvételt serkentő) és anorexigén (táplálékfelvételt csökkentő) neuropeptidok biztosítják. A kimenet az endokrin, és az autonóm idegrendszeren keresztül valósul meg, de a hypothalamus a kortikolimikus jutalomrendszerrel is kapcsolatban áll.

A bevitt energia nagy része az alapanyagcsereére fordítódik. Az alapanyagcserét a hypothalamo-hypophysis-pajzsmirigy tengely szabályozza. Ennek kiinduló pontja a hypothalamus paraventricularis

magjának (PVN) tireotropin-felszabadító hormon (TRH) termelő sejtjei.

Energia leadás ezen felül fizikai aktivitás és hőtermelés útján is megvalósulhat. A hőszabályozás központja szintén a hypothalamusban található. Meleg hatására a hőleadás nő; kitágulnak a bőr erek, megindul a nyáleválasztás és verejtékezés. Hideg környezetben a bőr erek szűkülnek, a szőr felborzolódik, így a hővesztés csökken, didergéssel illetve a barnazsír szövet (BAT) aktivációja által pedig hőtermelés történik. A hőszabályozás szempontjából fontos átkapcsoló állomás a medullaris raphe pallidus (RPa) és raphe obscurus (Ro) mag, ahol szerotonin tartalmú szimpatikus premotor neuronok találhatóak, melyek szabályozzák a bőrereket, az izmokat és a BAT-ot.

Az energiaháztartást bonyolult rendszer felügyeli, egyensúlyi értékét egyes tényezők, mint például a stressz, képesek eltolni. A stressz információk többsége a nyúltvelői A1 (ventrolateralis medulla-VLM területén) és A2 (nucleus tractus solitarii-NTS és nucleus motorius nervi vagi területén) catecholamin sejtcsoporton keresztül éri a PVN-be jut. Az információt a PVN integrálja, majd kétféle válaszreakció indul el a szervezetben. Egyrésztől aktiválódik a hypothalamo-hypophysis-mellékvese tengely, melynek központja a PVN kortikotropin-felszabadító hormon (CRH) termelő neuron csoportja, másrésztől aktiválódik a szimpatikus idegrendszer.

Vizsgálataink középpontjában az energiaegyensúlyt szabályzó komplex rendszernek egy újabb tagja állt. Ez a fehérje az anorexigén nesfatin-1, mely egy nagyobb prekursor molekula, a nucleobindin2 (NUCB2) N-terminálisan elhelyezkedő szekretálódó darabja. Mind a központi idegrendszerben, mind a periférián szélesen elterjedt fehérje, és számos neurotranszmitterrel kolokalizál, többek között CRH-val és TRH-val a PVN-ben, szerotoninnal a RPa-ban, továbbá tirozin-hidroxilázzal (katekolamin sejtek markere) a NTS területén. Központi idegrendszeri elterjedése alapján feltételeztük, hogy a nesfatin-1/NUCB2 nemcsak a táplálékfelvétel csökkentésében játszik szerepet, hanem az energiaháztartás szabályozás egyéb aspektusaiban is részt vesz.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A kísérletek során a következő kérdésekre kerestünk választ:

I.)

1. Milyen a nesfatin-1 hatásainak az időbeli lefutása?
2. Hat-e a nesfatin-1 a patkányok hőháztartására?
3. Hideg környezet hatására aktiválódnak-e a nesfatin-1/NUCB2-t expresszáló sejtek?

II.)

4. A nesfatin-1/NUCB2-t termelő sejtekre hat-e a restraint stressz?
5. Képes-e az exogen nesfatin-1 közvetlenül, vagy közvetve befolyásolni a HPA-tengely aktivitását?
6. A nesfatin-1/NUCB2 expresszióját a PVN-ben befolyásolja-e a negatív glükokortikoid feedback?

3. MÓDSZEREK

A kísérletekben 250-300g súlyú hím, Wistar patkányokat használtunk. A kísérleteket a Semmelweis Egyetem Egyetemi Állatvédelmi Szabályzatának figyelembe vételével, valamint a Fővárosi Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás 1894/003/2004 számú engedélyével végeztük.

A nesfatin-1 hatásainak dinamikáját, intracerebroventricularis (icv) beadást követő telemetriás mérések segítségével határoztuk meg. Ennek során detektáltuk az állatok mozgékonyágát, testhőmérsékletét, szívfrekvenciáját, táplálékfelvételük gyakoriságát. A megfigyeléseket két napig végeztük, ez idő alatt az állatok testtömegét és grammban mért napi táplálék- és vízfogyasztását naponta mértük.

