

Fajspecifikus és általános vonások azonosítása a kisspeptin neuronrendszer anatómiai felépítésében

Doktori értekezés tézisei

Rumpler Éva

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hrabovszky Erik, M.D., D.Sc.,
Csoportvezető kutató, tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Várnainé Dr. Tóth Zsuzsanna, Ph.D. tudományos főmunkatárs
Dr. Dénes Viktória, Ph.D. egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Alpár Alán, M.D., D.Sc., egyetemi tanár, igazgató

Tagok: Dr. Kovács Krisztina, D.Sc., csoportvezető, tudományos tanácsadó
Dr. Ruttkay Tamás, M.D., Ph.D., adjunktus

Budapest
2021

1. Bevezetés

A termékenység és a reprodukció szabályozását a hipotalamusz-adenohipofízis-gonád (HPG) tengely hormonjai végzik. A tengely felső szintjét képviselő hipotalamusz gonadotropin-releasing hormon (GnRH) idegsejtjei neurohormon terméküket szekréción pulzusok formájában ürítik az agyalapi mirigy mellső lebenyének portális keringési rendszerébe. Az adenohipofízis gonadotrop hormonjainak (luteinizáló hormon (LH), follikulus stimuláló hormon (FSH) elválasztása a GnRH szekréción mintázatának függvénye. Amennyiben a GnRH pulzusok elmaradnak, az FSH és LH szekréciónja is leáll. Az FSH és az LH a gonádok szintjén stimulálja az ivarsejtek fejlődését és serkenti a szexuálszteroidok (tesztoszteron, ösztrogén, progeszteron) elválasztását. Utóbbi nemi hormonok feedback mechanizmus révén modulálják a HPG tengely elsőbb szintjeit. A hipotalamikus feedback hatások érzékelésében és GnRH neuronok felé történő közvetítésében kitüntetett szereppel rendelkezik a kisspeptin (KP) termelő idegsejtek két fő populációnja.

A KP neuropeptid család a *KISS1* gén prohormon termékéből lehasadó, különböző hosszúságú peptideket foglalja magába. A kezdetben daganat metasztázis szuppresszorként azonosított peptidről csupán évekkel később derült ki, hogy szerepe nélkülözhetetlen a pubertás és a szaporodás központi idegrendszeri szabályozásában: a KP specifikus receptorát kódoló gén (*KISS1R*) vagy a *KISS1* gén inaktíváló mutáción emberben hipogonadotrop hipogonadizmust okoznak. A tünetegyüttes gén-kiütött egerben is megjelenik. Fokozott génaktiváción okozó mutáción ugyanakkor pubertás precocot vannak maguk után.

A KP/KP receptor szignalizáción elsősorban a hipofízis luteinizáló hormon szekréciónjának serkentésével hat a reprodukcion tengely működésére. A hatást hipotalamikus GnRH idegsejtek közvetítik, így a GnRH antagonistá előzetes adásával kivédhető. A GnRH idegsejtek valóban nyernek közvetlen beidegzést a centrális KP rendszerből, expresszálják a KP receptorát, és KP adására aktiválódva c-Fos expressziónt és depolarizációnt mutatnak. A KP neuronok egyik fő csoportja („KNDy” neuronok) az arcuatus idegmagban (ARC) helyezkedik el, és KP-en kívül a neurokinin B-t (NKB), a dinorfint (Dyn), valamint e két peptid receptorait is tartalmazza. A „KNDy” neuronok a negatív ösztrogén visszacsatolásban valamint a pulzatilis GnRH/LH szekréción mintázatának kialakításában játszanak kulcsszerepet. Rágcsálókban egy második jelentős KP neuroncsoport is előfordul a III. agykamra rosztrális periventrikuláris területén (RP3V). Az itt elhelyezkedő idegsejtek nemi dimorfizmust mutatnak (nagyobb sejtszámmal nőstényekben), és kitüntetett szereppel bírnak a pozitív ösztrogén visszacsatolás által okozott

preovulatórikus LH hiperszekréciónban. A rágsálóktól eltérően emberben jelen ismereteink szerint a mediobazális hipotalamusz (MBH) a pozitív feedback színhelye.

