

Zárójelentés

Dr Tóth Zsuzsanna

A prolaktin-releasing peptid szerepének vizsgálata a központi idegrendszerben
T43169

Vizsgálataink egyik irányvonala a krónikus, ismételt restraint stressz és ezen belül a prolaktin releasing peptid (PrRP) szerepének tanulmányozása volt. Egy hét után a krónikus stressz tipikus jelei, például testsúlycsökkenés és kortikoszteron szint emelkedettség mindkét nembeli állatokon megfigyelhetőek voltak, egyéb jellemzői, amilyen a mellékvese illetve a csecsemőmirigy relatív tömegének megnövekedése illetve csökkenése, csak a hímekben volt számottevő. A szérumban prolaktin szint egyik nembeli állatban sem változott. A kísérleti állatok agyát kvantitatív *in situ* hibridizációval (ISH) illetve immunoautoradiográfiával dolgoztuk fel. A PrRP ISH céljára patkány genomiális DNS-ből ribopróbát állítottunk elő. PrRP az agyban három helyen termelődik; a hipotalamuszban a nucleus dorsomedialisban és a nyúltvelőben az A1 és A2 katekolaminerg sejtcsoportokban. Mivel a katekolaminerg sejtek markere a tirozin-hidroxiláz enzim (TH), ennek expresszió változását is mértük, és kettős (PrRP/TH) ISH jelölést is készítettünk. A nucleus dorsomedialisban elhelyezkedő PrRP sejteket számos itt termelődő neurotranszmitterrel próbáltuk kolokalizálni (szomatosztatin, enkefalin, TRH, szerotonin), sikertelenül. Megállapítottuk, hogy az agytörzsben nemi különbség van a PrRP mRNS és fehérje expresszióban, ez a TH expresszióra nem jellemző. A nemi különbség ovariectomiával megszüntethető. Krónikus, ismételt restraint stressz hatására mindhárom PrRP - t termelő magban megemelkedett a PrRP mRNS és fehérje expresszió, az agytörzsben a nőstényekben kisebb mértékben, mint a hímekben. Az agytörzsi PrRP - pozitív sejtek nőstényekben ösztrogén alfa receptort tartalmaztak, bétát viszont nem. A PrRP szint emelkedése az A1 és A2 sejtcsoportban fokozottabb volt, mint a TH szint emelkedése, ezért itt PrRP/TH arány eltolódott. Bilaterális mediobasalis hipotalamusz lézió kivédte az akut/krónikus restraint stresszre adott hormonális válaszokat valamint a pro-opiomelanokortin (POMC) mRNS aktivációt. Bilaterális hipotalamikusan nucleus paraventricularis (PVN) lézió az első restraint után felére csökkentette az ACTH és kortikoszteron választ, az utolsó restraint után az ACTH és POMC szint pedig alapértéket mutatott. Ugyanakkor a bilaterális PVN lézió, bár az A2 sejtcsoportban jelentősen csökkentette a PrRP és TH mRNS-ek mennyiségét alapállapotban, nem szüntette az expresszió változásban megnyilvánuló stresszválaszt.

Kapcsolódó publikációk:

Zelena D, Mergl Z, Foldes A, Kovacs KJ, **Toth Z**, Makara GB
Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary-adrenal responsiveness in repeated restraint
Am J Physiol Endocrinol Metab 285(5):E1110-E1117 (2003)

Toth ZE, Zelena D, Mergl Z, Kirilly E, Várnai P, Mezey É, Makara GB, Palkovits M
Chronic Repeated Restraint Stress Increases Prolactin-Releasing Peptide / Tyrosine Hydroxylase Ratio with Gender-Related Differences in the rat brain
J Neurochemistry, 2008 Feb;104(3):653-66.

A PrRP akut stresszben betöltött szerepét vazopresszint (AVP) nem termelő Brattleboro patkányok felhasználásával vizsgáltuk. A CRF mellett a PVN kissejtes részében termelődő AVP szinergistaként hat az ACTH felszabadításban.

