



Dr. Párducz Árpád

tudományos tanácsadó

az MTA doktora

Szegedi Biológiai Központ

6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

Budapest, 2011. július 6.

Válasz Dr. Párducz Árpád bírálói véleményére

Tisztelt Opponens Úr!

Köszönöm, hogy értekezésem bírálatát elkészítette és munkámat nyilvános vitára és az MTA doktora fokozat megszerzésére alkalmasnak minősítette.

Opponens Úr három pontban részletezett felvetéseire az alábbiakban válaszolok.

„1. A szakterület nehézségeit ismerve, rendkívül nagy teljesítménynek tartom a humán anyagon végzett immuncitokémiai vizsgálatokat. Az eredeti közleményben részletesen tárgyalják azt a tényt, hogy feltűnően nagy a különbség a patkány és emberi GnRH neuronok immuncitokémiai kimutatható ER- β tartalmában. Teljesen nyilvánvaló, hogy a postmortem szöveti károsodás ebben nagy szerepet játszik, ugyanakkor az is tény, hogy különböző antitesteket használnak. Szeretném megkérdezni, hogy a cikk közlése óta próbálkoztak-e más (újabb) antitestekkel?”

Válasz (A humán ER- β kimutatására alkalmas antitestekkel kapcsolatban):

A patkány (Shughrue és Merchenthaler, J. Comp. Neurol. 2001) és az egér (Merchenthaler és mtsai, J. Comp. Neurol. 2004) összehasonlító vizsgálata is már számos meglepő faji eltérést tárt fel az ER- β agyi megoszlásában. Így a receptor mRNS és immunreaktivitás szövettani megjelenítése GnRH neuronokban mindezidáig csak patkányban volt sikeres (Hrabovszky és mtsai, Endocrinology 2000 ill. 2001), bár egysejt-PCR (Herbison és Pape JR., Front. Neuroendocrinol. 2001) valamint funkcionális (Sun és mtsai, J. Neurosci. 2010) vizsgálatok alapján az ER- β alacsonyabb szintű jelenléte egér GnRH idegsejtjeiben sem kétséges. A rágszáló fajok tanulmányozásával nyert neuroanatómiai ismeretek emberi vonatkozásának felderítése neuroendokrinológia területén különösképp indokolt, hiszen az ember 28 napos menstruációs ciklusának és a patkány 4-5 napos ösztroz ciklusának hormonális szabályozása számos élettani vonatkozásban lényegesen különbözik. Nem csak anatómiailag más a GnRH idegsejtek elhelyezkedése (rágszálókban főképp a mediális preoptikus area környéke: Merchenthaler és mtsai, Cell Tissue Res. 1984; emberben több, részben hátsó hipotalamik mag, köztük a n. infundibularis: Rance és mtsai, J. Comp. Neurol. 1994), de a pozitív ösztrogén visszacsatolás helye is eltér (rágszálókban az anteroventrális periventrális mag: Herbison, Brain Res. Rev. 2008; emberben a n. infundibularis: Knobil, Prog. Horm. Res. 1980).

Az emberi hypothalamus szövet minták immunhisztokémiai vizsgálatát annak reményében kezdtük meg, hogy a GnRH idegsejteken belüli ER- β jelenlét megerősítésével elméleti alapot teremthetünk a receptoron szelektíve ható ligandumok orvosi alkalmazása felé, akár új típusú hormonális fogamzásgátlás, akár infertilitás kezelése terén. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz választott „P3” antitest Western blot vizsgálatokban egyaránt felismerte a humán ER- β hosszú és rövid formáit (Saunders és mtsai, Biol. Reprod. 2000). Immunhisztokémiai teszt festéseink során olyan neuronokat jelölt, melyek elhelyezkedése a humán ER- β mRNS *in situ* hibridizációs vizsgálatából (Österlund és mtsai, J Clin Endocrinol Metab. 2000) ismert regionális megoszlásával összhangban volt. Végül, akrolein tartamú fixálószer használva, csaknem kizárólag sejtmagi jelet adott, melyet a Zymed cég „Z8P” antitestjével rágszálókban szerzett