Laboratóriumunk az elmúlt évtized során feltérképezte az emberi hipotalamusz KP termelő neuronjait. Hasonlóan a laboratóriumi állatokban mások által korábban megfigyeltekhez, az emberi KP idegsejtek főképp a MBH-ban (infundibuláris/arcuatus idegmag) fordulnak elő. A munkacsoport korábban leírta a magban előforduló KP neuronok életkor- és nemfüggő plaszticitását is, és megfigyelte további neuropeptidek előfordulását az emberi KP idegsejtekben. A rágsálók KP-t, NKB-t, Dyn-t és galanint (Gal) egyaránt expresszáló, analóg idegsejtjeivel (KNDy neuronok) ellentétben, az emberi infundibuláris mag KP idegsejtjei nem tartalmaznak Gal-t és Dyn-t, ugyanakkor megtalálható bennük az NKB, a cocaine- and amphetamine regulated transcript (CART) és a substance P (SP). A faji eltérések megkérdőjelezzik, hogy a „KNDy” peptidek és receptoraik interakciójára alapozott, népszerű GnRH/LH „pulzus generátor” modellek érvényesek volnának valamennyi emlős fajra. Elképzelésünk szerint, kevésbé tanulmányozott nem-rágsáló emlősök (pl. ragadozó háziállatok) KP idegsejtjeinek összehasonlítása a laboratóriumi rágsáló és az ember KP idegsejtjeivel segíthet eldönteni, hogy mely peptidek jelenléte obligát, és melyeké fakultatív a pulzus generátor (KNDy) idegsejtek működtetésében.

2. Célkitűzések

PhD munkatervem mindkét célkitűzésével a KP rendszerek fajspecifikus és általános vonásait kívántam tanulmányozni.

2.1. Neuropeptid kolokalizáció vizsgálata házi karnivór fajok arcuatus/infundibuláris magjának KP idegsejtjeiben.

Vizsgálataink célja különböző fajok KP sejtpopulációiban korábban már azonosított neuropeptidek (Dyn, NKB, Gal, SP, CART) jelenlétének vizsgálata volt macska és kutya hipotalamusz infundibuláris idegmagjában. A vizsgálatsorozatból nyert információk segítenek annak megválaszolásában, hogy mely peptidek szerepe obligát, illetve melyeké fakultatív a pulzus generátor (KNDy) idegsejtek működésében.

2.2. Rosztrális periventrikuláris KP idegsejtek azonosítása és jellemzése emberi hipotalamuszban.

Immunhisztokémiai vizsgálataink célja volt a rágcsálók RP3V-beli KP neuronpopulációjával analóg sejtcsoport azonosítása. Emellett célkitűzéseink között szerepelt a sejtcsoport

1. topográfiájának,
2. nemi dimorfizmusának,
3. életkorfüggésének,
4. neuropeptid/neurotranszmitter fenotípusának és
5. kapcsolatrendszerének

vizsgálata emberben. A rágcsáló és emberi rosztrális KP populációk között feltárt neuroanatómiai hasonlóságok felvetnék annak a lehetőségét, hogy a pozitív ösztrogén feedback helye emberben nem kizárólag a MBH.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Hipotalamusz minták

Az emberi hipotalamusz minták a Semmelweis Egyetem I. számú Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetéből, valamint a Pécsi Tudományegyetem Igazságügyi Orvostani Intézetéből származtak. Nőstény kutyákból és macskákból származó hipotalamusz mintákat a Szent István Egyetem biztosította. Petefészekirtott állatmodell használatával biztosítottuk a KP idegsejtek legmagasabb *KISS1* expresszióját.

3.2. Immunhisztokémia

Mind az emberi, mind a karnivór hipotalamusz blokkokat immerziós módszerrel, 4% paraformaldehiddel fixáltuk. 20%-os cukorinfiltrációt követően fagyasztó mikrotómmal 30 µm vastag metszeteket készítettünk. A metszeteken megfelelő előkezelés után immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatokat végeztünk.

3.3. Konfokális mikroszkópia

A többes-immunfluoreszcens vizsgálatok eredményeit konfokális mikroszkópiával értékeltük.

3.4. Kvantitatív analízis

Különböző korú és nemű emberekből származó szövetmintákban a hipotalamusz rosztrális részén meghatároztuk a metszetenkénti legmagasabb KP sejtszámot. Ezek összehasonlító elemzésével a rosztrális KP rendszer nemi különbségeit és életkor-függőségét két-utas ANOVA és Newman-Keuls *post hoc* teszttel tanulmányoztuk.