Következő lépésben a patkányokat két órás, hideg stressznek (4°C) vetettük alá. Ezt követően a nesfatin-1/NUCB2-t expresszáló

sejtek aktivációját Fos immunhisztokémiával vizsgáltuk. Ezen felül a PVN területén nesfatin-1/NUCB2, prepro-TRH, Fos tripla immunfestést alkalmaztunk. Kontroll állatok metszeteit használtuk a medullaris RPa és Ro magokon végzett prepro-TRH és nesfatin-1/NUCB2 dupla immunfestésekhez.

Az exogen nesfatin-1 HPA-tengelyre gyakorolt hatását icv beadást követően az ACTH és kortikoszteron szintek változásának időbeli nyomonkövetésével monitoroztuk. Második lépésként hypophysis sejtenyészeteket kezeltünk nesfatin-1-el, majd az ACTH leadást vizsgáltuk. Az hormon szinteket radiimmunoassay-vel határoztuk meg.

Az endogen nesfatin-1/NUCB2 stresszben betöltött szerepét 4 órás restraint stressz után vizsgáltuk. Quantitatív *in situ* hibridizációs technikával meghatároztuk a nesfatin-1/NUCB2 mRNS expresszió változását a PVN, valamint az A1 és A2-sejtcsoportban. Ugyanezen területeken a neuronális aktivációt nesfatin-1/NUCB2 és Fos dupla immunhisztokémiával tanulmányoztuk.

Végül a nesfatin-1/NUCB2 mRNS expresszió negatív glükokortikoid feedbackre való érzékenységét teszteltük bilaterális adrenalektómiát követően (1 hét) a PVN-ben quantitatív *in situ* hibridizációval.

4. EREDMÉNYEK

A telemetriás transzmitterek segítségével begyűjtött adatok rávilágítottak, hogy a nesfatin-1 anorexigén hatása hosszú távú. A nesfatin-1 kezelés (25pmol), mind a nappali, mind az esti periódus elején alkalmazva csökkentette az éjszakai táplálékfelvétel időtartamát (a patkányok éjszakai állatok, a sötét periódusban aktívak) a megfigyelés időszakába eső (48 óra) mindkét éjszakai fázisban. A napi tápfogyasztás grammokban mért mennyisége alapján megállapítottuk, hogy az esti beadást követő első 24 órában lecsökkent táplálékfelvételt a második 24 órában kompenzáció követte. A nappali beadás után nem láttunk szignifikáns különbségeket. A vízfogyasztás az első napon erőteljesen lecsökkent, és ezt mind a nappali, mind az esti beadást követően az állatok másnap pótolták. A testsúlyváltozások követték a táp- és vízfogyasztásban tapasztalt tendenciákat, de egyik esetben sem érték el a szignifikancia küszöböt.

A testhőmérsékletre vonatkozó adatok elemzése a nesfatin-1 hőmérsékletemelő hatását mutatta ki, mely a nappali beadást követően 1,5 órával lett kifejezettebb. Éjszakai beadás esetén ez a hatása azonnal jelentkezett. Mindkét kísérleti felállás esetében a kezelt és a kontroll állatok közötti különbség a nappali periódusban volt a legjelentősebb, amikor a kezelt patkányok testhőmérséklete magasabb maradt, nem hűlt le a normális diurnális ciklusnak

megfelelően. Ezért a nesfatin-1 kezelt állatok testhőmérsékletének cirkadián görbéje lapítottabbá vált a kontroll állatokéhoz képest.

Megvizsgáltuk, hogy a testhőmérséklet adódhat-e a kezelt állatok nagyobb fizikai aktivitásából, de nem találtunk a lokomotoros tevékenység és a kezelés között összefüggést. A kezelés az állatok szívfrekvenciáját sem befolyásolta jelentősen.

A kísérletet megismételtük egy magasabb dózisu (100pmol) nesfatin-1 beadással. Ez esetben csak nappali kezelést végeztünk. A hatások ugyanazokat a tendenciákat mutatták, mint a kisebb dózis (25pmol) esetében, de sokszor felerősödtek, illetve előbb jelentkeztek.

Mivel a nesfatin-1 kezelés testhőmérséklet emelkedést okozott, megvizsgáltuk, hogy az agy nesfatin-1/NUCB2 termelő sejtjei milyen módon befolyásolhatják a termoregulációt. Az általunk alkalmazott hideg stressz (2 óra, 4°C) hatására neuronális aktivációt (Fos+) találtunk a hypothalamusban a nucleus supraopticusban paraventricularisban és arcuatusban, valamint az agytörzsben a nucleus Ro, RPa és az NTS területén.

