

A laterális septum kisspeptin termelő sejtjeinek fejlődéstani vizsgálata

36. OTDK Biológia Szekció

Szentkirályi-Tóth Soma, Biológia BSc. III.

Állatorvostudományi Egyetem; Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Reproductív
Neurobiológia Kutatócsoport

Témavezetők:

Dr. Hrabovszky Erik¹

Dr. Puska Gina²

1. Kutatócsoport vezető, Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
2. Egyetemi adjunktus, Állatorvostudományi Egyetem

Tartalom

Rövidítések jegyzéke.....	3
I. Bevezetés, irodalmi áttekintés.....	4
II. Célkitűzések.....	6
1. A KP expresszió változásának vizsgálata az egyedfejlődés során, a molekulát termelő neuronok száma szerint	6
2. A KP expresszió fiatalkori beindulásának indukciója	6
3. Ivari dimorfizmus jelenléte a sejtpopulációban	7
III. Anyag és módszer	8
1. Kísérleti állatok	8
2. A KP neuronok számának meghatározása különböző egyedfejlődési szakaszokban.....	8
3. A KP expresszió exogén indukciója.....	9
4. Ivari dimorfizmus vizsgálata a KP sejtpopulációban	10
IV. Eredmények.....	11
1. A KP neuronok számának változása az egyedfejlődés során.....	11
2. A KP expresszió fiatalkori beindulásának indukciója	12
3. Ivari dimorfizmus jelenléte a sejtpopulációban	13
V. Következtetések.....	15
1. A KP expresszió mértékének változása az egyedfejlődés során	15
2. A KP expresszió fiatalkori beindulásának indukciója	15
3. Ivari dimorfizmus jelenléte a sejtpopulációban	16
VI. Összefoglalás.....	17
Köszönetnyilvánítás	18
Irodalomjegyzék	19

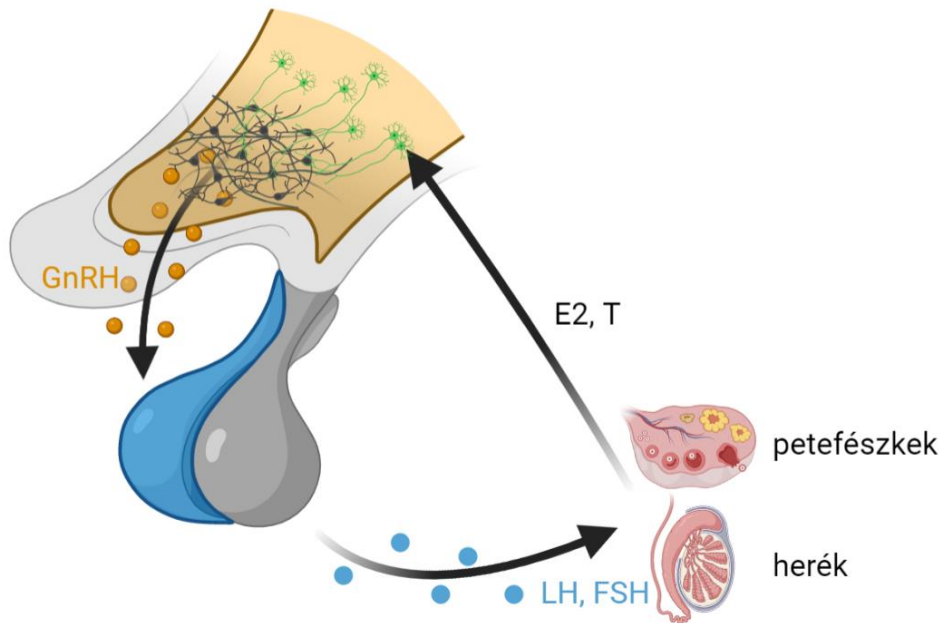
Rövidítések jegyzéke

AVPV	anteroventrális periventrikuláris mag (hipotalamusz)
DHT	dihidrotesztoszteron
E2	ösztadiol
ER α	alfa típusú ösztrogén receptor
FSH	follikulusstimuláló hormon
GnRH	gonadotropin felszabadító hormon
KISS1	a kisspeptint kódoló gén
KP	kisspeptin
LH	luteinizáló hormon
LS	laterális <i>septum</i>
PBS	foszfátpuffer oldat
SD	szórás
SE	sztenderd hiba
T	tesztoszteron

I. Bevezetés, irodalmi áttekintés

A reprodukció neuroendokrin szabályozásának vizsgálata már az 1970-es években megkezdődött a gonadotropin felszabadító hormon (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) felfedezésével. E hormon kezdeti elnevezése luteinizáló hormont (LH) felszabadító hormon (luteinizing hormone-releasing hormone) volt, mely név csupán a molekula hipofízisre gyakorolt egyik hatására utalt. Később terjedt el a GnRH elnevezés, mikor kiderült, hogy ugyanez a hormon felelős a hipofízis follikulus stimuláló hormon (FSH) elválasztásának fokozásáért is. A következő évtizedek kutatásai a neuroendokrin tudomány robbanásszerű fejlődését hozták. Számos részlet derült ki a GnRH termelő idegsejtek működéséről, és a GnRH gonadotropin termelő sejtekre gyakorolt hatásainak mechanizmusáról.

A pulzatilis GnRH stimuláció hatására az adenohipofízisben LH és FSH termelődik [1.], melyek a véráram segítségével az ivarszervek felé szállítódnak. Míg hím egyedekben az LH a Leydig-sejtek működésének serkentésével a herék tesztoszteron (T) termelését segíti, az FSH a Sertoli-sejtek spermatogenetikus működésének szabályozásában játszik szerepet [2.]. Nőstényekben az FSH a tüszők fejlődését és érését okozza, míg az LH az úgynevezett „LH csúcs” során az érett tüszők repedésében, az ovulációban játszik szerepet, melyet a sárgatest kialakulása követ. Az ivarszervek, mint belső elválasztású mirigyek, szexuáliszteroidokat termelnek, melyek mind hím, mind nőstény állatokban visszacsatolnak a GnRH termelés szabályozására [2.]. Mivel jelen dolgozat tárgyát főképpen a nőstényekben fontos ösztadiol (E2) általi visszacsatolás képzi, így a továbbiakban ennek bemutatására szorítkozom. A hipotalamikus GnRH neuronok szabályozása az alfa típusú E2 receptoron ($ER\alpha$) keresztül megy végbe [3.], azonban ezen előbbi idegsejtek nem rendelkeznek ezzel a receptortípussal. Ez alapján már a XX. század vége felé sejteni lehetett, hogy az ösztrogén visszacsatolás GnRH idegsejtek felé interneuronok közvetítésével történik. A kisspeptin (KP) neuropeptidet termelő idegsejtek azonban csak a 2000-es években kerültek a tudományos érdeklődés előterébe, mint a folyamatban kulcsfontosságú neuronok. A hipotalamuszban található KP-termelő sejtek rendelkeznek $ER\alpha$ -val. Ez úton az ösztrogén szignálok más agyterületről érkező egyéb jelekkel (mint például a hipotalamusz szuprakiazmatikus magjából érkező cirkadián szignálok [4.]) való integrálásával szabályozzák a GnRH-termelést, és azon keresztül a reprodukciót (1. ábra [5.]).



