

**A reprodukív tengely negatív és pozitív ösztrogén-visszacsatolásának
molekuláris mechanizmusainak transzkriptomikai vizsgálata**

Doktori tázisfüzet

Göcz Balázs Gergő

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola

Semmelweis Egyetem



Témavezető: Dr. Hrabovszky Erik, D.Sc., vezető kutató

Hivatalos bírálók: Dr. Dobolyi Árpád, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Kovács László Ákos, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Csillag András, D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Kovács Krisztina, D.Sc., vezető kutató

Dr. Ruttkay Tamás, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2023

1. Bevezetés

Az emlősök szaporodásának 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 az agyalapi mirigy mellső lebenyének portális keringési rendszerébe ürítik. Az adenohipofízis gonadotrop hormonjainak (luteinizáló hormon /LH/, folliculus stimuláló hormon /FSH/) elválasztása és e két hormon aránya a GnRH szekréción mintázatának függvénye. GnRH pulzusok hiányában az FSH és LH szekréción leáll. Az FSH és az LH a gonádokban stimulálja az ivarsejtek fejlődését és serkenti a szexuáliszteroidok (androgének, ösztrogének, gesztogének) elválasztását, mely utóbbiak fontos szerepet játszanak a reprodukción, az energiaháztartás, a belső hőmérséklet, a cirkadián ritmusok és a stresszválaszok hipotalamikus szabályozásában. Szintjük negatív és pozitív feedback hatást gyakorol a reprodukción szabályozó hipotalamikus központok és az agyalapi mirigy működésére. A hipotalamusz arcuatus idegmagva (ARC) kulcsfontosságú terület a keringő ösztrogén hormon szintek érzékelésében és ezáltal, az ösztrogén hormonok központi idegrendszeri visszacsatolásában. Ezen feedback hatás közvetítésében GnRH idegsejtek felé az ARC számos neuropeptid természetű átvivőanyaga vesz részt. Ilyen szerepet játszik a kisspeptin (KP), a neurokinin B, a dinorfin és a galanin-like peptide.

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 az ki, hogy szerepe nélkülözhetetlen a pubertás és a szaporodás központi idegrendszeri szabályozásában: a KP specifikus receptorát kódoló

gén (*KISS1R*) vagy a *KISS1* gén inaktíváló mutációi emberben hipogonadotrop hipogonadizmust okoznak. A tünetegyüttes gén-kiütött egérben is megjelenik. Más, épp fokozott génaktivációt okozó mutációk ugyanakkor pubertás precoxot vonnak maguk után. A KP/KP receptor szignalizáció elsősorban a hipofízis LH szekréciójának serkentésével hat a reprodukív tengely működésére. A KP reprodukív tengelyt serkentő hatását hipotalamikus gonadotropin-releasing hormon (GnRH) idegsejtek közvetítik, így az GnRH antagonisták előzetes adásával kivédhető. Igazolást nyert, hogy a GnRH idegsejtek valóban nyernek közvetlen beidegzést a centrális KP rendszerből, expresszálják a KP receptorát, és KP adására aktiválódva c-Fos expressziót és depolarizációt mutatnak.

A KP neuronrendszert két anatómiai és funkcionálisan is elkülönülő neuron populáció alkotja. A negatív ösztrogén visszacsatolásban és a GnRH/LH szekréció pulzatis mintázatának kialakításában kritikus szerepet játszó kisspeptin/neurokinin B/dinorfin („KNDy”) idegsejtek az ARC magban helyezkednek el, míg a pozitív ösztrogén visszacsatolás közvetítéséhez elengedhetetlen a harmadik agykamra rostralis periventricularis területén (RP3V) elhelyezkedő KP neuroncsoport működése. A kétféle ösztrogén visszacsatolás háttérében álló molekuláris mechanizmusok jelenleg kevésbé ismertek. Megértésükhöz elengedhetetlen a két KP neuronpopuláció ösztrogén-függő transzkripciós szabályozásának tanulmányozása.

2. Célkitűzések

A kisspeptin neuronok ösztrogén-függő transzkripció szabályozását vizsgáló PhD munkám célkitűzései a következők voltak:

- **Ösztrogén-függő gének és funkcionális utak azonosítása az egér arcuatus idegmagjában.**
- **Egér KNDy neuronok ösztrogén-függő szabályzásának jellemzése.**
- **Ösztrogén-függő mechanizmusok feltárása a KP^{RP3V} neuronokban**

3. Módszerek

A kísérletekhez C57Bl/6J és C57Bl/6J KP-Cre/ZsGreen genetikai törzsbe tartozó egereket használtam, melyeket a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet állatházában tartottunk és kezeltünk.

