

dc_474_12

MTA Doktori Értekezés
Tézisei

Az ösztrogén nem-klasszikus hatásainak mechanizmusa és szerepe a központi idegrendszerben

Dr. Ábrahám István

Centre for Neuroendocrinology, Department of Physiology,
University of Otago, New Zealand



2012

I. Bevezetés

A gonadalis ösztrogén hormon (E2) rendkívül hatékony vegyület, az emlősök szervezetének minden sejtjéhez eljutva befolyásolja szinte valamennyi gén működését. Napjainkban az ösztrogénekkal foglalkozó kutatások száma óriási méreteket ölt. Csak 2011-ben az ösztrogénnel foglalkozó cikkek száma meghaladta az egymilliót. Az elmúlt években a klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy a hormonpótló terápiáknak több súlyos mellékhatása van, ami valósággal sokkolta a gyógyszergyárakat és a tudományos közvéleményt. Ugyancsak egyre több probléma merült fel a környezetben található ösztrogénekkal kapcsolatban, különösen a szója tartalmú élelmiszerek elterjedése miatt. Ezeknek a fejleményeknek köszönhetően egyre több kutatócsoport kezdett el foglalkozni a szervezet különböző sejtjeiben az ösztrogének hatásmechanizmusának kutatásával. Az alább bemutatott kísérleteinkben mi azt a célt tűztük ki magunk elé, hogy jobban megismerjük az ösztrogének hatásmechanizmusát és fiziológia jelentőségét a központi idegrendszerben.

Klasszikus genomiális hatások

Az E2 klasszikus ösztrogén receptorokon (ER α , ER β) keresztül megvalósuló ún. klasszikus direkt genomikus hatásai lassan indulnak be (órák, napok) és hosszú távon fejtik ki hatásukat a különböző sejtekben. Ezekben a folyamatokban az E2 lipofil tulajdonságai miatt könnyedén átlépve a sejt membránon kapcsolódik az ösztrogén receptorokhoz. Az inaktív ösztrogén receptor pontos helye nem ismert, feltehetőleg a citoplazmában található és hő sokk fehérjékhez valamint chaperon, co-chaperon molekulákhoz kötődik. A hő sokk fehérjék az ösztrogén receptorok E2-vel való kötődése után létrejövő receptor konformáció változás miatt leválnak a receptorról, aminek következtében a receptor aktiválódik, dimerizálódik és transzlokálódik a sejtmagba. A dimerizált ösztrogén receptor komplex számos magi receptor koaktivátorral interakcióba lép így a c-AMP response element binding protein (CREB)-binding proteinnel (CBP-vel). Az ösztrogén receptor dimer közvetlenül a DNS kötő egységen keresztül kötődik a cél gén DNS szakaszának a promoter régiójában található palindróm szekvenciához, az ösztrogén responsive element (ERE)-hez, vagy a koaktivátorok segítségével transzkripciós faktorokon keresztül (AP-1, CREB) közvetetten hat az adott gén transzkripciójára.

Az E2 nem-klasszikus intracelluláris és membrán hatásai

A közvetlen genomiális hatáson kívül az utóbbi évtizedekben ismertté vált egy jóval gyorsabb akár másodperceken belül létrejövő mechanizmus, amit az E2 az ionszatórnákon és az intracelluláris jelátviteli molekulákon keresztül valósít meg. Ezeket a hatásokat az irodalom eleinte nem-genomiális hatásként aposztrofálta. Azonban ez az elnevezés félrevezető, mivel az intracelluláris folyamatok minden esetben genomiális hatásokhoz vezetnek. Ezért a továbbiakban ezeket az E2 indukálta gyors folyamatokat indirekt genomiális vagy nem-klasszikus hatásoknak hívjuk.

A nem-klasszikus E2 folyamatokkal foglalkozó kísérletekben kimutatták, hogy az E2 adása gyorsan 15 másodpercen belül növeli a cAMP szintet, ami azonnal aktiválja a protein kináz A-t (PKA), ezen kívül indukálja az extracelluláris regulated kinase1/2 (ERK1/2) és az Sos, Ras, Raf jelátviteli molekulákat, valamint aktiválja a kalcium kalmódulin kinázt (CaMKII) és a foszfatidilinositol-3-OH kinázt (PI3K). Ezáltal az intracelluláris jelátvitel végpontjaiban lévő kulcsfontosságú transzkripciós faktort a CREB-et tudja működésbe hozni, amit a molekula foszforilációja mutat. Elektrofiziológiai és képalkotó Ca²⁺ mérések megmutatták, hogy az E2 képes az intracelluláris Ca²⁺ szint emelésére is. Az E2 gyors nem-klasszikus hatást gyakorol a neuronok membrán potenciáljára és akciós potenciáljának frekvenciájára. A nem-klasszikus E2 szignalizáció egyik fontos kérdése már több mint

harminc éve, hogy mely receptorok felelősek az E2 gyors hatásaiért. Ezekben a folyamatokban több receptor fajta is felmerült. A kísérletek egy része azt mutatta, hogy a nem-klasszikus folyamatokat a membrán kaveolákban a caveolin-scaffolding proteinhez kötődő klasszikus ösztrogén receptorok irányítják a metabotrop glutamát receptorok aktivációján keresztül. Egyes kísérletsorozatokban ismeretlen szerkezetű membrán receptorok, mint az ER-X és az STX receptorok, is felvetődtek. Kiderült, hogy az E2 egy g protein kapcsolt receptorhoz (GPR30 új nevén GPER1) is képes kötődni és ezen keresztül aktiválni az intracelluláris jelátvivő pályarendszereket.