4. Eredmények

4.1. A kisszeptin neuronok anatómiája és neurokémiaja petefészekirtott kutyák és macskák infundibuláris magvában

4.1.1. A KP és GnRH neuronok elhelyezkedése kutya és macska hipotalamuszban

Kutya és macska hipotalamuszokon végzett immunhisztokémiai vizsgálataink azt mutatták, hogy a két faj fő KP sejtpopulációja az infundibuláris magban helyezkedik el. Mindkét vizsgált fajban sejttestek legnagyobb számban a mag kaudális részén fordultak elő. Kisebb számban a macska hipotalamuszban az infundibuláris mag rosztrális területén is elhelyezkedtek KP neuronok.

A GnRH neuronok topográfiája a rágcsálókban megfigyeltektől lényegesen eltért kutyákban. A GnRH sejttestek a preoptikus régiótól a mediobazális hipotalamuszig elszórtan fordultak elő: a mediális preoptikus areában, a ventrolaterális preoptikus magban, a lateroanterior hipotalamikus magban, a laterális hipotalamuszban, a mediális tuberális magban és néhány sejttest az infundibuláris magban. Ezzel szemben, macska hipotalamuszban a jelölt GnRH sejttestek kizárólag a szeptális/preoptikus régióban jelentek meg.

4.1.2. Kutya és macska KP neuronok neuropeptid-fenotípusa

Hármas immunfluoreszcens kolokalizációs vizsgálataink alapján a két faj KP sejtjei neurokémiai különbözőségeket mutattak. Kvantitatív elemzéseink alapján a macska infundibuláris KP és NKB sejtek ~60%-a koexpresszálta a Dyn-t. Kutyákban ez az arány ~60%, illetve 37% volt. Ugyan a KP és az NKB nagymértékben kolokalizált, a hármast jelölt KNDy sejttestek aránya mindösszesen ~25% volt a mindkét vizsgált fajban. Figyelemre méltó, hogy a leggyakrabban előforduló neurokémiai fenotípust kutyákban az egyszeresen jelölt NKB sejtek (39%), míg macskákban a csupán Dyn-t kifejező sejtek (38%) adták.

A substance P peptid hasonló arányban jelent meg a petefészekirtott macskák és az intakt kutya hipotalamikus KP és NKB sejtjeiben (20% és 29%, illetve 26% és 24%). Ezzel szemben,

a CART csak a macskák KP (23%) és NKB (7%) sejteiben fordult elő. Gal szignál ugyanakkor sem a kutya, sem macska KP, illetve NKB neuronokban nem volt detektálható.

4.1.3. GnRH sejtek KP innervációja

Immunfluoreszcens vizsgálataink során elemeztük a GnRH neuronokra érkező KP appozíciók számát és megoszlását. A KP sejtek mindkét fajban dúsán beidegzik a GnRH neuronokat: macskákban szinte minden (94,4±5,6%), kutyákban pedig a GnRH sejtek ~80%-án figyeltünk meg axo-szomatikus és/vagy axo-dendritikus KP appozíciókat. E két celluláris régióra érkező KP bemenetek aránya hasonló volt kutyákban (6,3±1,0 input/sejttest és 7,9±5,5 kontaktus/100 µm dendrit) és macskákban (6,9±0,2 input/sejttest és 7,5±1,4 kontaktus/100 µm dendrit) egyaránt. Kutyákban a preoptikus régióban elhelyezkedő GnRH neuronokra érkező KP appozíciók ~60%-a, az infundibuláris GnRH sejteket beidegző KP rostoknak pedig ~90%-a NKB immunreaktivitást is mutatott – ezek a bemenetek nagy valószínűséggel tehát infundibuláris KP sejtektől származtak, ahol a két neuropeptid kolokalizál.

4.2. A humán rostrális hipotalamuszban előforduló KP idegsejtek azonosítása és jellemzése

4.2.1. KP neuronok eloszlása a humán rostrális hipotalamuszban

Immunhisztokémiai vizsgálataink alapján a KP sejtek metszetenként legnagyobb számban (fiatal nők: 36,2±6,2; idős nők: 12,2±2,8; fiatal férfiak: 33,8±6,8; idős férfiak: 45,8±7,8) az anterior parvocelluláris paraventriculáris magban (PaAP) helyezkedtek el. KP sejttestek emellett a paraventriculáris mag dorzális (PaD), parvocelluláris (PaPC) és magnocelluláris (PaMC) részében voltak detektálhatók.