1.ábra: A hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely működése. Az ábrán zölddel jelzett KP sejtek állnak a tengely csúcsán, szabályozva a feketével jelzett hipotalamikus GnRH sejtek működését. Utóbbiak működése az adenohipofízisben (kék rész) LH és FSH termelődést idéző elő. Ezek a gonadotropinok az ivarszervek (másnéven gonádok) működését befolyásolják, melyek közben szexuáliszteroidokat (például T és E2) termelnek. Ezek a hormonok hatással vannak a KP neuronokra, bezárva ezzel a visszacsatolási kört.

A KP-GnRH rendszer abnormalis működése olyan veleszületett, vagy szerzett betegségekhez vezethet, mint a hipogonadotróp hipogonadizmus vagy a policisztás ovárium szindróma.

Kisspeptint termelő idegsejtek azonban nem csupán a hipotalamuszban, hanem egyéb, úgynevezett extrahipotalamikus régiókban is találhatóak. KP expressziót három fő extrahipotalamikus agyterületen mutattak ki. Ezek a mediális amigdala, a *stria terminalis* beágyazott magja, és a septum laterális almagja (LS). Ezen agyrégiók, bár különböző funkciókat töltenek be, a KP expresszió hasonló növekedésével reagálnak a megnövekedett szérumszintű E2 szintre, mely folyamatban az ER α játszik szerepet [6.]. Hím patkányokban megemelkedett LH és FSH szérumszinteket mutattak ki T vagy dihidrotesztoszteron (DHT) kristályok LS-be való beültetését követően [7.,8.]. Így funkcionális kapcsolat valószínűsíthető az LS és a szaporodást szabályozó hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely között. [9.]

II. Célkitűzések

A perinatális/neonatális, illetve fiatal korban az agy jelentős fejlődésen megy keresztül. Új szinaptikus kapcsolatok kialakulása mellett, jelentős génexpressziós változások is zajlanak. Korábbi kutatások alapján már tudjuk, hogy az E2 serkenti a KP termelést a LS KP neuronjaiban [6.]. Nem ismert jelenleg, hogy mely életkorban kezdődik el az LS KP expressziója? Az expresszió megjelenése lehet-e következménye az emelkedő E2 szinteknek? Továbbá, a KP termelő neuronok száma különbözik-e a két nemben? Ezen ismeretek hiányában, kutatásunk során az alábbi három kérdést tettük fel:

1. A KP expresszió változásának vizsgálata az egyedfejlődés során, a molekulát termelő neuronok száma szerint

A fejlődő agy az egyedfejlődés során jelentős anatómiai és kémiai változásokon esik át, így a KP és GnRH rendszerek is átalakulnak. [10., 11.] Egy 2010-es kutatás végigkövette a hipotalamikus anteroventrális periventrikuláris (AVPV) mag KP sejtpopuláció *KISS1*-ről (a KP-t kódoló gén) történő mRNS termelését 3 napos kortól nyolc hetes korig. [11.] A szerzők szerint, újszülött állatban nem volt KP mRNS termelés, majd 3 napos kortól fokozatosan egyre több sejt mutatott expressziót. Munkahipotézisünk szerint az extrahipotalamikus régiókban is posztnatálisan kezdődik a KP expressziója. Elképzelésünk az volt, hogy a KP termelése időben összefügg az E2 szint pubertást megelőző emelkedésével, mint ahogy az az AVPV KP neuron populáció esetében már ismert. Különböző életkorú állatokból történő mintavétellel vizsgáltuk meg a KP idegsejtek számát, és annak időbeli változásait.

2. A KP expresszió fiatalkori beindulásának indukciója

Előkísérleteink alkalmával újszülött egerekben még nem tudtuk KP neuronok jelenlétét kimutatni az LS területén, míg felnőtt állatokban már tisztán azonosítható volt a sejtcsoport, mely expresszálja ezt a neuropeptidet. Az E2 felnőtt egerekben jelentős mértékben képes növelni a KP termelés szintjét az LS-ben [6.], rávilágítva arra, hogy ez a molekula kulcsfontosságú szerepet játszhat a KP termelés szabályozásában. Elképzelésünk szerint, a KP termelés elindításában is oki szerepet játszhat a petefészkek életkorral fokozódó E2 termelése. Kísérletünkben felvetettük, hogy exogén E2 kezeléssel beindítható-e olyan életkorban már a KP termelés az LS területén, amikor az kontroll állatokban még nem mutatható ki?