3.1 Egereken végzett műtéti beavatkozások

Az első lépés egy kétoldali sebési petefészekirtás volt, alacsony szérum ösztrogénszint előállítására. Ösztrogén okozta transzkripciós változások vizsgálatához szükség volt egy magas élettani értékhez hasonló, stabil szérum ösztrogén szintet mutató állatmodellre is. Ennek előállításához petefészekirtott egerek hátbőre alá napraforgó olajban oldott 17β -ösztradiolt (E2-t; 100 $\mu\text{g/ml}$) tartalmazó szilikon kapszulát ültettünk be. A kontroll állatok hátbőre alá a vívőanyaggal töltött kapszulát ültettük be.

Megfelelő minőségű agyszövet kinyeréséhez transzkardiális szöveti perfúziót hajtottunk végre. Az ARC régió esetén 4 °C-os foszfát pufferrel meghígított, 10%-os RNA later oldattal mostuk át a szöveteket. Egyedi KP sejtek transzkriptomikai vizsgálatához 0,5% formaldehidet tartalmazó perfúziós oldatot használtunk, majd a perfúziót 20%-os szaharóz oldattal fejeztük be. Az RNS minőségének megőrzése érdekében a perfundált agyakat gyorsan lefagyasztottuk, steril alufóliába csomagoltuk és -80 °C-on tároltuk.

3.2 Szövettani metszetek készítése

A régiók tanulmányozásához 20 μm vastagságú, míg a sejtek vizsgálatához 12 μm vastagságú, koronális síkú metszeteket készítettük, melyeket speciális borítású PEN tárgylemezre gyűjtöttük („felhúzott metszetek”). A régió vizsgálatához a hipotalamusz magjait Nissl-festéssel tettük láthatóvá.

3.3 Laser Capture Microdissection (LCM)

Laser Capture Microdissection (LCM) során mikroszkópos kontroll mellett, lézersugár segítségével történt a speciális tárgylemezre felhúzott metszetekből egyes szöveti régiók vagy egyedi KP sejtek igen pontos kimetszése. A fluoreszkáló KP idegsejtekből 300 db-ot gyűjtöttünk egyedenként mind az ARC-ból, mind az RP3V-ből.

3.4 RNS izolálás

Az ARC régió RNS izolálását az Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit segítségével végeztünk el. A KP sejtekből történő RNS izolálás az Arcturus Paradise RNA Isolation Kittel történt.

3.5 Transzkriptom vizsgálati módszer (RNA-Seq)

A tényleges szekvenálást a Debreceni Egyetemen együttműködve végeztük el, az Illumina 500 High output szekvenáló kit segítségével.

3.6 Adatok kiértékelése

Az adatok kiértékelésére és elemzésére R-programcsomagot használtunk. Ezzel készült mind a bioinformatikai elemzés, mind az ehhez kapcsolódó ábrák.

3.7 Konfokális mikroszkópia

A többes-immunfluoreszcens vizsgálatok eredményeit konfokális mikroszkópiával értékeltük.

4. Eredmények

4.1 Az ösztrogén kezelés magas fiziológiás szérum ösztrogén szintet és robusztus uterus hipertrófiát eredményezett.

Az ösztrogén kezelés 7.59 ± 0.7 pg/ml (átlag \pm SEM; N=4) szérum E2 koncentrációt eredményezett, ami a ciklizáló nőstényeket jellemző fiziológiás tartományba esik (~ 6 pg/ml diösztuszban és ~ 8 pg/ml proösztuszban). Sikerült igazolnunk a modell működőképességét azáltal is, hogy E2 hatására nagymértékű uterus tömeg változást is tudtunk detektálni (136.5 ± 11.8 mg OVX+E2; N=6 vs. 18.0 ± 0.4 mg OVX+Veh kontroll; N=6), az E2 jól ismert uterotrop hatásával összhangban.

4.2 LCM módszer segítségével transzkriptom vizsgálatokra alkalmas minőségű RNS-t nyertünk ki az ARC-ból.

A szövetek RNS megőrzöttsége megfelelő volt (RIN: $7.1 < RIN < 8.2$). A szekvenálás során könyvtáranként átlagosan 22,6 millió ún. read-et tudtunk a 11 cDNS könyvtárból elérni. A readeket egér referencia genomhoz illesztettük és ennek során az „alignment rate” 86,8 % volt. A read-ek 89,1 %-a génekhez volt társítható („assignment rate”).