4.2.2. KP neuron markerek vizsgálata a rostrális hipotalamusz KP sejteiben

Kettős immunfluoreszcens vizsgálatok sorozatával kíséreltük meg ismert KP markerek azonosítását a humán rostrális KP sejtekben. Azonban a rágcsló RP3V KP neuron markerek (enkefalin, tirozin-hidroxiláz, Gal) és a humán Inf KP neuron markerek (NKB, SP, CART) sem mutattak kolokalizációt KP-nel az ember rostrális hipotalamuszában.

4.2.3. Az infundibuláris mag KP sejteitől érkező afferens inputok detektálása

Immunfluoreszcens hármas jelöléseink bizonyították, hogy KP/SP/NKB-pozitív axonok kontaktust hoznak létre a rostrális hipotalamuszban elhelyezkedő KP neuronokkal. Az innerváció reciprocitását rostrális KP marker hiányában vizsgálni nem tudtuk.

4.2.4. A rosztális KP sejtszám kor- és nemfüggésének vizsgálata

Minden egyed rosztális hipotalamuszában meghatároztuk a metszetenkénti legmagasabb KP sejttetszámot. Két-utas ANOVA segítségével sikerült igazolnunk a sejtszám szignifikáns ($p=0,021$) nemfüggését valamint a nem és az életkor szignifikáns ($p=0,009$) interakcióját. A négy kísérleti csoport (fiatal nők és férfiak, valamint idős nők és férfiak) Newman-Keuls *post hoc* teszttel történő összehasonlítása kimutatta, hogy az idős nőkben szignifikánsan ($p<0,05$) lecsökkent a sejttetek száma a többi csoporthoz képest, beleértve a fiatal nőket ($p=0,031$). A 66,4%-os sejtszámcsökkenés a menopauza során feltehetőleg az ösztrogén mennyiség csökkenésének köszönhető. A KP sejttetek száma szignifikáns különbséget nem mutatott ($p=0,77$) fiatal és idős férfiak rosztális hipotalamuszában.

5. Konklúzió

Az infundibuláris KP neuronok nélkülözhetetlen szerepet játszanak a pulztilis GnRH/LH szekréció szabályozásában. Mivel eddigi ismereteink szerint e sejtek alapvető neurokémiai tulajdonságai a különböző emlős fajok között nagymértékben eltérnek, megvizsgáltuk két, eddig nem tanulmányozott karnivór faj, a kutya és macska GnRH és KP neuronrendszerének sajátosságait.

A rágcslókban és főemlősökben megfigyeltekhez képest – a hasonlóságok mellett – jelentős anatómiai különbségeket is azonosítottunk. Bemutattuk, hogy a GnRH sejtek megoszlása a két fajban jelentősen eltér: míg kutyákban az emberi GnRH rendszerhez hasonlóan e sejtek a preoptikus régiótól a mediobazális hipotalamuszig terjedve elszórtan helyezkedtek el, macskákban a rágcslókhöz hasonlóan a hipotalamusz szeptális/preoptikus régiójában koncentráálódtak. Ugyanakkor mindkét fajban – más fajokhoz hasonlóan – a GnRH neuronok nem jól körülhatárolható hipotalamikus magokban lokalizálódtak.

Petefészekirtott kutyákban és macskákban a KP sejtek zöme az infundibuláris magban helyezkedett el. Korábbi, intakt macskákon végzett vizsgálatokkal ellentétben petefészekirtott állatokban nem detektáltunk KP neuronokat az anterior periventrikuláris magban és az amygdaloid komplexben, feltehetően a pozitív ösztrogén visszacsatolás hiánya miatt bekövetkező *Kiss1* expresszió detektálási szint alá csökkenése miatt.

Az infundibuláris KP sejtek neurokémiai jellemzése során azt tapasztaltuk, hogy mindkét fajban a KNDy peptidek csupán ~20-25%-ban kolokalizáltak; a mindhárom neuropeptidet egyszerre termelő „KNDy neuronok” aránya így messze elmarad a rágcslókban leírtaktól. A

humán KP neuronokhoz hasonlóan petefészekirtott macskákban a KP sejtek SP-t is termeltek – hasonló kolokalizációt intakt hím kutyában is tapasztaltunk, petefészekirtott nőstényekben viszont nem. Az emberi KP sejtekre ugyancsak jellemző CART neuropeptid a macska KP neuronokban szintén kifejeződött; a CART/KP kolokalizáció kutyákban azonban – rágsálókhoz hasonlóan – nem volt jellemző. Galanin szignál – rágsálókkal ellentétben – egyik vizsgált karnivór faj KP sejtjeiben sem volt detektálható.