Korábbi sejtmembrán impermeábilis E2-vel végzett kísérletek megmutatták, hogy a membrán ösztrogén hatások feltehetőleg részt vesznek az olyan szexuális magatartásformák kialakításában, mint a lordózis. Transzgenikus egerekkel való kísérletek valószínűsítették a nem-klasszikus hatások szerepét az E2-nek a hypothalamus-hipofízis gonád tengelyre gyakorolt negatív visszacsatolásában. Azonban a központi idegrendszerben az E2 nem-klasszikus hatásmechanizmusának fiziológiai jelentősége korántsem tisztázott, ezért további vizsgálatokat igényel.

Az E2 hatásai központi idegrendszerben: a nemi dimorfizmustól a neuroprotekciónig

Az E2 számos hatással rendelkezik a központi idegrendszerben a születéstől kezdve egészen az idős korig. Az E2 részt vesz az agy nemi differenciálódásának szabályozásában és felnőtt korban a szaporodás központi idegrendszeri szabályozásában a „processzor” sejtek, a gonadotrop releasing hormon (GnRH) neuronok funkcióinak befolyásolásán keresztül. Érdekes módon azonban ennek a rendkívüli jelentőségű hormonális visszacsatolásnak a mechanizmusa máig nem tisztázott pontosan. Ezen kívül az E2 szabályozza a basalis előagy, a hippocampus, az agykéreg, a striatum, az agytörzsben a locus coeruleus és a gerincvelő működését. Ezáltal az E2 részt vesz a kogníció, a hangulat, a lokomóció és a fájdalom szabályozásában is. Az E2 jól ismert, jelentős neuroprotektív potenciállal rendelkezik például olyan, az Alzheimer kórban is érintett neuronokon, mint a kolinerg neuronok, azonban a hatásmechanizmus itt sem tisztázott. Az E2 sejteket védő tulajdonságainak tárgyalásánál, mindenképpen meg kell említeni a fitoösztrogéneket, mivel táplálékunk szerves alkotórészeként jelentős hatást gyakorolnak szervezetünk működésére és interferálhatnak az endogén E2 hatásaival. A szója, aminek az egyik fő alkotórésze a genistein, az egyik legtöbbet használt fitoösztrogén forrás az emberi táplálkozásban, különösen a csecsemőtáplálásban. A genisteinnek jól ismert a sejtet védő szerepe, azonban a posztmenopauzis genistein expozíció hatással van az agy szexdifferenciálódására és a szexuális magatartásformák kialakulására. A genistein ösztrogénszerű hatását a klasszikus ösztrogén receptorokon keresztül valósítja meg, de a fejlődő agyra gyakorolt molekuláris hatásmechanizmusa nem ismert.

Az ösztrogének protektív tulajdonságai jó alapot szolgáltattak a posztmenopauzális korban fellépő problémák kezeléséhez. Azonban az utóbbi évtizedben az egyik legátfogóbb Women's Health Initiative (WHI) ösztrogén kezeléssel foglalkozó multicenter klinikai vizsgálatsorozata kimutatta, hogy a hormonpótló terápia (HPT) korántsem veszélytelen. Konjugált ösztrogén és egy szintetikus progeszteron készítmény krónikus alkalmazása során ugyanis kiderült, hogy a kezelés emelte a dementia, a stroke és a mélyvénás trombózis kialakulásának a rizikóját, valamint növelte a rosszindulatú mellldaganatok és a szív-koronária betegségek megjelenésének valószínűségét posztmenopauzális korban lévő nőknél. Ezek az eredmények arra késztették a világ ösztrogén kutatást folytató laboratóriumait, hogy több hangsúlyt fektessenek az E2 hatásmechanizmusainak jobb megértésére. Ezért az addig kevésbé kutatott területek, így például a nem-klasszikus hatások, megismerését egyre több kutatócsoport tűzte zászlajára, amely kutatási irányhoz mi is csatlakoztunk. A központi idegrendszerben az E2 nem-klasszikus hatásait egy-sejt szinten kezdtük el tanulmányozni és

két, az ösztrogén hatás szempontjából kiemelkedő jelentőségű neuronális fenotípust szemeltünk ki, a fertilitást irányító gonadotrop realising hormon (GnRH) neuronokat és a memória valamint a kognitív folyamatokban központi szerepet játszó kolinerg neuronokat.

II. Célkitűzések

Kísérleteink első felében feltérképeztük az agyban az E2 nem-klasszikus hatásait anatómiai területenként. Ezt követően egy-sejt szinten megvizsgáltuk az E2-nek a GnRH és a kolinerg neuronok jelátvivő pályarendszereire gyakorolt nem-klasszikus hatásmechanizmusát és fiziológiás szerepét. A munkák részletes célkitűzései tehát a következők voltak:

1. A CREB és az ERK1/2 foszforilációját indikátorként használva feltérképeztük az ösztrogének gyors hatásait a központi idegrendszerben és megvizsgáltuk a folyamat klasszikus ösztrogén receptor függőségét.
2. Megvizsgáltuk az E2 nem-klasszikus hatásait a CREB foszforilációra és ennek mechanizmusát a GnRH neuronokon.
3. Meghatároztuk a CREB szerepét az E2-nek a GnRH neuronra gyakorolt negatív visszacsatolásában.
4. Megvizsgáltuk az E2-indukálta nem-klasszikus jelátviteli folyamatokat basalis előagyi kolinerg neuronokon.
5. Meghatároztuk az E2 neuroprotektív hatását és megvizsgáltuk a nem-klasszikus folyamatok szerepét az E2-indukálta neuroprotekcióban basalis előagyi kolinerg neuronokon.

Vizsgálatainkat egereken és patkányokon végeztük és kísérleteinkben immunhisztokémiát, hisztokémiát, konfokális pásztázó lézer mikroszkópiát, egy-sejt elektrofiziológiát, képalkotó egy-sejtes Ca^{2+} méréseket, transzgenikus technológiát és élő sejten megvalósuló egy-molekula detekciós mikroszkópiát alkalmaztunk.