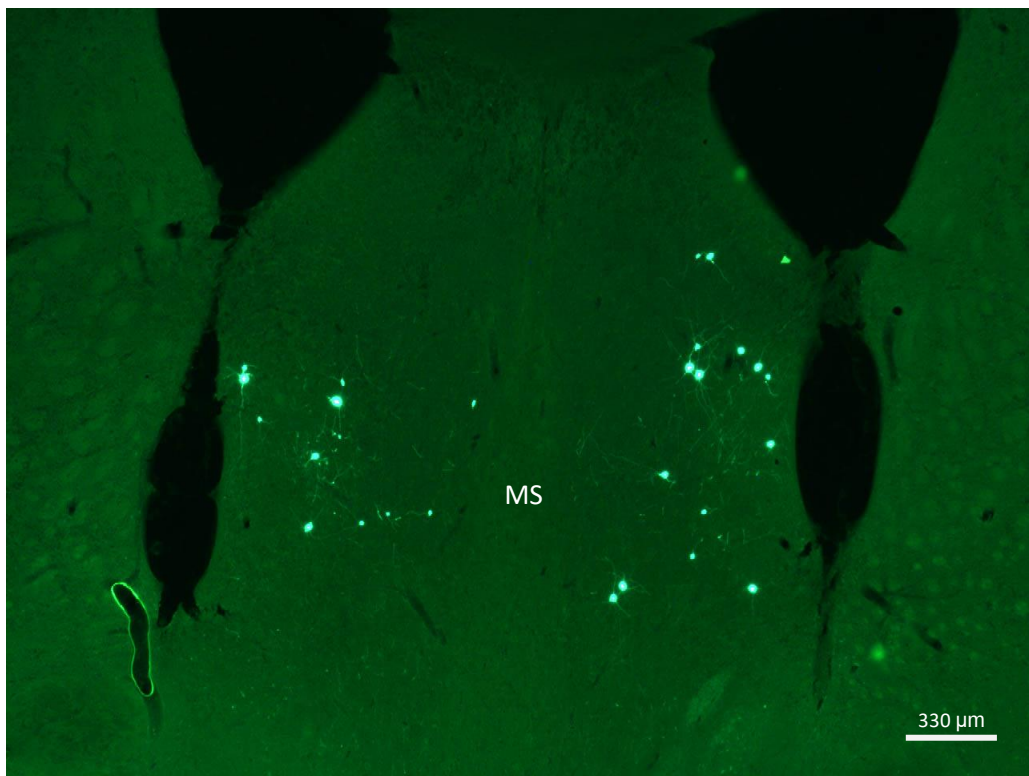
3. Ivari dimorfizmus jelenléte a sejtpopulációban

A hipotalamikus KP sejtpopulációk erős ivari dimorfizmust mutatnak, legjellemzőbben az AVPV magban, ahol nőstényekben egy nagyságrenddel több KP sejt figyelhető meg, mint hímekben. [12.] Fejlődéstani vizsgálatsorozatban ezért felvetettük azt is, hogy vajon hímekben és nőstényekben hasonló életkorban kezdődik-e meg, és ugyanolyan ütemben növekszik-e a LS KP expressziója, és végül, hasonló felnőttkori sejtszámot látunk-e hímekben, mint nőstényekben?

III. Anyag és módszer

1. Kísérleti állatok

A kísérletekhez a *kp/cre-gfp//Gt(ROSA)26Sor_CAG/LSL_ZsGreen1 (TmTm)* (KP-Cre/ZsGreen) törzsből származó transzgenikus egerek szöveteit használtuk. (2. ábra) A törzs KP sejteiben szelektíven expresszálódik a ZsGreen nevű zöld fluoreszcens fehérje [13.].



2. ábra: ZsGreen jel egér LS-ben. A világító sejtek kirajzolják az LS területét az agykamrák közötti területen. A képen középen elhelyezkedő, világosabb struktúra a mediális septum (MS), melyet körülölel a laterális mag. A transzgenikus állatokban egyértelműen elkülöníthetők a KP sejtek.

Az állatok Kiss-Cre hím egerek [14.] az Ai6(RCL-ZsGreen) indikátor vonalból származó nőstényekkel (The Jackson Laboratory, JAX No. 007906) való keresztezéséből származnak. Az állatok a kísérletek elvégzése előtt a farokvégből vett minta felhasználásával genotipizálásnak lettek alávetve, biztosítva a megfelelő, heterozigóta genotípust. Az egerek tartása és a kísérletek a releváns jogszabályoknak megfelelően történtek. [15.]

2. A KP neuronok számának meghatározása különböző egyedfejlődési szakaszokban

A kérdés vizsgálatához szükséges volt korkategóriák felállítása, melyeket az ismert egér egyedfejlődési stádiumok alapján tettünk meg. A korkategóriák (napban): 20-24, 26-30, 33-36, 40-45, 53-60, 90-100, 140-160, 180-200. A két ivar képviselői között kialakított,

összesen 16 csoportból 13 esetében 3-3, míg egy csoportnál 1, egy csoportnál 2, egy csoportnál pedig 5 mintát gyűjtöttünk ezidáig. Az agyakat begyűjtés után 4%-os formaldehid oldatban, 2 napig, 4°C-os hőmérsékleten tároltuk a szövet fixálásához. A 2. nap után további 1 napig 20%-os szaharóz oldatban (foszfátpufferben (PBS: 0,2g MgCl₂; 1,5 g NaH₂PO₄; 15,1g Na₂HPO₄; 0,5 g NaCl / 1000ml H₂O) oldva) inkubáltuk 4°C-on, a fagyasztás roncsoló hatásainak elkerülése érdekében. A mintákat ezután szárazjégen lefagyasztottuk. Fagyasztó mikrotómon 40 µm vastag, koronális metszeteket készítettünk az LS teljes kiterjedésében. A metszeteket ezután PBS-ből tárgylemezre húzva, nedvesen értékeltük ki fluoreszcens mikroszkóp alatt (gerjesztési hullámhossz: 496 nm).

3. A KP expresszió exogén indukciója

Az endogén E2-termelés zavaró hatásainak kiküszöbölése érdekében az állatokat PBS-ben oldott ketamin (25mg/kg), xilazin (5 mg/kg), és prometazin (2,5 mg/kg) keverékének intraperitoneális injekciójával elaltattuk, majd ovariectomizáltuk. A beavatkozás során potenciálisan fellépő fertőzések megelőzése érdekében a peritoneális üregbe Augmentin-t (GlaxoSmithKline plc, Brentford, Egyesült Királyság; 30 µg/10 testtömeg g, fiziológiás sóoldatban feloldva) fecskendeztünk. A seb fertőtlenítésére Baneocin-t (Sandoz GmbH, Kundl, Ausztria) használtunk a sebfelületen, majd a műtét befejeztével lezártuk a sebet. Az állatokat a műtét után 8 napig gyógyulni hagytuk, majd a kilencedik napon újabb altatás után minden állat bőre alá egy szilikon kapszulát ültettünk. A kapszula 100 µg/ml koncentrációjú 17-β-ösztradiolt (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) tartalmazott napraforgóolajban oldva. A kapszula dimenziói a következők voltak: hossz: 10 mm; belső átmérő: 1,57 mm, külső átmérő: 3,18mm.