4.3 A bioinformatikai elemzés számos regulált transzkriptumot azonosított a krónikusan ösztrogén kezelt egér ARC-ban.

Ösztrogén kezelés után 2117 szignifikánsan változó (FDR<0,05) transzkriptumot azonosítottunk az egér ARC mintákban, a kezelt csoportokon belüli nagyfokú homogenitásnak, ki mértékű szórásnak köszönhetően. Az OVX+E2 kezelést kapó egerek ARC területén 1157 upregulált és 960 downregulált transzkriptum jelent meg. A kétszeres változás kritériumát 235 transzkriptum teljesítette. Ezen szignifikáns

változást mutató transzkriptumokat funkcionális kategóriákba rendeztük, melyek a következők voltak: autofágiával kapcsolatosak (N=115); ubiquitinációval kapcsolatosak (N=37); neuropeptidet kódolók (N=20); ion csatornát kódolók (N=42); transzportereket kódolók (N=83); klasszikus receptorokat kódolók (N=30); egyéb receptorok transzkriptumai (N=136); riboszómális fehérjét kódoló transzkriptumok (N=21); transzkripció faktorok transzkriptumai (N=104); lncRNS-ek (N=40); mikroRNS-ek (N=9); prediktált fehérje kódolók (N=17); és egyéb, olyan „prediktált gének” transzkriptumai (N=83), melyek funkciója még ismeretlen.

4.4 Az overreprzentációs analízis 47 ösztrogén hatására szignifikánsan változó funkcionális útvonalat azonosított

A legnagyobb számú transzkriptum változás a Neuroaktív ligand-receptor interakciós útvonalban jelent meg (N=56). Ezen változások érintették mind a klasszikus, mind a peptiderg (orexin, neuropeptide Y, szomatosztatin, stb.) neurotranszmissziót. SPIA (Signaling pathway impact analysis) elemzés segítségével megállapítottuk, hogy a GABAerg és a szerotoninerg útvonal aktiválódott, míg a glutamáterg, kolinerg és dopaminerg szinapszis útvonalak gátlódtak.

4.5 LCM módszerrel izolált, fluoreszkáló kisspeptin neuronok RNA-Seq vizsgálata segített feltárni a KNDy neuronok ösztrogén függő transzkriptumját

Egy második RNA-seq vizsgálatsorozatban specifikus módon, az ARC KP sejteinek ösztrogén-függő regulációját tanulmányoztuk, OVX+Veh (N=3) és OVX+E2 (N=3) csoportok összevetésével. Állatonként 300 fluoreszkáló KP^{ARC} neuront gyűjtöttünk össze a formaldehiddel fixált agyakból. A sejtekből RNS mintákat izoláltunk (RIN 4.8–6.9), majd azokból a TruSeq

Stranded Total RNA Library Prep Gold kittel szekvenáló könyvtárakat készítettünk. Ez a kit alkalmas részlegesen degradált, 1-2 ng mennyiségű RNS visszairására és amplifikálására. Az RNS szekvenálás 20,5 millió read/minta átlagot eredményezett. A readeket egér referencia genomhoz illesztettük a STAR program (v 2.7.3a) segítségével, mely 74.9% (s.d. = 3.5%) „overall alignment rate”-et eredményezett. Az annotáció a featureCounts programmal valósult meg, így 38,6 % (s.d. = 0.9%) lett a mapp-elődött readek aránya.

4.6 A bioinformatikai elemzés számos regulált transzkriptumot azonosított a krónikusan ösztrogén kezelt egér KP^{ARC} neuronjaiban.

2329 szignifikánsan változó (FDR<0,05) transzkriptumot sikerült azonosítani ösztrogén kezelt állatok KP^{ARC} neuronjaiból. 1442 szignifikáns változást tudunk detektálni a LogFC 1.0 érték felett és LogFC -1 érték alatt, ami egy teljes nagyságrenddel több, mint a teljes ARC régióban azonosított változások száma.

4.7 Az overreprzentációs analízis 83 ösztrogén hatására szignifikánsan változó funkcionális útvonalat azonosított a KP^{ARC} neuronokban

Az elemzés 83 szignifikánsan megváltozott útvonalat azonosított. Ezek közül a két, legnagyobb számú változást mutató csoport a ribosoma (N=57) és a Neuroaktív ligand-receptor interakció (N=57) útvonal volt. SPIA elemzés segítségével megállapítottuk, hogy a GABAerg és glutamáterg útvonal aktiválódott, míg a szerotoninerg, kolinerg és dopaminerg szinapszis útvonalak gátlódtak.