III. Eredmények és következtetések

1. Az ösztrogének gyors hatása a CREB és az ERK1/2 foszforilációra a központi idegrendszerben *in vivo* (7, 11, 12, 13)

Első kísérletsorozatunkban arra kerestük a választ, hogy az E2 egyszeri injekciója mely területeken okoz gyors nem-klasszikus hatásokat a CREB és az ERK1/2 foszforilációban hím és nőstény egerek központi idegrendszerében. Ezekben a kísérletekben a jelenségek klasszikus ösztrogén receptoroktól való függőségét is meghatároztuk ER α vagy ER β receptor hiányos (ER α KO és ER β KO), és mindkét ösztrogén receptor deléciójával rendelkező ER α /ER β KO egereken. Megvizsgáltuk továbbá azt is, hogy a jól ismert fitoösztrogén, a genistein rendelkezik-e E2-szerű nem-klasszikus hatásokkal a központi idegrendszerben neontáliosisban lévő patkányokon.

A klasszikus ösztrogén receptorok alapvető szerepe az E2 gyors hatásaiban

Kísérleteink megmutatták, hogy az E2 gyorsan, 15 percen belül képes foszforilálni a CREB-et és az ERK1/2-t az agy különböző területein. Az ER α KO, ER β KO és ER α /ER β KO egerekkel végzett kísérleteink egyértelmű bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy az E2 nem-klasszikus hatásai, mint a CREB foszforiláció, a klasszikus ösztrogén receptoroktól függenek. A medialis spetum (MS) vizsgálatánál, amely területen javarészt ER β mutatható ki, azt kaptuk, hogy a CREB foszforiláció az ER β -tól függ. A ventro-medialis mag ventro-laterális

részében (vIVMN), amely főleg ER α -át expresszál, az E2 nem-klasszikus hatása viszont az ER α -tól függ. Érdekes módon a hippocampus CREB foszforilációja az ER β -án keresztül történik. A caudatum-putamen és a cingularis cortex (gCTX) területén, ahol az ösztrogén receptorok száma alacsony, nem tudunk kimutatni E2 indukálta CREB illetve ERK1/2 foszforilációt. Az MPN vizsgálata szintén megerősítette az E2 nem-klasszikus hatásának klasszikus ösztrogén receptoroktól való függőségét. Ezen a területen, mindkét ösztrogén receptor típus, az ER α és az ER β is jelentős expressziós intenzitást mutat. Ugyanitt azonban az egyik illetve a másik ösztrogén receptor kiütése nem volt hatással az E2 indukálta CREB foszforilációra. Ez a jelenség arra utalhat, hogy a két receptor kompenzálhatja egymás hiányát. Valóban dupla géntünett ER α /ER β KO egerekben megfigyelhető, hogy az E2 képtelen volt foszforilálni a CREB-et az MPN-ben. Korábbi in vitro vizsgálatok is megerősítették az ER α és ER β felcserélhetőségének a lehetőségét. Ezek az adataink tehát az első in vivo bizonyítékot szolgáltatottak arra vonatkozólag, hogy bármelyik klasszikus ösztrogén receptor részt vehet az E2 nem-klasszikus hatásaiban.

A CREB foszforilációval ellentétben azt találtuk, hogy az E2 indukálta ERK1/2 foszforilációhoz mindkét receptor jelenléte szükséges. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az E2 kiváltotta ERK1/2 aktivációhoz az ER α és ER β heterodimer formációja kell, amit több transzkripciós mechanizmusban korábban leírtak. Érdekes módon az ER β hiánya az ERK1/2 alapfoszforilációját is befolyásolta kísérleteinkben. Metodikai okból kifolyólag csak az MPN-re és a gCTX-re korlátozódtak méréseink az ERK1/2 aktiváció vizsgálatában. Eredményeink azonban azt mutatták, hogy az E2 indukálta ERK1/2 foszforiláció ezeken a területeken a CREB aktivációnál megfigyelteknél komplexebb módon, de az ösztrogén receptoroktól függ.

Nemi különbségek az E2-indukálta CREB és ERK1/2 foszforilációra az agy különböző területein

Kísérleteinkben egyértelmű nemi különbségeket tapasztaltunk az E2 nem klasszikus hatásaiban mivel az E2 nem foszforilálta sem a CREB-et sem az ERK1/2-t az MPN-ben és a vIVMN-ben hímekekben. A korábbi kísérletek szerint ezek a területek részt vesznek a szexuális magatartásformák nemi különbségének kialakításában. Az MPN számtalan kémiai és strukturális nemi dimorfizmussal rendelkezik, aminek szerepe lehet a hím nemi szaporodási magatartásformák kialakításában. Ezek a nemi különbségek abból fakadhatnak, hogy az MPN-ben az ösztrogén receptorokat expresszáló neuronok száma illetve az ösztrogén receptort expresszáló neuronok fenotípusa nemi különbséget mutat. Az ösztrogén receptor KO egereken elvégzett kísérleteink azt igazolták, hogy a nem-klasszikus hatások a klasszikus ösztrogén receptoroktól függenek, vagyis elképzelhető, hogy az ösztrogén nem-klasszikus hatásaiban megfigyelt nemi különbségeket az eltérő ösztrogén receptor eloszlás okozza. Az MPN-től eltérően jóval kevesebb nemi különbség mutatkozik a vIVMNműködésében. Ennek a területnek az ösztrogén indukálta nem-klasszikus hatása az ER α -tól függ, ezért elképzelhető itt is, hogy a nemi különbségért az ösztrogén receptor expresszió felelős. Ezen a területen azonban a nőstények és a hímek egyenlő arányban expresszálják az ER α -t. Ezért lehetséges, hogy az ösztrogén receptor sejtmag felé irányuló jelátvitelében vannak nemi különbségek a vIVMN-ben. Mivel ez a terület fontos szerepet játszik a lordózis szabályozásában valószínű, hogy az E2 indukálta nem-klasszikus hatások szerepet játszanak a nőstények szaporodási magatartásformáinak kialakításában.