Az egereket a kapszula beültetése utáni 4. napon termináltuk. Az eredmények megfelelő értékeléséhez meg kellett győződnünk az E2-kezelés hatékonyságáról. Tudjuk, hogy a méh endometriuma az ivari ciklus során az endogén E2 termelés hatására vastagságát és vaszkularizációját változtatja; a megemelkedett szérum E2 szint így az endometrium megvastagodását és vaszkularizációját okozza, felkészítve azt a blasztocisza beágyazódására. Ezen okból az *uterus* tömegének növekedése jó indikátora a hormonkezelés hatékonyságának, főként, ha figyelembe vesszük, hogy ebben a korban az állatok nemi ciklusa még nem működik. Így minimális endogén E2-termeléssel rendelkeznek, és a méh tömege csak az egyedfejlődés során mutatott progresszív növekedést mutatja. A hormonkezelt állatok méhét eltávolítottuk, majd analitikai mérlegen lemértük. Az E2-kezelt állatok méhének súlyát olyan 22 napos egerekével hasonlítottuk össze, melyek nem

részesültek kezelésben. A hormonkezelés hatásának értékelését ilyen módon korábban laboratóriumunk már elvégezte, mely folyamat során azt hatásosnak ítélték. Ezen kísérletek során az eredmények további validálására a CalBiotech Kit ES180S-100 számú ELISA csomagot is használták szérumban E2-szintek mérésére, mely egy korábbi kutatásban a legpontosabb értékeket mutatta 9 összehasonlított csomag közül [16.] Az eredmények szerint a kezelés sikeresen megemeli az állatok hormonszintjét, melynek mértéke a fiziológiai határokon belül marad, és a ciklizáló nőstény egerek erős negatív visszacsatolással járó, magas E2 szérumban koncentrációval jellemezhető állapotát imitálja. [13.] Az állatok agyát az előzőekben leírt módszerrel gyűjtöttük be és értékeltük ki. A kezelt állatokban megfigyelt sejtszámokat az egyedfejlődésre vonatkozó kísérleteinkben gyűjtött, 20-24 napos nőstény egerek adataival hasonlítottuk össze.

4. Ivari dimorfizmus vizsgálata a KP sejtpopulációban

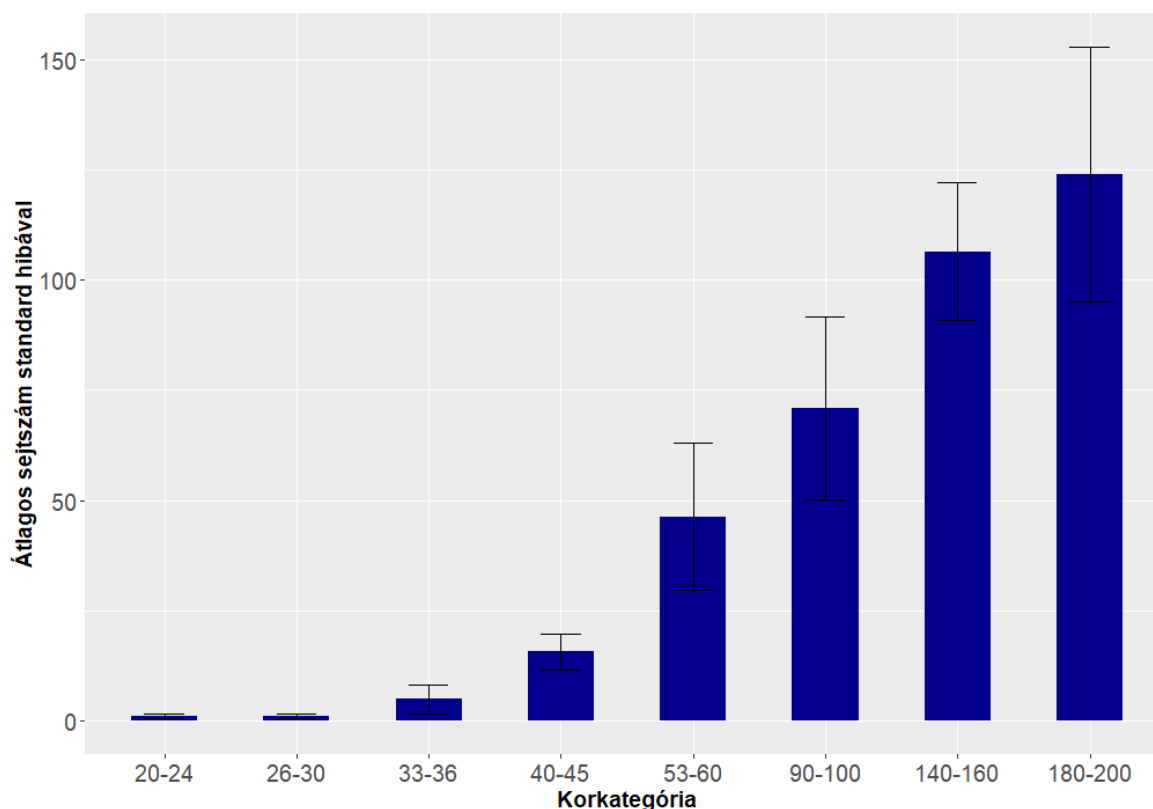
A vizsgálatokra az egyedfejlődésre vonatkozó kísérlet során gyűjtött adatokat használtuk fel. Az adatok feldolgozását ábrák alapján végeztük, mivel az alacsony mintaelemszám és a jobbra ferde eloszlás nem tette lehetővé statisztikai teszt alkalmazását.

IV. Eredmények

1. A KP neuronok számának változása az egyedfejlődés során

A kísérlet során összesen 47 állattól gyűjtöttünk adatot, melyek 8 korcateróriából származtak (3. ábra). Az alábbi korcateróriákban tértünk el a korcsoportonkénti és ivaronkénti 3-as mintaelemszámától: a hímeknél a 20-24 napos korcateróriában 2 állat adatai szerepelnek. A nőstények esetében a 90-100 napos korcateróriában 5 állat adatait gyűjtöttük össze, mivel az első három állatból kettő kiugró értékeket mutatott, és a mintaelemszám növelésével a valós adatokhoz közelebbi értékeket kaptunk. Az állatok felnövéséhez szükséges hosszú idő miatt 180-200 napos nőstényből ezidáig egy adat áll rendelkezésünkre.