4.8 A K^{PARC} neuronok ösztrogén érzékeny transzkriptumait funkcionális kategóriákba rendeztük

Számos ösztrogén által regulált gént tudtunk kategóriákba rendezni. A legfontosabb funkcionális kategóriák a következők voltak: autofágia (N=156); ubiquitináció (N=45); egyéb neuropeptidek (N=15); ion csatornák (N=46); transzporterek (N=72); klasszikus neurotranszmitter receptorok (N=26); egyéb receptorok (N=110); riboszomális fehérjék (N=60); mitochondriális fehérjék (N=37); transzkripció faktorok (N=109); lncRNS-ek (N=60); mikroRNS-ek (N=5); prediktált protein kódoló gének (N=31); egyéb prediktált gének (N=192). A fennmaradó transzkriptumokat nem kategorizáltuk. 109 transzkripció faktornak változott meg szignifikánsan az expressziója. Ezek valószínűleg szekunder transzkripció folyamatok szabályozásában játszanak szerepet. Az E2 gátolta számos hormon magreceptor (*Ar*, *Esr1*), AP-1 transzkripció faktor (*Fos*, *Fosb*, *Junb*, *Jund*), korai növekedési válasz fehérje (*Egr1*, 3, 4), neuronális aktivitás függő transzkripció faktor (*Npas4*), orphan nukleáris receptor (*Nr4a1*, *Nr4a3*), szteroidgenézis regulátor (*Crem*) és cink-ujj fehérje mRNS expresszióját. Az ösztrogén szintén inhibitoros hatást fejtett ki a prohormon konvertáz (*Pc1/3*), a transzkripcionális regulátor *Creb311*, és a *Pcsk1* enzimre is. Másrésről az E2 aktiválta néhány hormon receptor (*Pgr*, *Thrb*) és a progeszteron szintézisben szerepet játszó transzkripció mediátor (*Cebpb*) mRNS expresszióját. Ugyancsak aktiválódtak egyes transzkripció faktorok, mint a SOX (*Sox11*, *Sox18*) és a STAT (*Stat5a*, *Stat5b*) család több tagja is.

4.9 Ösztrogén regulált receptorok azonosítása segített a KP^{ARC} neuronok eddig ismeretlen afferens kapcsolatainak feltárásában is.

Nagyszámú neurotranszmitter receptor expressziója változott meg a 4 napos E2 kezelés hatására. Megváltozott a *Htr2a*, *Htr4*, *Htr5a* és *Htr7* szerotonin receptor, az *Npy1r*, *Npy4r* és *Npy5r* neuropeptid Y (NPY) receptor, az *Sstr2* és *Sstr3* szomatostatin receptor, és az *Orex2* orexin receptor izoformák mRNS szintje. Ezen receptor szint változások alapján, a receptorok ligandjai képesek ösztrogén-függő afferens kontrollt gyakorolni a KP^{ARC} neuronokra. Ezen elképzelés anatómiai bizonyítására kettős-immunfluoreszcens vizsgálatokat hajtottunk végre OVX+Veh KP-Cre/ZsGreen egerek ARC metszetein. A konfokális mikroszkópos elemzés kimutatta az 5-HT marker szerotonin transzporter (SERT), az orexin B, az NPY és a szomatostatin jelenlétét az KP^{ARC} neuronjainak axoszomatikus és axodendritikus afferenseiben. A megfigyelések igazolták ezen transzmitterek lehetséges hozzájárulását a KP^{ARC} sejtek ösztrogénfüggő neuronális szabályozásához. Immun-elektromikroszkópos kettős jelöléssel sikerült megerősítenünk a szomatostatin szinaptikus szabályozásban játszott szerepét.

4.10 KP^{ARC} neuronok ösztrogén-függő transzkriptomjának megismerése új utakat nyithat a szaporodási betegségekben szerepet játszó, eddig ismeretlen gének azonosításához is.

Feltételeztük, hogy azon transzkriptumok (hasonlóan a *Kiss1*, *Tac2* és *Tacr3* génekhez) melyek nagymértékben szerepet játszanak a reprodukció szabályozásában és fertilitási kórképek kóroktanában, 1) a KP neuronokban feldúsulnak az ARC környezethez képest, 2) nagy mRNS kópiaszámban expresszálódnak a KP sejtekben (magas CPM) 3) és jelentős mértékben