A hippocampus CA1-es régiójában és az MS-ben nem találtunk nemi különbségeket az E2 nem-klasszikus hatásában. Korábbi hippocampusban végzett elektrofiziológiai vizsgálatok is alátámasztották ezt. Azonban az bizonyos, hogy az ER β a hippocampus CA1-es régiójában a CREB foszforilációban fontos szerepet játszik. Mivel a hippocampusban

relatíve alacsony az ER β expresszió, ezért feltételezhető, hogy ez a hatás közvetett módon az erre a területre irányuló ösztrogén szenzitív bemeneteken keresztül jön létre.

A genistein nem-klasszikus hatásai a neonatális agy hypothalamusában

Vizsgálatainkban igazoltuk, hogy az E2-höz hasonlóan a genistein is képes a hypothalamusban, az anteroventral-periventricular nucleusban (AVPV-ban) és az MPN-ben a CREB foszforiláció növelésére neonatális korban. Fontos megemlíteni, hogy ezt a hatást egy olyan dózírozással értük el, aminek a legmagasabb koncentrációja is alacsony dózissnak számít az emberi táplálkozási adatok szerint csecsemőkorban. A jelenlegi kísérleti eredményeink arra engednek következtetni, hogy a genistein CREB foszforilációt indukáló hatása az AVPV-ben és az MPN-ben szerepet játszhat a felnőtt korban megfigyelhető genisteinnel összefüggésbe hozható fertilitási és szexuális magatartási anomáliák kialakulásában.

2. Az E2 nem-klasszikus hatásai a GnRH neuronokon (2,9,14,12)

Az E2 visszacsatolás egyik alapvető cél neuron csoportja a GnRH neuronok, melyek a fertilitás irányításának "processzor" sejtjei. Ebben a kísérletsorozatban az E2 gyors, nem-klasszikus hatásait vizsgáltuk a GnRH neuronok membránpotenciáljára, az intracelluláris Ca²⁺ szintjére, a CREB foszforilációra és az abban részt vevő jelátviteli rendszerekre. Kísérleteinket vad típusú, GnRH specifikus ER β génkiütött (GnRH- ER β KO), és GnRH specifikus genetikailag kódolt Ca²⁺ indikátorral rendelkező (GnRH-pericam) valamint GnRH neuron specifikus GFP-t expresszáló egereken végeztük, immunhisztokémiai, Ca²⁺ imaging és egy-sejt elektrofiziológiai vizsgálatok segítségével.

Az E2 nem-klasszikus hatása emeli a Ca²⁺ tranzienseket a GnRH neuronokban

A sejtek jelátvivő útvonal hálózatának egyik legfontosabb eleme a Ca²⁺ mely igen sok jelátvivő molekula működését szabályozza. A vizsgálataink megmutatták, hogy az E2 egyértelműen növelte a Ca²⁺ tranziensek számát a GnRH neuronokban GnRH-pericam egerekben. Az ER β KO állatokkal és az ösztrogén receptor antagonistákkal elvégzett kísérleteink azt is megmutatták, hogy az intracellulárisan elhelyezkedő ER α -án keresztül az E2 emeli a Ca²⁺ tranziensek mennyiségét a GnRH neuronokban. Mivel ER α nem található a GnRH neuronokban ezért elképzelhető, hogy az E2 interneuronokon keresztül éri el a hatást. Ez a feltevés és az a megfigyelés, hogy a Ca²⁺ tranziens emelkedés nem függött az akciós potenciál dependens szinaptikus neurotranszmissziótól, arra engedett következtetni, hogy az E2 Ca²⁺ tranziensekre gyakorolt hatásaiban a GnRH neuronok akciós potenciál független GABAerg szabályozása is szerepet játszhat. Ezt a hipotézisünket alátámasztotta az a kísérlet, amelyben GABA_A receptor antagonistá és TTX jelenlétében az E2 hatását gátolni tudtuk. A második kísérletünk tovább erősítette ezt az elképzelésünket, mivel azt kaptuk, hogy az E2 képes növelni az miniatür inhibitorikus posztzinaptikus áramot (mIPSC-t) a GnRH neuronokban, vagyis az E2 képes növelni a GnRH neuronokat célzó, akciós potenciál független GABA felszabadulását. Kimutattuk, hogy ez a mechanizmus a nem-klasszikus hatásokhoz kötődik, mivel nem függ a géntranszkripciótól, és azt is, hogy valamilyen mechanizmus szerint az IP3 receptoroktól függ.

Az E2 a PKA/CaMKII-ERK1/2 szignáltranszdukciós rendszeren keresztül aktiválja a CREB-et a GnRH neuronokban

A Ca²⁺ tranziensek növekedése jelentősen emeli a CREB foszforiláció mértékét a sejtekben, ezért valószínűsíthető, hogy az E2 adása emeli a CREB foszforilációt a GnRH neuronokban. Valóban, *in vivo* kísérleteinkben megmutattuk, hogy az E2 gyorsan (<15 perc), dózisfüggő módon növelte a GnRH neuronokban a CREB foszforilációt és ez 1 óra illetve 4 óra múlva is