Az akut stresszkísérletek során a hím homo- és heterozigóta Brattleboro állatokat 1 és 4 óra restraintnek vetettük alá. Egy óra múlva magas plazma ACTH és kortikoszteron szint volt mérhető genotípustól függetlenül. A homozigóta Brattleboro patkányok PrRP (A1, A2 sejtcsoport) és CRF (PVN) mRNS termelése fokozottabb volt, mint a heterozigótáké. Az akut stressz (4h) a krónikushoz hasonlóan genotípustól függetlenül megnövelte a TH mRNS expressziót az A1, de nem az A2 sejtcsoportban. A PrRP mRNS expresszió a krónikustól eltérően akut restraint (4h) után nem változott a heterozigóta, de megemelkedett a homozigóta állatok A2 sejtcsoportjában. Az előagy PrRP, CRF és vazopresszin expresszió kvantitatív meghatározása még folyamatban van.

Megvizsgáltuk a homozigóta Brattleboro patkányok krónikus stresszre (streptozotocin indukálta diabetes mellitus) való reakcióját is, és nem találtunk különbséget a genotípusok között. A tünetek, a megnövekedett folyadék-fogyasztás és vércukor-szint, valamint a krónikus stressz szomatikus jellemzői, két héttel a drog beadása után egyértelműen kimutathatók voltak. Bilateralis PVN lézió után a tünetek egy része nem fejlődött ki, de a kortikoszteron-szint genotípustól és léziótól függetlenül megemelkedett.

A továbbiakban a PrRP tejelválasztásban betöltött szerepét tanulmányoztuk, szoptató, 4 órai elválasztás utáni, valamint 1 illetve 3 órát újra szoptató patkányokban. A PrRP, a TH és a vezikuláris monoamin transzporter (VMAT) mRNS expressziót a nyúltvelőben és a hipotalamuszban kvantitatív ISH segítségével határoztuk meg. A PrRP mRNS expressziójában nem találtunk változást. A TH mRNS expresszió a noradrenerg A1, A2, és a prolaktin elválasztás szabályozásában fontos hipotalamikus, dopaminerg A12 és A14 katekolaminerg sejtcsoportokban nem változott, viszont az A11 és az A13 területeken elválasztás hatására megemelkedett. A VMAT mRNS termelés az elválasztás hatására szintén fokozódott az A12 sejtcsoport dorsomedialis szubdivíziójában és az A13 sejtcsoportban. Az A12 sejtcsoportban ez a fokozottság az újraszoptatás után 1 órával még fennállt, de 3 órával már nem. A TH foszforilált, aktív formája a pTH eloszlását immunhisztokémiával vizsgáltuk. Az eredmények feldolgozása folyamatban van. Kontroll anyákban, az A12 sejtcsoport dorsomedialis régiójában és az eminentia mediana (EM) területén nincs pTH pozitív sejt és terminális, de ovariectomia hatására megjelenik a festődés. Aktivált TH sejtek a hímek A12 sejtcsoportjában is megfigyelhetők. Elválasztás hatására (4h) először az EM külső rétegében mutatkozik pTH pozitivitás, később (24h) az A12 sejtcsoport dorsomedialis szubdivíziójában is.

A TH aktiválódása a hipotalamusz A12 - EM régiójában összefüggésben áll tehát a vérplazma prolaktin koncentrációjával. A pTH immunoreaktivitás csupán az A12 sejtcsoport dorsomedialis szubdivíziójában figyelhető meg, ahol a dopaminerg neuronokat jellemző összes fő marker kimutatható és, ahol elválasztás hatására a VMAT mRNS expresszió is fokozódott. Úgy tűnik, hogy a prolaktin elválasztás szabályozása rövid távon TH aktiváció/foszforiláció az A12 neuronok terminálisiban (EM) és VMAT mRNS upreguláció magukban az A12 neuronokban, ahol a TH foszforiláció hosszabb távon történik meg. A PrRP ezekben a folyamatokban nem vesz részt.

Eredményeinkből két cikket készülünk publikálni.

Kapcsolódó publikáció:

Zelena D, Filaretova L, Mergl Z, Barna I, **Tóth ZE**, Makara GB.

Hypothalamic paraventricular nucleus, but not vasopressin, participates in chronic hyperactivity of the HPA axis in diabetic rats.

Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006 Feb;290(2):E243-50

Konfokális mikroszkópiát használva feltérképeztük a PrRP rostok által beidegzett területeket. A legdúsabb terminális-hálózatot a nucleus interstitialis striae terminalis (NIST) területén, az amigdalában, a dorsomedialis magban és a dorsolaterális hipotalamuszban találtuk. PrRP és TH kettős immunfestés alapján a terminálisok konfokális mikroszkópos analízisével próbáltuk eldönteni, hogy a beidegzés egy adott területen az agytörzsi eredetű (TH tartalmú) vagy a hipotalamikus lokalizációjú (TH-et nem tartalmazó) PrRP termelő sejtekből ered-e. Úgy találtuk, hogy a végződések minden vizsgált területen különböző mértékben, de vegyes eredetűek. Nyomkövető anyagokat is alkalmaztunk, de azok felvétele után a PrRP immunhisztokémiailag nem volt kimutatható a rostokban. Az NIST-ben CRF immunpozitív sejteken, a dorsolaterális hipotalamuszban melanin-koncentráló hormon (MCH) és orexin A immunpozitív neuronális elemeken találtunk PrRP- pozitív végződések, míg az amigdalában sem galanin sem CRF-pozitív neuronális elemek nem voltak kapcsolatban PrRP tartalmú terminálisokkal. Elektronmikroszkópos feldolgozást nem tudtunk végezni, mivel a kereskedelembe kapható poliklonális PrRP antitest csak erős tritonos permeabilizálás és magas hőfokon történő antigén feltárás mellett működött hatékonyan, mely eljárások a szöveti struktúrát roncsolják. A szinaptikus kapcsolatok jelenlétét az MCH illetve Orexin A tartalmú idegi elemeken egy a szinapszisokra jellemző fehérje, a szinaptofizin kimutatásával igazoltuk a PrRP pozitív terminálisokban. Kimutattuk a PrRP receptorának jelenlétét is az MCH illetve Orexin A immunpozitív sejtek jelentős részén. A sejtek aktiválására (Fos-pozitivitás) 72 órás REM alvásmegvonást és azt követő 3 órás pihenést alkalmaztunk patkányokon. Az alvásmegvonás az orexin A-pozitív neuronok 5-6%-át, az azt követő pihenés az MCH-pozitív neuronok mintegy 60%-át aktiválta, az aktivált neuronok közül sok állt szoros kapcsolatban PrRP tartalmú végződésekkel. Az orexin A tartalmú sejtek nagy hányada mutatott Fos-pozitivitást 12 órás hideg (4-5°C, sötétben) utáni 3 órás szobahőmérsékleten történő regenerációra. A hideghez való adaptációt a tizenhárom sávos ürge (*Spermophilus tridecemlineatus*) hibernációja kapcsán is vizsgáltuk. Ehhez az ürgeket 4-5°C-on tartottuk sötétben. A hibernáció különböző fázisaiban különböző sejtcsoportok lettek aktívak. A dorsolaterális hipotalamusz területén a hibernált állapotban nem, ébredés után, azonban a fiziológiás állapot helyreállításával megjelentek Fos immunpozitív sejtek.

Az alvásmegvonás során az állatok testsúlynövekedése elmaradt a kontrollokétól, táplálékfelvételük nem változott. Az A1 sejtcsoportban dramatikusan megemelkedett, az A2 sejtcsoportban nem változott a PrRP immunpozitív neuronok száma. A 12h hideg hatására az állatok lehűltek, étel- és folyadékfogyasztásuk csökkent. A PrRP immunreaktivitás kvantifikálása folyamatban van.

A nucleus dorsomedialist ellátó PrRP rostok szerepét a táplálkozás szabályozásban vizsgáltuk. Jelentős neuronális aktivációt (Fos pozitivitás) tapasztaltunk a mag ventralis szubdivíziójában két napi éheztetést követő 2 órás újraetetés után. Féloldali, nyúltvelő-híd határon történő pályaátmeszés az azonos oldali PrRP- és glükogén-szerű fehérje (GLP) - pozitív rosthálózat drámai megritkulását eredményezte a nucleus dorsomedialis területén és elmaradt az újraetetés követő neuronális aktiváció is. Az átmetszéstől caudalisan a PrRP és GLP immunpozitivitás feldúsult a felszálló rostokban.

Kapcsolódó publikációk:

Rege Sugárka Papp, Eszter Kirilly, Tamás Kitka, György Bagdy, Miklós Palkovits and Zsuzsanna E. Tóth

Prolactin - releasing peptide expressing neurons directly influence the orexinergic system *via* connections with melanin-concentrating hormone and orexin producing cells in the hipotalamusz.