regulálódnak (magas FC) ösztrogén hatására. Egér és human betegség adatbázisokat elemezve, a 2329 ösztrogén-regulálta KP^{ARC} neuron transzkriptum közül 7,1% (N=166) ill. 1,8% (N=42) volt kapcsolatba hozható valamilyen pubertást vagy reprodukciót érintő betegséggel, beleértve a kongenitális hipogonadotrop hipogonadizmust (CHH). A szignifikáns génváltozások elemzésével kiválasztottunk 125 transzkriptumot szigorúbb szelektációs kritériumok alapján (CPM>100, legalább háromszoros dúsulás a KP sejtekben az ARC régióhoz képest, legalább kétszeresen up vagy downreguláció). A szigorúbb kritériumok mellett az egér és a human betegséget okozó gének előfordulási aránya a szűkített listában 20%-ra (N=25) ill. 8%-ra (N=12) nőtt. Ezen 125 gént tartalmazó listát használtuk fel „burden analízishez”. Ennek során ritka és valószínűsíthetően patogén variánsokat kerestünk egy CHH beteg kohorsz és a gnomAD kontroll adatbázis összehasonlításával. Ahogy vártuk, olyan ismert CHH-t okozó gének, mint a *TAC3* ($p=6.61E-08$), *TACR3* ($p=1.01E-03$) és a *KISS1* ($p=6.15E-03$) ritka variánsai a beteganyagban dúsulást mutattak. Továbbá az elemzés felfedezett számos új, feltételezhetően CHH-t okozó gént is, mint amilyen az Alacsony denzitású Lipoprotein Receptor-összefüggő fehérje 1B (*LRP1B*, $p=3.14E-05$) vagy a feszültség-függő kalcium csatorna alfa 1 G alegysége (*CACNA1G*, $p=1.84E-04$), mely utóbbit korábban spinocerebelláris ataxiával hozták összefüggésbe. Érdekes módon, a feszültség-függő kalcium csatorna alfa 2 delta 1 kiegészítő alegysége (*CACNA2D1*, $p=1.49E-03$) is megjelent a feldúsult gének között, ami azt mutatja, hogy mind az L-típusú, mind a T-típusú kalcium csatornáknak fontos szerepe lehet a human reprodukcióban. Ezen új kandidáns gének szerepe a KP^{ARC} neuronok működésben és a CHH patofiziológiában tisztázásra vár, ami további alapkutatási és klinikai genetikai vizsgálatokat igényel.

4.11 A K^{RP3V} neuronokban 222 E2-függő transzkriptumot sikerült azonosítanunk

A bioinformatikai elemzés 203 E2 által szabályozott gént azonosított a K^{RP3V} neuronokban ($p.\text{adj}<0,05$). Az alacsony expresszióval rendelkező transzkriptumokat kivettük az elemzésből, javítandó a statisztika erejét. A $\text{basemean}>20$ és $p.\text{adj}<0,05$ vágási értékek használatával 10623 transzkriptumot azonosítottunk ebben a sejttípusban, amelyek közül 247 volt E2-függő és 222 volt fehérjét kódoló. A 222 gén 45 új változást tartalmazott, amelyek nem szerepeltek az alacsony basemean -re nem szűrt listán.

A 222 fehérjekódoló gén közül 142 gén up- és 80 gén downregulálódott. A legerőteljesebb expresszió a neuromedin B-t kódoló *Nmb* esetében volt megfigyelhető. Az erősen expresszált gének ($\log_2\text{FC}>1$) között további neuropeptidok (*Kiss1*, *Nts*, *Penk*) és egy granin (*Vgf*) is megtalálható volt. Az ORA elemzés a KEGG-útvonalak közül a dopaminerg szinapszis és a neuroaktív ligand-receptor kölcsönhatás útvonalak változását azonosította. A génontológiai kategóriák (GO) használatával végzett ORA a membránpotenciál szabályozásban (GO:0042391), a szinapszis szerveződésben (GO:0050808), a peptid szállításban (GO:0015833) és a hormonszekréciónban (GO:0046879) bekövetkező változások jelentős feldúsulását mutatta ki.

4.12 Az összehasonlító elemzés eltérő E2 által vezérelt transzkripció válaszokat tárt fel a két KP sejtpopulációban

Az összehasonlíthatóság érdekében a K^{ARC} neuronok RNS-Seq-adatait ugyanezzel a szűréssel újraelemztük, ami 1583 közepes vagy nagy abundanciájú E2-szabályozott gént eredményezett. Míg 470 alacsonyan expresszált gént kizártunk ezzel a szűréssel, a megnövelt statisztikai erő 48 újonnan azonosított gén azonosítását is eredményezte a K^{ARC} neuronokban.

Összességében, a KP^{RP3V} neuronokhoz képest a KP^{ARC} neuronok sokkal nagyobb számú és erőteljesebb transzkripciós választ mutattak E2-re.

4.13 Az eltérő szabályozás mellett is 96 átfedő E2-célgén található.

Bár az E2 által vezérelt transzkripciós válaszok eltérőek voltak, kilencvenhat átfedő gént is találtunk, hatvankét azonos és harmincnégy ellentétes irányú változással a KP^{RP3V} és KP^{ARC} neuronokban. Az azonos irányban szabályozott hatvankét gén listája több TF-t, szinapszishoz kapcsolódó gént és kalcium jelző molekulát tartalmazott. Az erősen expresszálandó gének közül az E2 upregulálta az *App*, *Itm2c* (gátolja az APP feldolgozását), *Calm1*, *Eef1a1* transzkriptumokat. Hasonlóan növelte néhány szinapszishoz kapcsolódó gén, köztük a *Cadm1*, *Enah*, *Gad2*, *Syt6* expresszióját, és csökkentette a *Grin2b* expresszióját. Ezenkívül az E2 mindkét sejtpopulációban fokozta a fő kalcium-jelző molekulák (*Pcp4*, *Calm1*) és a *Hcn1* pacemaker csatorna mRNS-expresszióját. Harmincnégy gén ellentétesen változott, és közülük több, a *Kiss1*-hez hasonló szabályozási mintázatot követ (*Atp1a1*, *Chga*, *Vgf*, *Ptprn*, *Ralgps2*). Más, ellentétesen szabályozott gének többek között a translációs szabályozással (*Msi2*), a kalcium jelátvitellel (*Cpne2*, *Ryr3*), a szinaptikus plaszticitással (*Cct4*, *Chl1*), a kolinerg transzmisszióval (*Chrna7*, *Tmem35a*) kapcsolatos fehérjéket kódoltak.