tapasztalataink alapján tekintettünk specificitási kritériumnak. Sajnos az eddig általunk megtesztelt, további mintegy 15 ER- β ellenes antitest közül egyetlen másik használata sem vezetett hasonló eredményre. A részben vagy teljes egészében citoplazmatikus (Hestiantoro és Swaab, J Clin Endocrinol Metab. 2004; Fenzi és Rizutto, European Journal of Pain, 2011), gliális, vagy idegsejt nyúlványokban megjelenő ER- β immunreaktivitást mi nem tekintettük specifikusnak és az ilyen antitestek használatát elvetettük. Mint Opponens Úr rámutat, a technikai nehézség egyik valószínű oka a posmortem szöveti károsodás. Említést érdemel azonban az a tény is, hogy a kereskedelembe kapható, rágszáló ER- β ellen készített antitestek többsége is - még optimális szövettani feldolgozás mellett is - immunhisztokémiai vizsgálatokra alkalmatlan. Mintegy 15 évvel az ER- β felfedezése után a mai napig is csupán a Z8P antitest (Zymed) használatával nyert immunhisztokémiai kép mutatott egyértelmű specificitást rágszáló szöveten: Ez a jel főképp neuronok sejtmagjában volt jelen, megoszlása hűen tükrözte az ER- β mRNS *in situ* hibridizációs vizsgálatokból ismert megoszlását, továbbá teljesen hiányzott az ER- β -génkiűtött egerek szövettani metszeteiből.

„2. Ellentmondást érzek abban, hogy a ligandum kötési kísérletekben a sejteknek csak kis része vette fel a jelölt hormont, annak ellenére, hogy nagy hányaduk expresszálta a β -típusú ösztrogén receptort. Hogy értelmezi a Jelölt ezt a tényt?”

Válasz (A ligandum kötést csak alacsony arányban mutató GnRH idegsejtekkel kapcsolatban):

A kettős-*in situ* hibridizációs és kettős-immuncitokémiai módszertanokkal elért, 60-80%-os kolokalizációs arány elsősorban az igen érzékeny módszertanok használatának volt köszönhető. Értelmezésünk szerint, az ösztrogén receptor radioligandum *in vivo* kötésén, majd a ^{125}I izotop ezt követő autoradiográfiás megjelenítésén alapuló tanulmányunkban megfigyelt, mindössze 8,8%-os ligandum felvételi arány az alkalmazott módszer korlátját, és nem a funkcionális receptor fehérjét tartalmazó GnRH idegsejtek valódi százalékos arányát tükrözi. Az autoradiográfiás megjelenítés érzékenységet jelentősen csökkentő tényezők között különösen fontosnak tartok kettőt: 1. A kötési vizsgálatokban használt, 35 μm vastagságú szövettani metszetek mélyebb rétegeiben elhelyezkedő GnRH neuronok sejtmagjából származó sugárzás jelentősen szóródik, mire a felszínt borító autoradiográfiás emulziót eléri. Ez a jelenség a definitív ezüstszemcse csoportosulások kialakulása ellen hat a GnRH idegsejt magok felszíni vetületében. 2. A specifikus jel további jelgyengülését okozhatja, ha az *in vivo* megkötött ligandum már a szövettani feldolgozás egyes lépései során (perfúziós fixálás, metszetkészítés, GnRH immunhisztokémiai kimutatása) részlegesen kioldódik.

ER- β -specifikus antitestek híján, a kísérletek végzésekor a radioligandum kötési vizsgálat jelentette az első és egyetlen funkcionális bizonyítékot nukleáris ösztrogén receptor fehérje GnRH idegsejteken belüli jelenlétére. Későbbi, Z8P antitesttel elvégzett immunhisztokémiai vizsgálataink (Hrabovszky és mtsai, Endocrinology 2001) is azt az *in situ* hibridizációs észleletet erősítették meg (Hrabovszky és mtsai, Endocrinology 2000), hogy a patkány GnRH idegsejteknek legalább 70-80%-a termel ER- β -t.

„3. A bírálatomból kitűnik, hogy a sok érdekes eredmény közül az ER- β -val kapcsolatos adatokat tartom nagyon fontosnak. A β -típusú receptor leírása óriási jelentőségű, mert ezen a szakterületen, számos, korábbi – már-már dogmaként kezelt – elképzelés újragondolását és újvizsgálatát indította el. A Jelölt és az egész munkacsoport érdemének tartom, hogy észrevette ezt a tényt és megtalálta a számukra módszertani és intellektuális szempontból érdekes kutatható kérdéseket. Véleményem szerint van még egy olyan tényező ebben a „játzmában”, amely hasonló forradalmat okozhat szemléletünkben és ez az ösztrogén nem genomiális hatása és a még eléggé misztikus membrán-receptora. Ezt a lehetőséget több esetben is érinti az értekezés és azt kérem a Jelölttől, hogy fejtsse ki véleményét ebben a kérdésben.”