FENS Abstr. vol 4., 160.12, 2008.

Éva Renner, Nela Puskás, **Zsuzsanna E. Tóth**, Miklós Palkovits

The role of neuropeptide-containing fibers in the *c-fos* activation of neurons in the dorsomedial hypothalamic nucleus in response to refeeding of fasted rats.

IBRO 2008, Debrecen (poszter)

Bratincsák A, McMullen D, Miyake S, **Tóth ZE**, Hallenbeck JM, Palkovits M.

Spatial and temporal activation of brain regions in hibernation: c-fos expression during the hibernation bout in thirteen-lined ground squirrel.

J Comp Neurol. 2007 Dec 1;505(4):443-58.

Az *in vitro* tervezett kísérletekhez heteronuklearis RNS próbát terveztünk a PrRP - t kódoló génszakasz első két intronjára. A próba előállításához patkány genomiális DNS-ből PCR-rel amplifikáltuk az adott DNS szekvenciákat, majd a termékeket BlueScript vektorba klónoztuk. Az első intronra tervezett próba kontroll patkány metszeteken az *in situ* hibridizációk során hátteresnek és használhatatlannak bizonyult, a második intronra tervezett próba szép, de gyenge jelet adott. Az organotipikus szövetszeletek vastagsága miatti nagyobb háttér mellett ezért ez a próba sem adott értékelhető jelet, így a kísérleteket a PrRP mRNS elleni ribopróbával végeztük. Az PrRP génszabályozás vizsgálatához 6-8 napos újszülött patkányok felhasználásával, a terveknek megfelelően agytörzsi organotipikus tenyésztet állítottunk be. A kísérleti munkát lassította a saját szövettenyésztő helység hiánya. A szövetszeletek két hetes tenyésztés után megőrizték a nyúltvelőre jellemző szöveti szerkezetet és a neuronok túlélési aránya kiváló. A szeleteken TH és PrRP immunfestést és ISH-t végeztünk, mely a pozitív sejtek *in vivo* szerinti eloszlását mutatta az A1 és A2 sejtcsoportnak megfelelő területen. Ezenkívül PrRP mRNS expresszáló sejtek jelentek meg az area postremában. A PrRP neuronok reakcióképességét K^+ ion (50mM) okozta hyperpolarizációval és a neuronális sejtaktivációt jelző Fos immunpozitivitás megjelenésével mutattuk ki, tetrodotoxin tartalmú médiumban. Tetrodotoxin hatására a szeletekben a spontán aktivitás megszűnik, és csak a közvetlen hatások érvényesülnek. A tetrodotoxin önmagában nem hatott a PrRP mRNS expresszióra. A szeleteken elsőként a GABA-A receptor gátló bicuculline hatását vizsgáltuk, mivel szövetkultúrában gyakran túlsúlyba kerül a GABAerg gátlóhatás. A bicuculline (10 μ M) megnövelte a PrRP mRNS expressziót az A1 és az A2 sejtcsoportban 3 óra inkubáció után. Mivel felnőtt állatban ösztrogén alfa receptort mutattunk ki az agytörzsi PrRP sejtekben, vizsgáltuk az ösztrogén agonista hatását is (10nM, 100nM, 1 μ M) a szeletek PrRP mRNS expressziójára, mely azonban 24 óra inkubáció után sem változott. A hipotalamuszból leszálló autonóm szabályozásban résztvevő pályák nagyrészt vazopresszint tartalmaznak, ezért vazopresszin agonistát is alkalmaztunk (1nM). Az A2 sejtcsoportban 6 óra inkubáció után lecsökkent, míg az A1 sejtcsoportban nem változott a PrRP mRNS expressziója. Eredményeinket poszter formájában készülünk bemutatni a MIT legközelebbi kongresszusán.