4.14 Az E2 aktiválja a neuropeptid prekursor és granin géneket a KP^{RP3V} neuronokban

A KP^{RP3V} neuronokban hét E2 által szabályozott neuropeptid és granin gént sikerült azonosítanunk. Ezek közül is jelentős aktivációt mutatott a *Nmb*, *Kiss1*, *Nts* és *Penk* gének. A *Pnoc*, *Prok2* és *Cartpt* E2-indukált növekedése nem érte el a statisztikai szignifikanciát. A KP^{RP3V} neuronok magasan

expresszálták a *Cartpt*, *Kiss1*, *Nmb*, *Nts* és *Penk*, míg a *Gal* mérsékelten expresszáldott a petefészektől egerekben. A neuropeptid prekursor fehérjéket az endoplazmatikus retikulumból a transz-Golgi hálózatba kerülnek, ahol szortírozódnak és dense core vezikulákba (DCV) csomagolódnak. Sikeresen kimutattunk a *Chga*, *Scg2*, *Vgf* és a szekréciós útvonal egy másik génjének, a *Ptprn*-nek az upregulációját. A neuropeptidek érése peptidkötés-hasadást igényel a prekursor molekulákban. Az E2 serkentette a *Cpe*, *Pam* és a *Pcsk2* prohormon-feldolgozó enzimek transzkripcióját, bár e változások nem érték el a statisztikai szignifikancia szintjét (p.adj<0,05). A DCV transzlokációval, transzporttal és fúzióval kapcsolatos gének nem szabályozódtak.

4.15 Az E2 gátolja a neuropeptid prekursorokat, a graninokat, a feldolgozó enzimeket és számos szekréciós útvonal génjét a KP^{ARC} neuronokban.

A KP^{ARC} neuronokban öt együttesen expresszált neuropeptid prekursor gén transzkripció gátlását figyeltük meg: Ezek a *Kiss1*, *Nms*, *Nxph3*, *Pdyn* és *Tac2* voltak. A granin család öt tagja, az *Scg3*, *Chga*, *Chgb*, *Vgf*, *Pcsk1n/ProSAAS*, továbbá a *Ptprn* ugyancsak csökkent expressziót mutatott. A neuropeptidek érése a DCV-kben zajlik. Az E2 hat feldolgozó enzim, köztük a *Cpe*, *Ctsb*, *Pam*, *Pcsk1*, *Pcsk2* és *Pcsk5* mRNS-expresszióját csökkentette, míg a *Pcsk6* proteáz mRNS szint növekedett. A KP^{ARC} neuronokban az E2 csökkentette az *Arf1*, a *Cltc*, az *Ap2m1* és az *Ap1s1* transzkripcióját. A transz-Golgi hálózatból a DCV-k a plazmamembrán felé orientálódnak, hogy tartalmukat felszabadítsák. A transzlokáció dinaminokra, szintaxinokra, állványzat- és miozinmotoros fehérjékre támaszkodik. A KP^{ARC} neuronokban az E2 számos dinamint (*Dnm1*, *Dnm3*),

szinaptotagmint (*Syt4*, *Syt5*), miozin (*Myo1b*, *Myo1c*, *Myo3b*, *Myo5a*) és állványzat (*Tanc2*) fehérjéket kódoló gén mRNS-expresszióját szabályozta le. A SNARE-komplex és kofaktorok szükségesek a DCV-k specifikus célzásához és a plazmamembránnal való fúziójához. Az E2 inaktíválja a SNARE-komplex komponenseit (*Vamp2*, *Stx1a*, *Stx1b*, *Snap25*) és a kofaktorokat (*Rab15*, *Rab27*, *Rab39*, *Unc13a*, *Unc13b*) kódoló gének transzkripcióját. A DCV fúziós gépezet a Munc18-1/CASK/Mint1/Lin7b szervező komplexhez kapcsolódik, amely a szinaptikus adhéziós molekulákhoz, a neurexinekhez kötődik. Az E2 downregulálta a szervező-komplex alkotóelemeit (*Stxbp1* (a Munc18-1-et kódoló), *Cask*, *Apba1* (a Mint1-et kódoló), *Lin7b*) és a neurexineket (*Nrxn1*, *Nrxn2*). A Cav2.1 és Cav2.2 csatornák a legtöbb szinapszisban a neuropeptidok és neurotranszmitterek együttes felszabadulását segítik. Az E2 többek között csökkentette a *Cacna1a* (Cav2.1) és a *Cacnb1* segéd Cav alegység expresszióját. A Rab3-interakciós fehérjék (RIM), az aktív zóna fő szervezői, az *Erc1* által kódolt RIM-kötő fehérjén keresztül kapcsolódnak a Cav2.1-hez, amelyet az E2 szintén inaktívált.