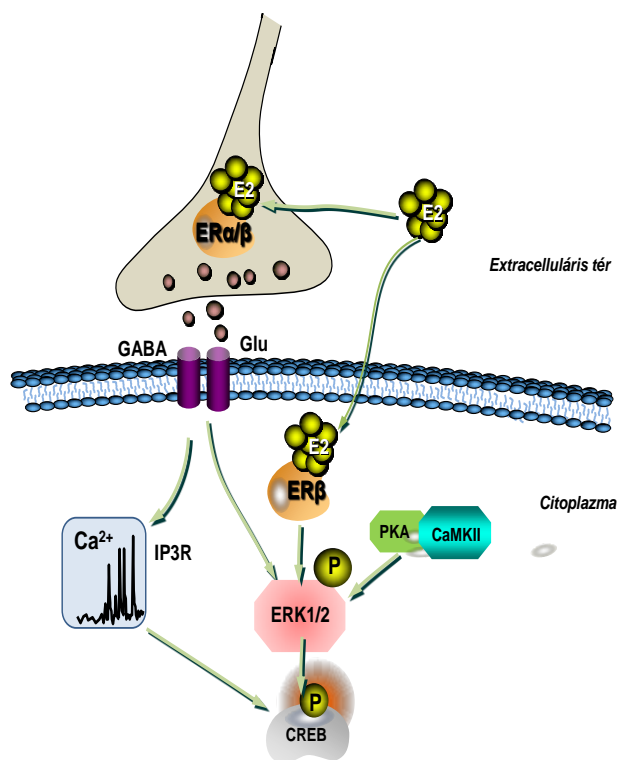
megfigyelhető volt. Érdekes módon ez a foszforiláció a hím állatokban hiányzott és az alap foszforilációs szint is nagyobb volt a CREB-nél a hím GnRH neuronokban, ami a GnRH neuronok szignáltranszdukciós útvonalainak szexdimorfizmusára utal.

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy milyen jelátviteli útvonalak állhatnak ennek hátterében. Az E2 indukálta ERK1/2 foszforiláció tranzienst adódott, 15 percnél érte el a maximumát, ami arra engedett következtetni, hogy az ERK1/2 foszforiláció megelőzi, és talán befolyásolhatja a CREB foszforilációt. Ezt a feltevésünket a MEK1/2 inhibitorral történt *in vitro* kísérleteink megerősítették. További *in vitro* kísérleteink azt is megmutatták, hogy a PKC jelátvivő rendszerrel ellentétben a PKA és a CaMKII alapvető szerepet játszanak az E2 kiváltotta CREB és ERK1/2 foszforilációban.

Az E2 nem-klasszikus hatásának támadáspontjai a GnRH neuronban: ERK1/2, mint koincidencia detektor

Mivel az ERK1/2 foszforiláció a transzsinaptikus aktiváció részeként jöhet létre, ezért feltételeztük, hogy az E2 transzsinaptikusan váltja ki az ERK1/2 foszforilációt a GnRH neuronban. Megfigyeltük, hogy TTX és glutamát/GABA_A receptor blokkoló együttes alkalmazásakor az E2 nem volt hatással az ERK1/2 foszforilációra a GnRH neuronban. Ez arra enged következtetni, hogy az E2 indirekten hat az ERK1/2 és a CREB foszforilációra a GnRH neuronban. Az elektrofiziológiai kísérletek eredményei alapján feltételeztük, hogy az E2 az akciós potenciál független GABAerg neurotranszmisszió felerősítése révén modulálja a jelátviteli rendszereket a GnRH neuronokban. Érdekes módon a GnRH-ERβ egereken végzett kísérleteink azt mutatták, hogy az E2 indukálta CREB és ERK1/2 foszforiláció a GnRH-ban lévő ERβ-től függ. Ez a megfigyelés azt igazolja, hogy az E2 az ERK1/2-n és a CREB-en megfigyelt nem-klasszikus hatását közvetlenül a GnRH neuronra hatva az ERβ-án keresztül fejtja ki. A transzsinaptikus blokkolókkal kapott kísérleti adatainkkal egybevetve arra a következtetésre juthatunk, hogy az E2 jelátvivő rendszerekre gyakorolt hatása a GnRH neuronokban közvetlenül az

ERβ-án keresztül és ezzel párhuzamosan közvetetten transzsinaptikusan is érvényesül. Ebben a modellben úgy képzeljük, hogy az ERK1/2 foszforiláció a GnRH neuronban egy koincidencia detektor, aminek aktiválásához mind a direkt ERβ-án keresztül megvalósuló E2



I.ábra A nem-klasszikus ösztrogén hatások lehetséges mechanizmusai a cAMP response element binding protein (CREB) foszforilációt szabályozó intracelluláris jelátvivő rendszereken GnRH neuronban. Az E2 az interneuronokban lévő ösztrogén receptorokon keresztül a GABA vagy a glutamát neurotranszmisszió út Ca²⁺ tranzienst emelkedés közvetítésével növeli a CREB foszforilációt. A másik útvonal az ERβ-án keresztül az ERK1/2 illetve a CaMKII és a PKA közvetítésével történik. Az ERK1/2 koincidencia detektorként működik. Rövidítések: PKA: protein kináz A, MAPK: mitogen-activated protein kináz, E2: 17β ösztrogén, CaM: calmodulin, CaMKII: calcium calmodulin kináz II, ERK1/2: extracellular signal regulated kináz, IP3R: inositol 3 foszfát receptor.

hatás, mind az indirekt E2 indukálta GABAerg szinaptikus transzmisszió jelenléte szükséges (1. ábra).

Az E2 indukálta CREB foszforiláció fiziológiásan releváns jelenség

Az E2 nem-klasszikus hatásainak vizsgálatában az egyik alapvető kérdés, hogy van-e fiziológiai relevanciája a jelenség meglétéén túl. Kísérleteink azt mutatták, hogy a GnRH neuronokban a CREB és az ERK1/2 foszforiláció magasabb volt az áloperált diösztruszban lévő állatokban, mint az ovariektomizáltakban. Ez az eredmény azt sugallja, hogy az endogén, fiziológiásan a vérplazmában jelen lévő E2 modulálni tudja az ERK1/2-CREB jelátvivő hálózatot a GnRH neuronban. *In vitro* kísérleteinkben fiziológiás koncentrációjú E2 adása is emelte a CREB foszforilációját a GnRH neuronokban, ami valószínűsíti, hogy ez a jelenség létrejöhet a központi idegrendszerben a keringésben lévő fiziológiás E2 szint hatására is.