Az első két korcateróriában (20-24 és 26-30 nap) kisszámú KISS1 termelő neuront



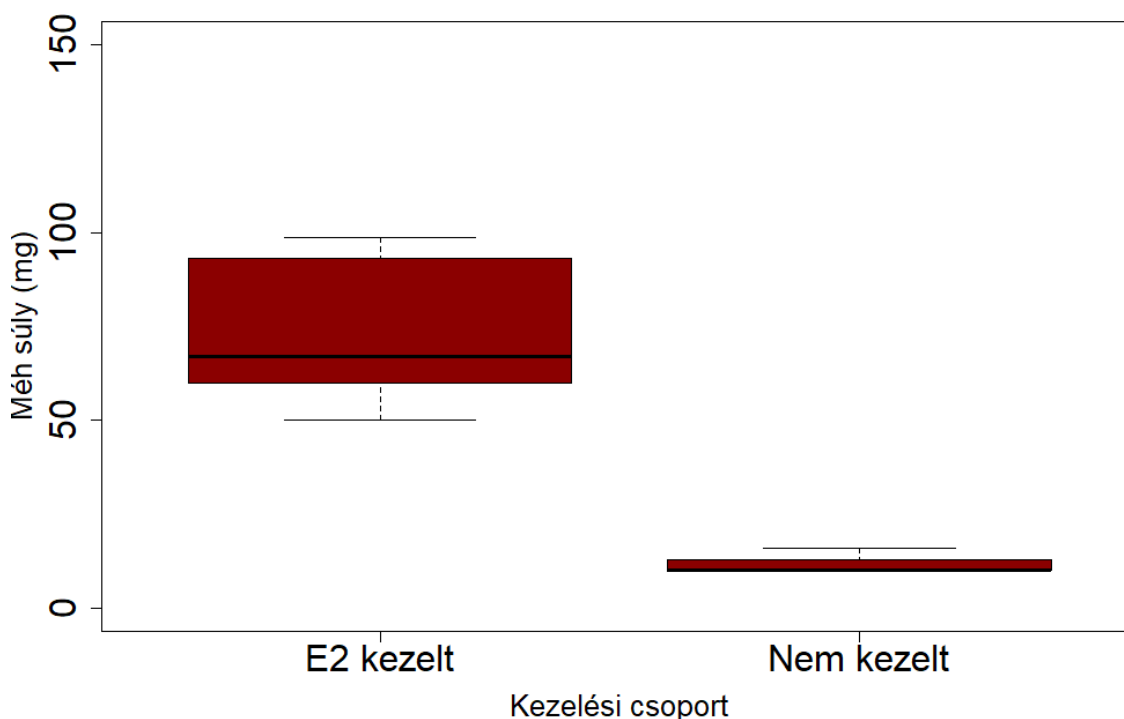
3. ábra: Átlagos KP termelő sejtek száma korcsoportonként, $\pm SE$. Az „x” tengelyen a kísérlet során felhasznált nyolc korcateróriát látjuk rendre napban megadva, míg az „y” tengely az állatokban megfigyelt sejtszámokat ábrázolja. Az oszlopok magassága a korcsoportonkénti átlagos sejtszámot, míg a függőleges vonalak hossza a sztenderd hibát ábrázolja.

figyeltünk meg az LS-ben, mely sejteket a ZsGreen fluoreszcens fehérje jelenléte alapján azonosítottunk. Az észlelt sejtek számában egészen 33-36 napos korig nem mutattunk ki növekedést. A sztenderd hiba (SE) is hasonló mértékű ezekben a korcateróriákban; ez annak köszönhető, hogy a 20-24 napos egyedek között a legtöbb KP sejttel rendelkező mintában 2, míg a 26-30 napos korcateróriában 3 KP neuront figyeltünk meg. A 33-36 napos

korkategóriában látható az expresszió első jelentősebb, több sejtet érintő terjedése. A kor előrehaladtával a KISS1 gén kifejeződése egyre több sejtben volt észlelhető, a KP neuronok számának növekedése az egerek életének vizsgált szakaszában végig jelen volt. Eredeti munkahipotézisünkkel ellentétben még a kifejlett egyedek két csoportja között is láttunk eltérést. További észrevételünk volt, hogy az SE az összes korkategóriában az átlagos értékekhez viszonyítva magas értékeket ér el, és az SE/átlag arány az egerek korával fordítottan arányosan változik.

2. A KP expresszió fiatalkori beindulásának indukciója

Kutatócsoportunk korábbi munkája alapján tudjuk, hogy az E2 tartalmú, bőr alá ültetett szilikon kapszula fiziológiás magas szérumszintű E2-szintet hoz létre. Egy friss, a „Proceedings of the National Academy of Sciences” című folyóiratban publikált cikkben kollégáim leírták, hogy a módszereknél megadott paraméterezésű kezelés 136,5 mg-os méh súlyokat eredményezett, míg a kontrollcsoport ebben a kísérletben 18 mg-os átlagos értékeket mutatott. [13.] A jelen kísérletben a hormonkezelés hatékonyságának értékelésére használt, kipreparált méhek (n=5) a kezelt állatok csoportjában jelentős növekedésen mentek keresztül, 73,68 mg-os átlagos tömeggel rendelkeztek. A legalacsonyabb mért tömeggel



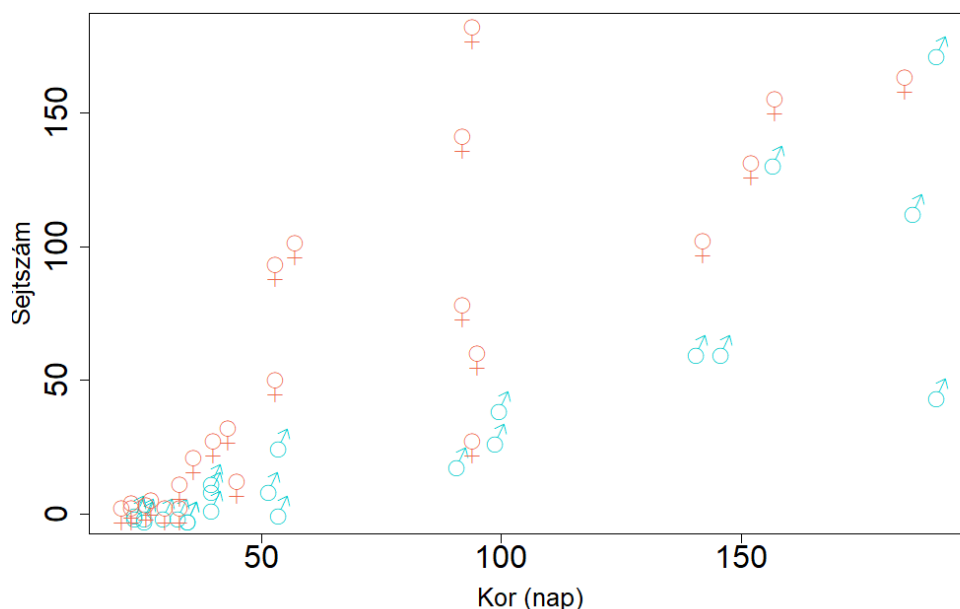
4. ábra: A kipreparált méhek súlya E2-kezelt és nem-kezelt állatokban. Az ábrán az E2-kezelt és a hormonally nem kezelt csoportok méh súlyának összehasonlítását ábrázoltuk. Látható, hogy a kezelt csoportban erősen megnőtt az uterus tömege, az eredmények alapján a szérumszint megemelését sikeresnek ítéltük.