4.16 A transzkripciós faktorok markánsan eltérő ösztrogén szabályozást mutattak a két KP neuron populációban

A KP^{RP3V} és KP^{ARC} neuronok E2-re adott feltűnően eltérő transzkripciós profilja láttán megvizsgáltuk az E2-függő transzkripciós faktorokat (TF). A KP^{RP3V} neuronokban az E2 csupán tíz, míg a KP^{ARC} neuronokban hetven TF mRNS expresszióját szabályozta. Az E2-függő TF-ek közé tartoztak többek között a nukleáris hormonreceptorok (*Pgr*, *Rora*, *Thrb*, *Nr1d2*, *Nr2c2*, *Nr4a2*, *Nr5a2*, *Ar*, *Esr1*, *Nr4a1*, *Nr4a3*), homeobox fehérjék (*Adnp*, *Cux1*, *Pbx1*, *Pknox2*, *Zfmx2*), az AP-1 komplex alegységei (*Fos*, *Junb*, *Jdp2*) és cinkujj

fehérjék (*Hivep1*, *Zfp317*). Figyelemre méltó, hogy nyolc TF, köztük a *Cebpb*, *Cic*, *Cux1*, *Fosl2*, *Gtf2i*, *Hivep1*, *Hivep2*, *Jumb* képes kölcsönhatásba lépni az ER α -val.

Fentiekén kívül, az E2 a KP^{ARC} neuronokban transzkripciós szabályozók, kromatin módosítók és szabályozó lncRNS-eket kódoló gének expresszióját is módosította. Az E2 upregulálta a SWI/SNF (*Smarca2*, *Smarca4*, *Smarca3*, *Bicral*) és az ATRX:DAXX (*Atrx*, *Daxx*) kromatin remodelling komplexek, a hiszton-metiltransferázok (*Kmt2e*, *Wdr82*) és a deacetilázok (*Hdac11*) komponenseit. Az E2 lefelé szabályozott néhány transzkripciós represszort (*Gatad2a*, *Trps1*, *Zfp219*), DNS-metiltransferázt (*Dnmt3a*) és hiszton-deacetilázt (*Hdac3*, *Hdac9*). Közülük egy transzkripciós koregulátor (*Ncoa6*) és több represszor/aktivátor (*Atrx*, *Gatad2a*, *Nrip1*, *Smarca2*, *Smarca4*, *Trim24*, *Trps1*) is képes kölcsönhatásba lépni az ER α -val. Az E2 számos szabályozó lncRNS expresszióját is módosította a KP^{ARC} neuronokban.

5. Konklúzió

Uralkodó nézet szerint, a KNDy-neuronok döntő szerepet játszanak a pulzusokban ürülő GnRH-szekréciós szabályozásában azáltal, hogy közvetítik a petefészkek által termelt E2 negatív visszacsatolását GnRH neuronok felé KP/KP receptor jelátvitelen keresztül. Ezen visszacsatolásért felelős molekuláris mechanizmusok azonban kevésbé ismertek. Eredményeink olyan neuropeptid gének dúsulását mutatták ki az ARC nem-KP sejteiben, mint az *Agrp*, *Nts* és *Sst*. Ezek a változások indirekt úton, transzszinaptikus hatást gyakorolhatnak a KP^{ARC} neuronok működésére. Ezen kívül, az E2 ARC-n kívüli transzszinaptikus hatásokon keresztül is befolyásolhatja a KP^{ARC} neuronok génexpressziós profilját. RNA-Seq-

vizsgálataink ugyanakkor nem találtak bizonyítékot a gliális/endothelialis részvételre ezekben a KP^{ARC}-sejtekre gyakorolt közvetett E2-hatásokban.