Munkánk során gyakran adódott metodikai problémánk, mivel jól működő legtöbbször poliklonális antitestjeink azonos gazdaállatból származtak. Többes fluorescens jelölésnél egy elérhető megoldás az F(ab) fragmensek használata, ám sokszor gondos beállítás után sem megbízható az eredmény, amire maga a forgalmazó cég is felhívja a figyelmet. Gondot jelentett az is, hogy egyes antitestek, például a PrRP is, csak erős antigén feltárás után és az immunreakció amplifikálásával mutathatók ki. Az amplifikálás peroxidáz enzim (HRP) katalizálásával megy végbe, amennyiben viszont egy következő immunreakciót is erősíteni szeretnénk, egy előzően bekötött, működő HRP miatt hamis eredményt kapunk. Új módszert vezettünk be, mellyel a felvetett problémák egyszerre küszöbölhetőek ki. Az antigén feltáráshoz használatos mikrohullámú kezelés meggátolja a gazdaállat azonosságából eredő keresztreakció kialakulását és a HRP enzimet is deaktiválja. Az eljárással akár ugyanannak a szekunder antitestnek a többszörös felhasználásával a teljes fluorescens spektrumot felölelő többszörös immunfestést tudunk végrehajtani. A módszer jelentőségét bizonyítja, hogy meghívott előadásként szerepel 2008. novemberében a Society for Neuroscience kongresszushoz kapcsolódó kurzuson (SNF Short Course #2: Seeing is Believing: Antibodies and how to use them), melynek anyaga kiadványként is megjelenik.

Az amplifikálási technika érzékenységét és jelentőségét bizonyítottuk a zöld fluorescens fehérje (GFP) kimutatásában is. Mivel a GFP-t specifikus szövetekben illetve sejtekben expresszáló transzgen egerek használata nagyon terjed, ez a probléma sok tudományterület kutatóját érinti. Nőstény egereket hím transzgenikus egérből származó, GFP-t expresszáló csontvelővel transzplantáltunk, majd féloldali agyi sztrókot idéztünk elő. Kimutattuk, hogy a regeneráció során a csontvelői őssejtek bejutnak az agyba, differenciálódnak és bennük a GFP expressziója csökken. A sejtek 10% -a két hónap múlva GFP-t immunhisztokémiai kimutatható szinten már nem is termel, csak az Y kromoszóma detektálása bizonyítja eredetüket. Amplifikálással a GFP-t expresszáló sejtek, mintegy 90% láthatóvá tehető. A GFP saját fluorescenciáját detektálva, illetve hagyományos fluorescens immunfestési módszerrel a GFP termelő sejtek jelentős részét nem látjuk. A módszerrel kimutattuk, hogy agyi sztrókot követően számos csontvelői őssejt alakul át endoteliális sejté, mely folyamatot megfelelő drogok alkalmazásával ösztönözni lehet.

Kapcsolódó publikációk:

Toth ZE, Mezey E.

Simultaneous Visualization of Multiple Antigens with Tyramide Signal Amplification Using Antibodies from the Same Species
J Histochem Cytochem 55(6):545-554 (2007)

Toth ZE, Shahar T, Leker R, Szalayova I, Bratincsak A, Key S, Lonyai A, Nemeth K, Mezey E.

Sensitive detection of GFP utilizing tyramide signal amplification to overcome gene silencing
Exp Cell Res 313(9):1943-1950 (2007)

Toth, Z.E., Leker, R.R., Shahar, T., Pastorino, S., Szalayova, I., Asemenew, B., Key, S., Parmelee, A., Mayer, B., Németh, K., Bratincsak, A., Mezey, E.

The combination of Granulocyte Colony Stimulatory Factor and Stem Cell Factor Significantly Increases the Number of Bone Marrow Derived Endothelial Cells in Brains of Mice Following Cerebral Ischemia
Blood. 2008 Jun 15;111(12):5544-52.

A munkaterv végrehajtása során kidolgozott *in situ* hibridizációs technikát a következő kollaborációs munkákban használtuk fel:

Czirják G, **Toth ZE**, Enyedi P

Characterization of the heteromeric potassium channel formed by Kv2.1 and the retinal subunit KCNV2 in *Xenopus* oocytes

J Neurophysiol. 2007 Sep;98(3):1213-22.

Palkovits M, Deli MA, Gallatz K, **Toth ZE**, Buzas E, Falus A

Highly activated c-fos expression in specific brain regions (ependyma, circumventricular organs, choroid plexus) of histidine decarboxylase deficient mice in response to formalin-induced acute pain

Neuropharmacology, 53(1):101-12 (2007)