rendelkező minta 50 mg-ot, míg a legnagyobb 98,5 mg-ot nyomott. Kontrollként egy korábbi kísérlet során felvett adatokat használtunk. A hormonkezelést nem kapott állatokból kipreparált méhek (n=3) átlagosan 12 mg-ot nyomtak, 10 mg-os minimum, és 16 mg-os maximum értékek mellett. A Welch-féle kétmintás t-próba szignifikáns különbséget mutatott ki a csoportok között ($p=0,0023$), így az E2-kezelést hatásosnak mondhatjuk, a további eredményeket ennek fényében értékeltük (4. ábra).

A hormonkezelt állatokban fluoreszcensen jelölt KP sejtek száma nagy variabilitást mutatott ($107,4 \pm 91,63$ (SD)). A legkevesebb sejtben expressziót mutató állatban 6 KP neuront figyeltünk meg, míg ugyanezen kezelést kapott másik állat 206 neuronban fejezte ki a KISS1 mRNS-t. A kontrollcsoport egyedeiből (n=3) csupán egy állat mutatott expressziót 2 neuronban. 24 napos egyedekben a hormonkezelés hatására 90-160 napos állatokra jellemző KP sejtszámot sikerült elérni.

3. Ivari dimorfizmus jelenléte a sejtpopulációban

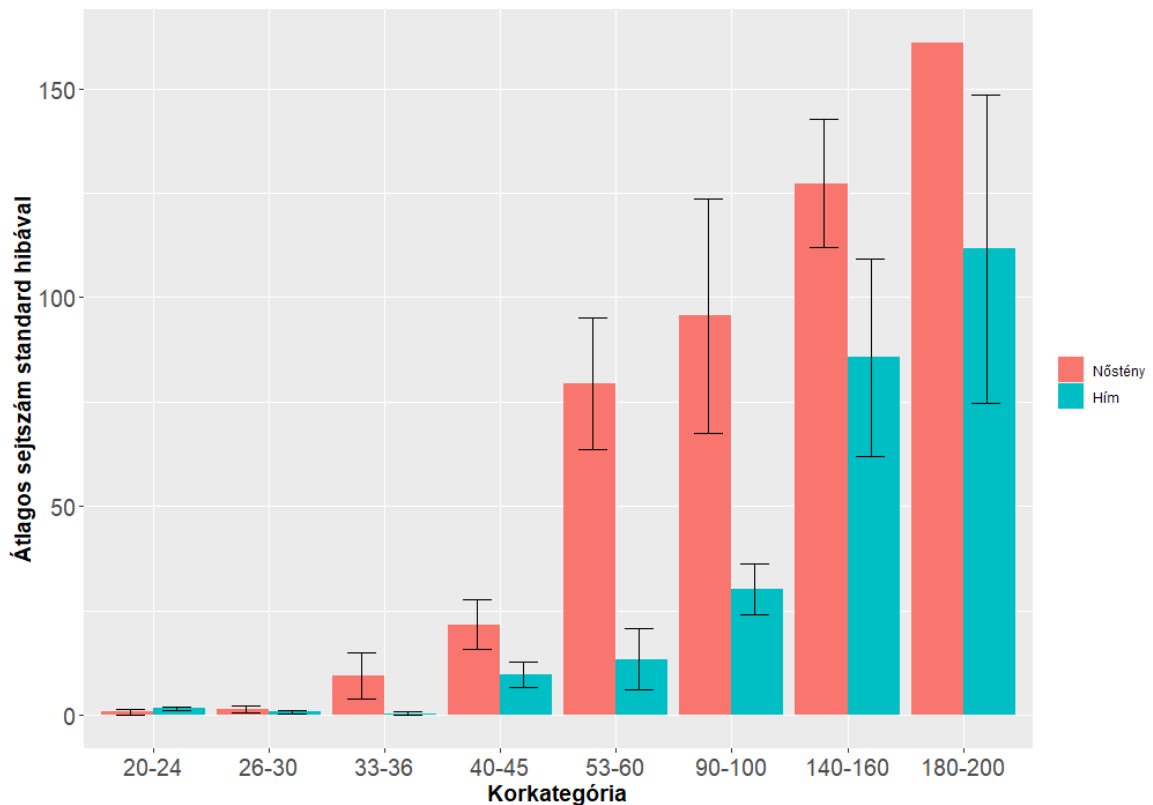
A következő kísérletben megvizsgáltuk a KP neuronok számát a kor függvényében (5. ábra) mindkét ivar esetén. Megfigyelhető tendencia, hogy a hímekben a KP sejtek száma



5. ábra: Az egyes mintákban megfigyelt KP sejtszámok („y” tengely), a laterális septumban a mintát szolgáltató állat korával („x” tengely). Az ivarokat szimbólum és szín alapján, egyértelműen elválasztottuk. Látható, hogy az egyedfejlődés kezdetekor a korkategóriákat sűrűbben állapítottuk meg, mint az idősebb állatok esetében. Ennek oka, hogy feltételezéseink szerint a KP génkifejeződés változásai a pubertás beállta körüli időszakban a leggyorsabbak, majd idővel lelassulnak. Szintén megfigyelhető, hogy a kor (és a sejtszám) növekedésével nő az adatok szórása is.

mintázatszerűen a 33-36 napos korcsoportban és később is alacsonyabbak voltak a nőstények sejtszámainál.

A hím állatok egy (a 20-24 napos) korcsoport kivételével minden kategóriában átlagosan kevesebb KP-sejttel rendelkeznek, mint azonos korú nőtény társaik (6. ábra). A növekedés üteme a két nem között hasonló. A lineáris modell diagnosztikája alapján az nem jellemzi adatainkat megfelelően, ezért itt elhagytuk használatát. A sejtszám növekedésének mértékében szembetűnő különbség, hogy míg a nőtényekben megfigyelt sejtszámok a pubertás beálltának kezdete körül növekedésnek indultak, addig a hímeknél a 33-36 napos korkategóriában a prepubertális értékekhez képest nem történik látható növekedés.