Válasz (Nem-genomiális ösztrogén hatások és membrán ösztrogén receptorok kérdésében):

Bár magunk nem foglalkoztunk az ösztrogének gyors, nem-genomiális hatásaival, ilyen hatást az ösztrogének közvetlenül és közvetve egyaránt gyakorolnak a GnRH neuronokra is. Az ösztradiol egyik rapid, ER- β által közvetített hatása a CREB foszforilációja egér GnRH idegsejtjeiben, mely ER- β -génkiűtött egérben nem figyelhető meg. Valószínűleg az ER- β egy sejtmembránban vagy citoplazmában lokalizált formája közvetíti (Ábrahám és mtsai, J. Neurosci. 2003). Ugyancsak közvetlenül gyakorol gyors hatást az ösztradiol a GnRH idegsejtek egyes tüzelési sajátosságaira (Megnöveli a neuronok aktivitását, csökkenti az „afterhyperpolarizing potential /AHP”-t, növeli a lassú „afterdepolarization” /ADP/ hullámok amplitúdóját; Chu és mtsai, J. Neurosci. 2009). Mindezen elektrofiziológiai válaszok az ER- β -specifikus DPN alkalmazásával is kiválthatóak (Chu és mtsai, J. Neurosci. 2009). A GnRH idegsejtekben szintén fellépnek gyors, GABA-erg szinaptikus bemenetek által közvetített, indirekt ösztrogén hatások. Az ösztradiol ER- α -n keresztül csökkenti, míg ER- β -n keresztül növeli a GnRH neuronokon mérhető GABA-erg posztszinaptikus áramok frekvenciáját (Chu és mtsai, J. Neurosci. 2009).

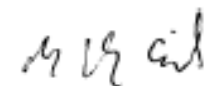
Noha a fenti gyors ösztrogén hatások hozzájárulása a reprodukív tengely szabályozásához nem kétséges, úgy tűnik, hogy szerepük alárendelt az klasszikus és nem-klasszikus genomikus ösztrogén hatások mellett. Ezt támasztja alá, hogy az ösztradiol 24-36 órás jelenléte rágszálókban nélkülözhetetlen a pozitív ösztrogén visszacsatolás és az LH surge bekövetkeztéhez (Glidewell-Kenney és mtsai, PNAS 2007; Christian és mtsai, Endocrinology 2008). Tudjuk azt is, hogy az indirekt hatásokat főképp ER- α tartamú interneuronok közvetítik, és a neuron-specifikus módon ER- α -génkiűtött egér ennek megfelelően infertilis. Az ösztrogén talán legismertebb, ER- α -függő, klasszikus genomikus hatása a progeszteron receptor indukciója. Ezen egyértelműen genomikus hatás reprodukcióban játszott kulcs szerepét támasztja alá a progeszteron receptor-génkiűtött egér infertilitása (Chappell és mtsai, Endocrinology 1999).

Az utóbbi években vált ismertté, hogy az ösztrogének számos olyan jelátviteli utat is használhatnak, melyek az ER- α és ER- β receptor formák működésétől függetlenek. Ösztrogén hatást közvetíthet a G-protein kapcsolt receptor-30 (GPR-30), mely részben kalcium mobilizáción és foszfatidil-inozitol 3,4,5-trifoszfát szintézisen keresztül hat (Revankar és mtsai, Science 2005). Noel és mtsai igazolták, hogy az ösztradiol GPR-30-on keresztül a GnRH idegsejtekre is gyakorol gyors, excitátoros hatást (Noel és mtsai, Mol. Endocrinol. 2009). A gyors válaszokban szerepet játszhat két ezidáig azonosítatlan szerkezetű membrán ösztrogén receptor is. Az indirekt bizonyítékok alapján, szenzációként bejelentett ösztrogén receptor-X (Toran-Allerand és mtsai, J. Neurosci. 2002) létezése ugyan még vitatott, de a másik, difenil-akrilamidot (STX) kötő, ún. STX-szenzitív receptor valóban közvetít gyors ösztrogén válaszokat, fokozva a GnRH neuronok GnRH ürítést és Ca oszcillációinak szinkronizációját (Kenealy és mtsai, Endocrinology 2011).

A fenti receptorok és gyors jelátviteli mechanizmusok jelentősen hozzájárulhatnak az ösztrogének szinaptogenezisben játszott és más, reprodukív funkciókkal szorosan össze nem függő működéseikhez. Így, az ischemia okozta hippocampális neuronkárosodás nem csak ösztradiollal, hanem a GPR-30 vagy az STX-szenzitív receptorokon ható szelektív agonistákkal is mérsékelhető (Lebesgue és mtsai, PLoS One 2010). A reprodukció szabályozásában azonban továbbra is az ER- α -n át kifejtett, transzkripcióra gyakorolt hatások látszanak elsődlegesnek (Glidewell-Kenney és mtsai, PNAS 2007; Christian és mtsai, Endocrinology 2008).

Kérem Opponens Urat fenti válaszaim szíves elfogadására.

Tisztelettel:



Dr. Hrabovszky Erik

tudományos főmunkatárs

Endokrin Neurobiológiai Laboratórium