Az itt bemutatott kísérletsorozatot nagyrészt ovariektomizált nőstény egereken végeztük és nagy dózisú egyszeri E2-vel kezeltük őket. Ez valójában egy E2 negatív visszacsatolós modell is egyben, ami azt sugallja, hogy a nem-klasszikus folyamatok az ösztrogén GnRH neuronokra gyakorolt negatív visszacsatolásában is jelen vannak. Korábbi kísérletek az ER α szerepét valószínűsítik az E2 visszacsatolásokban, azonban a GnRH neuronok ER β -át expresszálnak, ami azt jelentheti, hogy a nem-klasszikus folyamatok transzsinaptikus módon, az ER α -án keresztül vehetnek részt a GnRH visszacsatolós szabályozásában. Az E2 indukálta nem-klasszikus folyamatok direkt és indirekt hatással rendelkeznek a GnRH neuronokon, ami az sugallhatja, hogy az E2 GnRH neuronra gyakorolt negatív visszacsatolós mechanizmusában a közvetett és közvetlen hatásoknak egyaránt szerepe lehet.

Kísérleteinkben az ERK1/2-t és a CREB-et valamint a pERK1/2-t és a pCREB-et expresszáló GnRH neuronok száma alacsonynak mutatkozott, aminek egyrészt metodikai okai vannak, mivel az immunperoxidáz hisztokémia detekciós küszöbe miatt nem minden molekula tehető láthatóvá egy bizonyos expressziós szint alatt. A kapott adatok azt is mutatják, hogy nem minden GnRH neuron válaszol ugyanúgy az E2 alkalmazására. Ezt támasztja alá, hogy a pERK1/2-t és a pCREB-et expresszáló GnRH neuronok nagy részét az rPOA-ban találtuk az E2 kezelés után. Az rPOA-ban lévő GnRH neuron populáció az ún. "surge" sejt csoport, ami kritikus szerepet játszhat a preovulatorikus gonadotropin "surge"-ben. Annak ellenére, hogy e neuron csoport szerepe a negatív visszacsatolásban nem ismert, kísérleteink megmutatták, hogy az ERK1/2 és a CREB foszforiláció tanulmányozása segítséget nyújthat a GnRH neuronok közötti funkcionális különbségek megtalálásában.

3. A CREB szerepe az ösztrogén indukálta negatív visszacsatolásban a GnRH neuronokon (3)

Az előző kísérletekből látható, hogy az E2 foszforilálja a CREB-et a GnRH neuronban. A következő kísérletsorozatban ennek a hatásnak a fiziológiai relevanciáját tanulmányoztuk. Ezért a kísérletekben GnRH specifikus CREB KO (GnRH-CREB KO), global-CREB KO (melynek minden sejtjéből hiányzik a CREB) és GnRH-CREB KO/global-CREB KO (a GnRH neuronból hiányzik a CREB és CREB is) egerek alkalmazásával megvizsgáltuk, a pubertás megjelenését, az ösztroz ciklus váltakozását, a termékenységet és az E2 negatív visszacsatolását a GnRH neuronokon. Továbbá konfokális pásztázó lézermikroszkóp (KLSM) segítségével megvizsgáltuk a mutáns egerekben a GnRH neuron morfológiáját.

GnRH neuronok száma a CREB mutáns egerekben

Az egyik érdekes fenotípus a global CREB KO egereknél adódott, amelyekben valamivel megemelkedett a GnRH neuronok száma. Ezekben a vizsgálatokban nem eldönthető, hogy a növekedés a GnRH peptid koncentrációjának vagy a GnRH neuron számának tényleges

emelkedése miatt következett be. Az emelkedés nem mutatott anatómiai specificitást a GnRH neuron anatómiai kontinuumán (MS, rostralis preopticus area (rPOA), anterior hypothalamicus area (AHA)), ezért feltehetőleg nem a GnRH neuron migrációjában bekövetkezett változások tehetők felelőssé.

Az idegrendszerben a CREB-ről köztudott, hogy rengeteg folyamatban játszik kulcsszerepet, kezdve a sejtek túlélésének szabályozásától egészen a memória folyamatokig. Érdekes módon azonban kísérleteinkben a GnRH neuronok embrionális kortól való CREB deléciója relatíve kis hatással rendelkezik, pl. a GnRH neuronok épen maradtak és nem pusztultak el. Ugyan megfigyelhető valamekkora deficit a reprodukív funkciókban, de a GnRH neuronok GnRH peptid szintetizáló képessége fennmarad és az állatok fiatal korban fertilibek. Korábbi vizsgálatok azt is megmutatták, hogy a GnRH neuronok legalább 65%-át kell ahhoz kiirtani, hogy a fertilitás csökkenjen. Ezek szerint kísérleteinkben a GnRH neuronok legalább 35 %-a megfelelően működik a CREB/CREM mutáns egerekben.

A pubertás, az ösztroz ciklus és a termékenység a CREB mutáns egerekben

A CREB GnRH specifikus deléciója CREM deléciójával vagy anélkül nem változtatta meg a pubertás időzítését. Azonban felnőtt korban a GnRH-CREB KO egerekben (CREM delécióval vagy anélkül) az ösztroz ciklus dinamikája megváltozott és hosszabb időt töltött diösztrozban és rövidebbet ösztrozban az állat. Érdekes módon ez a megzavart ösztroz ciklus és a negatív visszacsatolás nem volt hatással az egerek termékenységére az első hat hónapban a mutáns egerekben, ami arra utal, hogy a GnRH-CREB KO egerek ovulációja nem érintett. Mindössze az történhetett, hogy a megváltozott GnRH/LH kimenet megzavarhatta az ösztroz ciklus integritását a mutáns egerekben. A 6. hónap után azonban a GnRH-CREB KO egerek (CREM delécióval vagy anélkül) nem produkáltak több utódot, ami arra enged következtetni, hogy a GnRH neuronokban a CREB deléciója felgyorsítja a reprodukív öregedést.