6. ábra: A KP neuronok számának átlaga korkategóriánként, ivarok szerint felosztva, $\pm SE$. Az ábra ivaronként felosztva mutatja az egyes korcsoportokban az LS-ben lokalizálódó KP expressziót mutató neuronok számát. Az oszlopok magasságai az adott korcsoportban és ivarban megfigyelt sejtszámok átlagát, a függőleges vonalak hossza pedig a mérések standard hibáját ábrázolják.

V. Következtetések

1. A KP expresszió mértékének változása az egyedfejlődés során

Mindkét ivar pubertás előtt álló egyedei között találtunk fluoreszkáló sejteket, amely elsőre kérdéseket vethet fel, hiszen ebben a korban nem vártunk KP expressziót az LS-ben. Az általunk használt KP-Cre/ZsGreen egérmodellben a *KISS1* mRNS-t termelő sejtek örökítőanyagában a *KISS1* régiója mögött egy ZsGreen-t kódoló gén áll, mely a *KISS1* promóter első aktivációjakor véglegesen bekapcsol, és ez a sejt élete végéig termelni fogja a fluoreszcens fehérjét [14.]. Így elképzelhető, hogy a késői prenatális vagy a perinatális korban jelentkező kisebb hormonizációs felelősek az alacsony számú sejtben talált jelért. Az egyedfejlődés további részében nem következett be hirtelen változás a sejtek számában, mely különbségnek számít az AVPV magban megfigyelt mintázathoz képest. [10.] A hipotalamikus maghoz képest további eltérést jelentett, hogy a kifejlett állatokban látszólag csekély, vagy semmi lassulás nem figyelhető meg a KP termelés növekedésében. A 180-200 napos korkategóriában látszólag lelassult a növekedés mértéke, ahhoz azonban, hogy erre vonatkozó konklúziókat tudjunk levonni, jóval idősebb (250-300 napos) állatok bevonására is szükség lenne. Fennáll annak a lehetősége, hogy egyes sejtek, melyek korábban KP-t termeltek, más sejteknek „adták át” ezt a funkciót, így ugyanolyan szintű KP termelés mellett magasabb sejtszámokat detektálunk idősebb állatokban. Ennek a lehetőségnek a kizárása immunhisztokémiai vagy *in situ* hibridizációs technikákat igényelne. Ezek hátránya, hogy a mindkét ivarban hullámzó szexuáliszteroid szintek pillanatszerű változásai következtében fellépő változásokat is kimutatná, melyek mérési eredményeink nagymértékű szórását eredményezhetik.

2. A KP expresszió fiatalkori beindulásának indukciója

A *KISS1* mRNS termelődése, mint kísérleteink során kiderült, pubertás körül kezd jelentős mértékben nőni az LS-ben (nőstényekben hamarabb, mint hímelekben). Feltételeztük, hogy ez a folyamat emelkedő szexuáliszteroid szintek hatására következik be, azt azonban nem tudtuk, hogy szükséges-e valamilyen egyéb faktor a folyamathoz. [17.] Eredményeink arra engednek következtetni, hogy nincsen szükség harmadik faktorra, vagy amennyiben igen, úgy ez már 20-24 napos korban is rendelkezésre áll. Természetesen elképzelhető, hogy esetünkben az E2-hatás nem közvetlenül a KP sejteken található ER α -hoz való kötődés során, hanem indirekt módon fejt ki hatását. Ennek vizsgálatához olyan transzgenikus egerek használata lenne szükséges, melyekben a fenti receptortípust kódoló gén hiányzik a KP sejtek örökítőanyagából. Ettől a kérdéstől függetlenül azonban kijelenthetjük, hogy nem

szükséges harmadik faktor az egyedfejlődés során a KP expresszió beindításához. Elképzelhető, hogy az E2 jelpályától független, más módokon is be lehetne azt indítani (például a béta típusú gamma-amino-vajsav receptor gátlásával), ennek azonban fejlődéstani jelentősége valószínűleg elhanyagolható [6.]. A jövőben érdemes lehet megvizsgálni, hogy kasztrált hímekben T vagy DHT kezelés hatására megfigyelhető-e különbség a KP expresszióban, és ezzel tisztázni, hogy érvényesül-e az aktiváló hatás ebben az ivarban, és ha igen, akkor T vagy ösztrogén receptoron keresztül. Jelenlegi ismereteink alapján nagy az esély az előbbi mechanizmusra, amennyiben feltételezzük, hogy a már említett LS-beli T és DHT stimuláció hatására fellépő LH és FSH termelés KP szekréció segítségével jön létre [7., 8.].

3. Ivari dimorfizmus jelenléte a sejtpopulációban

Az egyedfejlődés első, prepubertális szakaszában nem látunk különbséget a két ivar között. Az agy nemi differenciálódása ebben a korban még nem fejeződött be, a végső kulcsstruktúrák még nem végső formájukban vannak jelen. [17.] Az első különbséget a 33-36 napos korkategóriában figyeltük meg, ahol a hímek stagnáló sejtszámaival ellentétben a nőtények már megnövekedett KP neuronszámmal rendelkeztek. A hím egerek 10-15 nappal később lesznek teljesen szexuálisan érettek, mint nőtény társaik [10.], mely magyarázata lehet az ebben a kísérletben megfigyelt eltérésnek. Az egyedfejlődés további szakaszaiban a hímek a nőtényekhez hasonló mértékű, ugyanakkor enyhén lassabb növekedést mutatnak. Lehetséges, hogy az expresszió későbbi megemelkedése, és a hasonló növekedési ráta következményeképpen mutattak a hímek minden korkategóriában alacsonyabb sejtszámot az azonos korú nőtényekhez képest. A hipotalamikus KP termelő magok közül az AVPV-ben figyelték meg a nőtényekben többletexpressziót mutató dimorfizmust [10.]. A fontosabb extrahipotalamikus KP termelő agyterületeken, mint például a mediális amigdala [18.], a hímekben figyelték meg több KISS1 mRNS-t expresszáló sejtet, így ez alapján is látható, hogy ezek a területek különböznek KP rendszerükben is.