A KP neuronpopulációk összehasonlító elemzésével megállapítottuk, hogy az E2 egészen eltérő transzkripciós változásokat indukál a két sejtípusban. Az E2 kezelés hatására megjelenő közös génválaszok közt 96 azonos, míg 34 ellentétes irányba mutatott a két sejtípusban. A KP^{RP3V} neuronokban aktiválódtak olyan neuropeptid prekursor gének mint a *Kiss1*, *Nmb*, *Nts* és *Penk*. Ezzel szöges ellentétben, a KP^{ARC} neuronokban ezen neuropeptideket kódoló gének expressziójára a hormonkezelés gátló hatást gyakorolt. Az összehasonlításban szereplő modelljeink arra utalnak, hogy a génextpresszió E2 általi szabályozása a KP^{ARC} sejtekben összetettebb, mint a KP^{RP3V} neuronok populációjában.

A neuropeptideket kódoló gének expressziójának megváltoztatásán kívül az E2 jelentősen megváltoztatja a különböző nukleáris és membrán hormonreceptorok, ioncsatornák expresszióját, és számos biológiai folyamatot befolyásol, beleértve a transzkripciót, a mitokondriális és riboszomális működést és a szinaptikus plaszticitást. Meglepően sok E2 által szabályozott lncRNS-t találtunk. Ezeknek a szabályozó RNS-eknek az ösztrogén általi szabályozása új utat nyithat a nemi szteroidokkal kapcsolatos kutatásban. Azzal hogy megismertük a KP neuronok ösztrogén-függő transzkripciós változásait, közelebb kerültünk az emberi hipotalamusz ösztrogén általi szabályozásának megértéséhez, és betekintést nyerhetünk a menopauza utáni ösztrogénhiány lehetséges molekuláris következményeibe is.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1 PhD disszertációhoz kapcsolódó cikkek

1. **Göcz B.**, Rumpler É., Sárvári M., Skrapits K., Takács S., Farkas I., Csillag V., Trinh S.H., Bardóczy Z., Ruska Y., Solymosi N., Póliska S., Szőke Z., Bartoloni L., Zouaghi Y., Messina A., Pitteloud N., Anderson R.C., Millar R.P., Quinton R., Manchishi S.M., Colledge W.H. and Hrabovszky E. (2022) Transcriptome profiling of kisspeptin neurons from the mouse arcuate nucleus reveals new mechanisms in estrogenic control of fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022 Jul 5;119(27):e2113749119. doi: 10.1073/pnas.2113749119. (IF.: **12.779**)

2. **Göcz B.**, Takács S., Skrapits K., Rumpler É., Solymosi N., Póliska S., Colledge W.H., Hrabovszky E. and Sárvári M. (2022) Estrogen Differentially Regulates Transcriptional Landscapes of Arcuate and Preoptic Kisspeptin Neuron Populations. *Frontiers in Endocrinology*: 2022.960769 (IF.: **6.055**)

6.2 PhD disszertációhoz nem kapcsolódó cikkek

1. Takács S., Bardóczy Z., Skrapits K., **Göcz B.**, Váczai V., Maglóczy Z., Szűcs I., Rác G., Matolesy A., Dhillo W.S., Watanabe M., Kádár A., Fekete C., Kalló I. and Hrabovszky E (2018) Post mortem single-cell labeling with DiI and immunoelectron microscopy unveil the fine structure of kisspeptin neurons in humans. *Brain Structure and Function*: 223(5): 2143-2156 (IF.: **3.74**)

2. Hrabovszky E., Takács S., **Göcz B.**, Skrapits K. (2019) New perspectives for anatomical and molecular studies of kisspeptin neurons in the aging human brain. *Neuroendocrinology*: 109(3):230-241 (IF.: **4.271**)

3. Rumpler É., Takács S., **Göcz B.**, Baska F., Szenci O., Horváth A., Ciofi P., Hrabovszky E. and Skrapits K. (2020) Kisspeptin neurons in the infundibular nucleus of ovariectomized cats and dogs exhibit unique anatomical and neurochemical characteristics. *Frontiers in Neuroscience* doi: 10.3389/fnins.2020.598707 (IF.: **4.309**)

4. Rumpler É., Skrapits K., Takács S, **Göcz B.**, Trinh S.H., Rác G., Matolcsy A., Kozma Z., Ciofi P., Dhillon W.S., Hrabovszky E. (2021) Characterization of kisspeptin neurons in the human rostral hypothalamus. *Neuroendocrinology*: 111(3):249-262. **(IF.: 5.135)**

5. Skrapits K., Sárvári M., Farkas I., **Göcz B.**, Takács S., Rumpler É., Vácsi V., Vastagh C., Rác G., Matolcsy A., Solymosi N., Póliska S., Tóth B., Erdélyi F., Szabó G., Culler, M.D., Allet C., Cotellessa L., Prévot V., Giacobini P. and Hrabovszky E. (2021) The cryptic gonadotropin-releasing hormone neuronal system of human basal ganglia, *eLife*: 10:e67714 **(IF.: 8.713)**