Integráló szerepét figyelembe véve a PVN területén tripla immunhisztokémiás festést alkalmaztunk, ami feltárta, hogy számos aktiválódott nesfatin-1/NUCB2-t termelő sejt prepro-TRH-t is expresszál.

A dupla immunhisztokémia kimutatta, hogy a Ro és RPa-ban található nesfatin-1/NUCB2-t termelő sejtek szinte mindegyike prepro-TRH-t is tartalmaz.

Ismert tény, hogy a stressz is befolyásolja a táplálék felvételt, és ezen keresztül az energiaháztartást. Több olyan neuropeptid is ismert, mely mind a stresszben, mind a táplálkozásban szabályzó szereppel bír. Ennek tükrében megvizsgáltuk, hogy a nesfatin-1 szerepet játszhat-e a stresszválasz kialakításában.

Az exogen icv beadott nesfatin-1 (25pmol) az idő függvényében megemelte az állatok vérében keringő ACTH és kortikoszteron szinteket. Ezzel szemben nem hatott a hypophysis sejt kultúrák ACTH termelésére.

Az exogen beadott után, az endogen nesfatin-1 szerepét restraint stressz (4 óra) modellben elemeztük. A restraint stressz a parvocellularis PVN területén Fos expressziót indukált a nesfatin-1/NUCB2 termelő sejtekben, ugyanitt a megemelkedett a nesfatin-1/NUCB2 mRNS expressziója is. Az agytörzs területén csak a VLM-ban detektáltunk nesfatin-1/NUCB2 mRNS expresszió fokozódást, az NTS-ben nem. A vizsgált medullaris területeken neuronális aktivációt sem tapasztaltunk a restraint stressz hatására. Ennek oka lehet ezen területek PVN-hez képest eltérő reakcióideje a restraint stresszre.

Bilateralis adrenalektómiát követően a nesfatin-1/NUCB2 mRNA expresszió fokozódott a parvocellularis PVN hypotheseotroph areaiban.. Ennek mértéke a CRH termelő sejteket nagy számban tartalmazó medialis dorsalis alrégióban volt a legkifejezettebb. Igazoltuk tehát a negatív glükokortikoid feedback szabályzó hatását a PVN nesfatin-1/NUCB2 expresszáló sejtjeire.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatásaink alapján a következő megállapításokat tettük:

1. A nesfatin-1 hosszú távon hat a táplálékfelvételle, ez a hatása kölcsönhatásban áll a cirkadian ritmussal. A táp- és vízfogyasztás, valamint a testsúly napi alakulása egyszeri kezelés után azt jelzi, hogy testsúlycsökkentő hatást csak krónikus kezeléssel lehet elérni.
2. A nesfatin-1 emeli az állatok testhőmérsékletét, ennek időzítése szintén kölcsönhatásban áll az állatok cirkadian ritmusával. A testhőmérsékletet ugyancsak hosszú távon tudja befolyásolni. A testhőmérséklet nem az intenzívebb lokomotoros tevékenység miatt nő.
3. A nesfatin-1/NUCB2 sejtek megtalálhatóak a termoregulációs pálya kulcsfontosságú agyi területein, és hideg hatására aktiválódnak.

4. Restraint stresszt követően a PVN mediális parvocellularis szubdivíziójában a nesfatin-1/NUCB2 termelő sejtek aktiválódnak, illetve megnövekszik a nesfatin-1/NUCB2 mRNS expressziója is.
5. Restraint hatására a stresszinformáció továbbításában fontos VLM területén is megemelkedett a nesfatin-1/NUCB2 mRNS szintje.
6. Az exogen nesfatin-1 aktiválja a HPA tengelyt, de nem hat közvetlenül a hypophysis sejtek ACTH termelésére.
7. A nesfatin-1/NUCB2 mRNS expresszió a PVN hypophyseotrop areájában negatív glükokortikoid feedback szabályzás alatt áll.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertáció témájában megjelent publikációk:

Könczöl K, Bodnar I, Zelena D, Pinter O, Papp RS, Palkovits M, Nagy GM, Toth ZE. (2010) Nesfatin-1/nucb2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Neurochem Int*, 57: 189-197. IF: 3,601

Könczöl K, Pinter O, Ferenczi S, Varga J, Kovacs K, Palkovits M, Zelena D, Toth ZE. (2012) Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. *Int J Obes (Lond)*, 36: 1514-1521. IF: 5,221

A disszertációban fel nem használt publikációk:

Vas S, Ádori C, **Könczöl K**, Kátai Z, Pap D, Papp RS, Bagdy G, Palkovits M, Toth ZE. (2013) Nesfatin-1/NUCB2 as a potential new element of sleep regulation in rats. PLoS One 8(4): e59809. IF: 3,73