VI. Összefoglalás

A reproduktív tengely működését a hipotalamikus gonadotropin-releasing hormon (GnRH)-termelő idegsejtek az adenohipofízis luteinizáló hormon (LH) és follikulus stimuláló hormon (FSH) elválasztásának szabályozásával irányítják. Az FSH és LH hormonok hatására az ivarszervekből szexuáliszteroidok szabadulnak fel, melyek kritikus szerepet játszanak a GnRH termelés feedback szabályozásában is. A petefészkek ösztrogén (ösztradiol) hormonja a hipotalamusz kisszeptin (KP) expresszáló interneuronjainak közvetítésével kulcs szerepet tölt be a hipotalamusz GnRH elválasztásának szabályozásában. A KP-GnRH reguláció hibás működése a pubertás és az ivari funkciók veleszületett vagy szerzett zavarát idézheti elő. KP idegsejtek kisebb számban előfordulnak a mediális amygdala és a laterális septum (LS) területén is. Az extrahipotalamikus KP sejtpopulációk szerepe és működése jelenleg kevésbé ismert. TDK munkám célja a LS területén megtalálható KP sejtpopuláció fejlődésének, ivari dimorfizmusának és ösztrogén általi szabályozásának vizsgálata volt génmódosított egérmodellben. Munkám során 26-27 napos korban figyeltem meg először KP idegsejtek megjelenését nagyobb számban az LS területén. A fluoreszcens markerrel (ZsGreen) jelölt sejtek száma fokozatosan növekedett, mígnem elérte a felnőttkorra jellemző 120-150-es számot. Felnőtt egerekben a hímek alacsonyabb sejtszámokat mutattak a legtöbb korkategóriában. Nőstény egerek 20 napos korban megkezdett, 4 napon át tartó ösztrogén hormon kezelésével indukálni tudtam a KP neuronok korai megjelenését nagy számban. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a LS idegsejtjeinek KP termelését az ösztrogén hormonok emelkedő vérszintje váltja ki. Az ösztrogén hormonok KP idegsejtekre gyakorolt génexpressziós hatásainak további tanulmányozására ezért új generációs RNA-Seq vizsgálatok bevezetésével tervezzük.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a segítséget Dr. Hrabovszky Eriknek és Dr. Skrapits Katalinnak, akik a kísérletek megtervezése és elvégzése során a legnagyobb segítséget nyújtották. Köszönöm a dolgozat megírásához nyújtott segítséget Puska Ginának, aki segített eligazodni az egyetemi követelmények között. Köszönöm a módszerek bemutatását és betanítását Göcz Balázsnak, Dr. Takács Szabolcsnak és Dr. Rumpler Évának.

Irodalomjegyzék

1. Tsutsumi R, Webster NJG (2009) GnRH Pulsatility, the Pituitary Response and Reproductive Dysfunction. *Endocr J* 56:729–737
2. (2012) Gonadotropins. In: *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda (MD) Accessed 08 Oct 2022
3. Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Gröne H-J, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Pérez CA, Schütz G, Herbison AE (2006) Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron* 52:271–280. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.07.023>
4. Beltramo M, Dardente H, Cayla X, Caraty A (2014) Cellular mechanisms and integrative timing of neuroendocrine control of GnRH secretion by kisspeptin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 382:387–399. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.10.015>
5. Created with BioRender.com
6. Stephens SBZ, Di Giorgio NP, Liaw RB, Parra RA, Yang JA, Chahal N, Lux-Lantos VA, Kauffman AS (2018) Estradiol-Dependent and -Independent Stimulation of Kiss1 Expression in the Amygdala, BNST, and Lateral Septum of Mice. *Endocrinology* 159:3389–3402
7. Carreras A, Mendoza C, Ortega E, Ruiz E (1987) Testosterone implants into the lateral septum of male rats, a positive effect on LH and FSH secretion. *Brain Res Bull* 19:149–151. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(87\)90179-1](https://doi.org/10.1016/0361-9230(87)90179-1)
8. Roca G, Torres JM, Ruiz E, Ortega E (2001) Crystalline dihydrotestosterone implants in the lateral septum of male rats. A positive effect on LH and FSH. *Endocr Res* 27:35–40. <https://doi.org/10.1081/erc-100107167>
9. Carreras A, Robles R, Ruiz E, Ortega E, Mendoza C, Osorio C (1984) Role of the septum on LH, FSH and prolactin secretion in male rats. *Brain Res Bull* 13:339–342. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(84\)90136-9](https://doi.org/10.1016/0361-9230(84)90136-9)

10. Clarkson J, Herbison AE (2006) Postnatal Development of Kisspeptin Neurons in Mouse Hypothalamus; Sexual Dimorphism and Projections to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Endocrinology* 147:5817–5825. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0787>
11. Takumi K, Iijima N, Ozawa H (2011) Developmental Changes in the Expression of Kisspeptin mRNA in Rat Hypothalamus. *J Mol Neurosci* 43:138–145. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9430-1>
12. Stephens SBZ, Chahal N, Munaganuru N, Parra RA, Kauffman AS (2016) Estrogen Stimulation of Kiss1 Expression in the Medial Amygdala Involves Estrogen Receptor- α But Not Estrogen Receptor- β . *Endocrinology* 157:4021–4031. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1431>
13. Göcz B, Rumppler É, Sárvári M, Skrapits K, Takács S, Farkas I, Csillag V, Trinh SH, Bardóczi Z, Ruska Y, Solymosi N, Póliska S, Szőke Z, Bartoloni L, Zouaghi Y, Messina A, Pitteloud N, Anderson RC, Millar RP, Quinton R, Manchishi SM, Colledge WH, Hrabovszky E (2022) Transcriptome profiling of kisspeptin neurons from the mouse arcuate nucleus reveals new mechanisms in estrogenic control of fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119:e2113749119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2113749119>
14. Yeo S-H, Kyle V, Morris PG, Jackman S, Sinnett-Smith LC, Schacker M, Chen C, Colledge WH (2016) Visualisation of Kiss1 Neurone Distribution Using a Kiss1-CRE Transgenic Mouse. *J Neuroendocrinol* 28:. <https://doi.org/10.1111/jne.12435>
15. 243/1998. (XII. 31.) Korm. rendelet az állatkísérletek végzéséről
16. Haisenleder DJ, Schoenfelder AH, Marcinko ES, Geddis LM, Marshall JC (2011) Estimation of estradiol in mouse serum samples: evaluation of commercial estradiol immunoassays. *Endocrinology* 152:4443–4447. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1501>
17. Davies W, Wilkinson LS (2006) It is not all hormones: Alternative explanations for sexual differentiation of the brain. *Brain Research* 1126:36–45. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.09.105>

18. Kim J, Semaan SJ, Clifton DK, Steiner RA, Dhamija S, Kauffman AS (2011) Regulation of Kiss1 expression by sex steroids in the amygdala of the rat and mouse. *Endocrinology* 152:2020–2030. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1498>