Negatív ösztrogén visszacsatolás CREB mutáns egerekben

Korábbi kísérletünk, ahol megmutattuk, hogy az E2 gyorsan foszforilálja a CREB-et a GnRH neuronban ovariectomizált állatban, azt sugallta, hogy a gyors hatásnak lehet valamilyen szerepe az E2 negatív visszacsatolásában. A CREB mutáns egereken elvégzett negatív visszacsatolási kísérletek alátámasztották ezt a feltevésünket, mivel a GnRH-CREB KO egerekben az E2 nem tudta az ovariectómia indukálta LH emelkedést visszaszorítani. Ezek alapján arra a következtetésre juthatunk, hogy a CREB fontos szerepet játszik a GnRH neuronok akut ösztrogén visszacsatolásában. Az is valószínűsíthető, hogy a CREM képes kompenzálni a CREB veszteséget az ovariectómia indukálta LH emelkedésben, mivel ez jelentősen kisebb volt a GnRH-CREB KO/global CREM KO egerekben, mint a GnRH-CREB KO egerekben. Látható volt még, hogy a CREB-en kívül más jelátvivő rendszer is szerepet játszhat a negatív visszacsatolás szabályozásában mivel a bazális LH szint és az ovariectómia indukálta LH emelkedés is normális értéket mutatott a GnRH-CREB KO állatokban. Ez a CREB mellett működő jelátvivő rendszer meglétét valószínűsíti ezekben a folyamatokban.

A GnRH neuronok morfológiája CREB KO egerekben

Az előző kísérletek azt mutatták, hogy a CREB fontos szerepet játszik az E2 indukálta dendritikus átrendeződésekben és a somaticus tüske kialakulásában a hippocampusban. Mivel az E2-ről ismert, hogy szabályozza a GnRH neuron somaticus és dendrit tüskéinek denzitását, megvizsgáltuk, hogy a GnRH neuron CREB deléciója, hogyan hat a somaticus tüskék morfológiájára. A KLSM-en történt vizsgálatok a somaticus tüske szám 50%-os csökkenését mutatták a GnRH-CREB KO állatok GnRH neuronjaiban. Ez a megfigyelés azt

jelzi, hogy a somaticus tüskék számának a csökkenése valószínűleg csökkenti az efferens bemenetek számát, mely a negatív visszacsatolás defektusához vezethet a GnRH neuronban.

4. Nem-klasszikus ösztrogén hatások a basalis előagyi kolinerg neuronokban

Következő vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy az E2 milyen nem-klasszikus hatásokkal rendelkezik egy-sejt szinten a basalis előagyi kolinerg (BEK) neuronokon. Ezekben a vizsgálatokban vad típusú és ER α illetve ER β KO valamint kolinerg GFP egereket használtunk, ahol a GFP molekula a basalis előagyi kolinerg neuronokban expresszáldott. A méréseket in vivo valamint in vitro túlélő agyszeleteken és felnőtt élő idegsejten végrehajtott nagy felbontású és valós idejű egy-molekula detekciós mikroszkópiával, kvantitatív kettős jelöléses immunhisztokémiával végeztük.

Egy-molekula detekciós mérések élő BEK neuronok neutrofin receptorain

A neutrofin receptorok, különösképpen a TrkA receptorok alapvető szerepet játszanak a kolinerg neuronok funkcióinak szabályozásában és részt vesznek az ERK1/2/CREB szignáltranszdukciós rendszer aktivációjában. Korábbi PC12-es sejteken végzett egy-molekula detekciós vizsgálatok kimutatták, hogy a TrkA receptorok tranziensen immobilizálódnak és ekkor történik meg a receptorok foszforilációja és a Ras/Raf interakció, ami aktiválja a receptorokhoz kapcsolt jelátvivő útvonalakat, mint a MAPK rendszert. Egy-molekula detekciós méréseink megmutatták, hogy a felnőtt kolinerg neuronokban a TrkA receptor felületi mozgásának a trajektóriájában immobilis és mobilis szakaszok váltják egymást. Kimutattuk, hogy az E2 a TrkA receptor ligandjához az NGF-hez hasonlóan növeli a TrkA receptor molekula immobilizációval eltöltött idejét. Mivel a TrkA receptor aktivációja az immobilis szakaszban következik be, ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a TrkA receptor az E2 hatására a kolinerg neuron membránjában aktiválódik. Ennek a jelenségnek fontos szerepe lehet a kolinerg neuronok szignáltranszdukciós működésének szabályozásában is. További kísérletek szükségesek a folyamat receptor függőségének eldöntéséhez.

Az E2 közvetlenül foszforilálja a CREB-et a BEK neuronokban

A kettős jelöléses in vivo immunhisztokémiai kísérleteink egyértelműen megmutatták, hogy az E2 gyorsan képes foszforilálni a CREB-et a BEK neuronokban. A központi idegrendszerben a CREB mind transzszinaptikusan, mind pedig direktén az adott sejtre ható folyamatok révén foszforilálódhat. In vitro túlélő agyszeleteken elvégzett kísérleteink azt valószínűsítik, hogy az E2 közvetlenül foszforilálja a CREB-et a BEK neuronokban, mivel a TTX alkalmazása hatástalannak bizonyult. Ugyanakkor megemlítendő, hogy ebben az esetben nem gátoltuk az akciós potenciál független neurotranszmissziót, mely jelentős szerepet játszik a GnRH neuronokkal szinaptikus kapcsolatot létesítő GABA neuronoknál.