Igazoltuk, hogy a KP sejtek más fajokhoz hasonlóan kutyákban és macskákban is dúsan beidegzik a GnRH neuronokat. Sőt, petefészekirtott kutyákban a kontaktust képező KP rostok nagy része NKB-t is tartalmaz; valószínű tehát, hogy – rágsálókkal ellentétben, ahol az inputot adó KP axonok nagy része a preoptikus régióban elhelyezkedő neuronokból erednek – kutyákban az infundibuláris KP sejtectől származnak.

A rágsáló, ragodozó emlősök és főemlősök KP rendszerei közötti, jelen tanulmányban azonosított anatómiai és neurokémiai hasonlóságok, illetve különbségek, hozzájárulnak annak megismeréséhez, hogy az epizodikus GnRH/LH szekréció molekuláris szabályozásában mely peptidok funkciója obligát, és melyeké fakultatív.

Második tanulmányunkban azonosítottuk a rágsáló RP3V KP neuronpopulációval homológ sejtcsoport meglétét a humán rosztrális hipotalamuszban. A sejtek jelenlétének igazolásán túl tanulmányoztuk a rosztrális KP idegsejtek eloszlását, valamint neurokémiai jellemzőit.

A preoptikus/rosztrális hipotalamusz KP idegsejtjeinek némileg különböző topográfiai jellemzőit számos emlős fajban leírták. A humán rosztrális KP neuronok legnagyobb számban az anterior parvocelluláris paraventriculáris magban helyezkedtek el. KP sejttestek emellett a paraventriculáris mag dorzális és magnocelluláris részében voltak detektálhatók.

Kizártuk az eddig ismert KP neuron markerek jelenlétét a humán rosztrális hipotalamusz KP sejtjeiben. A rágsáló tanulmányokból ismert neuropeptid/neurotranszmitter markerek (Gal, enkefalin, tirozin-hidroxiláz) és a humán infundibuláris KP markerek (NKB, SP, CART) hiányoztak az emberi rosztrális KP populációból. Ezek a megfigyelések alátámasztják, hogy a rosztrális KP sejtek neurokémiaiilag jelentősen különböznek az infundibuláris KP sejtectől, amely a sejtek eltérő funkciójára utalhat.

Azonosítottuk a két KP sejtpopuláció közötti kapcsolatot: az NKB-t és SP-t kifejező infundibuláris sejtek kontaktust létesítenek a rosztrális populáció sejtjeivel. A rosztrális KP sejtekre jellemző specifikus marker hiányában azonban e neuronok projekciós területeinek azonosítására nem volt lehetőségünk.

Bemutattuk, hogy emberben a rostrális KP populációt – a rágcslókhhoz hasonlóan – az ösztrogén pozitívan regulálja, viszont – a rágcsló homológ sejtekkel ellentétben – e sejtek nemi dimorfizmust nem mutatnak.

A fent ismertetett anatómiai észleletek megkérdőjelezzik a jelenleg elfogadott nézetet, amely szerint főemlősökben a pozitív ösztrogén visszacsatolás színhelye kizárólag a mediobazális hipotalamusz és növelik annak valószínűségét, hogy a rostrális hipotalamusz szerepe alábecsült a pozitív ösztrogén feedback és a reprodukció szabályozásában. Ezek alapján további anatómiai, molekuláris és funkcionális vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy a rostrális hipotalamusz KP idegsejtjei milyen mértékű szerepet vállalnak az előzőekben említett szabályozási mechanizmusokban.

A jelen tanulmányban ismertetett eredmények hozzájárulnak az emlősök szaporodásának szabályozásában kritikus szereppel rendelkező preoptikus és infundibuláris KP rendszerek működésének mélyebb megértéséhez.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk:

1. Rumpler E, Takacs S, Gocz B, Baska F, Szenci O, Horvath A, Ciofi P, Hrabovszky E, Skrapits K. (2020) Kisspeptin Neurons in the Infundibular Nucleus of Ovariectomized Cats and Dogs Exhibit Unique Anatomical and Neurochemical Characteristics. *Front Neurosci*, 14: 598707.
2. Rumpler E, Skrapits K, Takacs S, Gocz B, Trinh SH, Racz G, Matolcsy A, Kozma Z, Ciofi P, Dhillo WS, Hrabovszky E. (2020) Characterization of kisspeptin neurons in the human rostral hypothalamus. *Neuroendocrinology*.