A CREB foszforiláció dinamikája

Az E2-indukálta CREB foszforilációt az idegrendszerben sok területen leírták, azonban kevés figyelmet szenteltek a folyamat idegsejt specifikus jellegének kimutatására. Korábbi kísérleteinkben megmutattuk, hogy az E2 képes a GnRH neuronokban az ER β -án keresztül foszforilálni a CREB-et és most igazoltuk, hogy az E2 ugyanezt tudja a BEK neuronokban is az ER α közvetítésével. A GnRH neuronokban és a kolinerg neuronokban megfigyelt E2 indukálta CREB foszforiláció dinamikájában azonban alapvető különbségek vannak. A GnRH neuronokban a CREB foszforiláció emelkedett marad az E2 adását követő 4 óra múlva. Ezzel szemben a BEK neuronokban ez a folyamat tranziens volt és 15 percnél illetve

1 óránál mutatott maximumot. Ez a differencia jelzi azt a nyilvánvaló különbséget, ami az E2 szenzitív jelátvivő útvonalban van a két neuronális fenotípus között. A különbség abból fakadhat, hogy a GnRH neuronok ER β -át, a BEK neuronok ER α -át expresszálnak. Ezt mutatja az is, hogy a BEK neuronokban az E2 indukálta CREB foszforiláció blokkolódik az ER α KO egerekben, vagyis az E2 kiváltotta CREB foszforilációt az ER α közvetíti a BEK neuronokban. Megfigyeltük azt is, hogy az E2 indukálta CREB foszforiláció nem volt annyira intenzív az ER β KO állatokban a septalis területen, ami azt is jelentheti, hogy az ER β -nak lehet valamilyen szerepe az MS-ben lejátszódó CREB foszforilációban. Ez nem von le abból az egyértelmű következtetésből, hogy *in vivo* az E2 indukálta CREB foszforiláció a BEK neuronokban az ER α -án keresztül valósul meg.

A CREB foszforiláció anatómiai specificitása, a jelátvivő pályák szerepe a BEK neuronokban

Jelátvivő pálya specifikus inhibitorokkal elvégzett vizsgálataink megmutatták, hogy az E2 foszforiláció a PKA és ERK1/2 jelátvivő molekuláktól függ *in vivo*. Kísérleteinkben a BEK neuronok CREB foszforilációjának dinamikája nem csak a GnRH neuronoktól különbözött, hanem anatómiai specificitást is mutatott. Az MS-ben a CREB foszforiláció maximuma 1 óránál, a substantia innominata nucleus basalis magnocellularis complexben (SI/NBM-ben) 15 percnél volt megfigyelhető. Ez arra enged következtetni, hogy a kolinerg neuronok E2 szenzitív szignalizációja a kolinerg neuronok elhelyezkedésétől függ. Kimutattuk, hogy míg a CREB foszforiláció PKA inhibitorral való blokkolása csak az SI/NBM-ben volt hatékony, addig az ERK1/2 gátlása az SI/NBM-ben és az MS-ben is hatásosnak bizonyult. Mivel a PKA aktiválni tudja a MAPK jelátviteli útvonalat, ezért ezek az eredmények azt jelenthetik, hogy az E2 a CREB-et az SI/NBM-ben a PKA-MAPK jelátviteli rendszeren keresztül foszforilálja, az MS-ben pedig ugyanehhez a MAPK aktiválása elegendő.

Az E2 indukálta CREB foszforiláció fiziológiás szerepe a BEK neuronban

Az alapvető kérdés az, hogy mennyire relevánsak ezek az adatok a kolinerg neuronok működését tekintve. Az a tény, hogy a pCREB immunreaktivitással rendelkező BEK neuronok száma a proösztrozban lévő állatokban magasabb értékeket mutatott, mint az ovariektomizáltakban, azt jelenti, hogy a vérben lévő, az ováriumokban termelődő E2 befolyásolhatja, a GnRH neuronokhoz hasonlóan, a BEK neuronokban is a CREB foszforilációt.

Az adatok egyik legfontosabb fiziológiai relevanciája az E2 jól ismert citoprotektív hatásaival hozható összefüggésbe. A CREB egy központi jelentőségű transzkripciófaktor a neuroprotektív folyamatokban. Számos antiapoptotikus protein pl. a Bcl2, a Bclx és a neuropeptid, mint a BDNF génje tartalmaz CRE-t a promoter régiójában, ami jól mutatja a CREB központi jelentőségét az idegsejtek túlélésének szabályozásában. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy az E2 indukálta CREB foszforilációnak jelentős szerepe lehet az E2-nek a BEK neuronokra gyakorolt protektív hatásaiban.

5. A nem-klasszikus ösztrogén hatások szerepe az ösztrogén indukálta neuroprotektióban a bazális kolinerg neuronokon *in vivo* (1, 4, 5, 8, 15, 16)

Ezekben a kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy az E2 indukálta nem-klasszikus folyamatok hogyan hatnak a neurodegeneratív folyamatokra. Megvizsgáltuk, egyszeri E2 injekció hatását a BEK neuronok neurodegenerációjára. Intracerebrális NMDA injekcióval irtottuk az SI/NBM-ben lévő kolinerg neuronokat ovariektomizált nőstény egerekben, ami az agykéregben a kontralaterális oldalon kolinerg rostkieséshez vezetett. Az E2 és a nem-klasszikus ösztrogén jelátvitelt specifikusan aktiváló ösztren kezelést az NMDA injekció után

1 órával végeztük. A kísérleteket vad típusú fiatal és öreg, hím és nőstény basalis előagyi neuron specifikus ER α KO (nER α KO) egereken végeztük kvantitatív hisztokémiával és immunhisztokémiával.

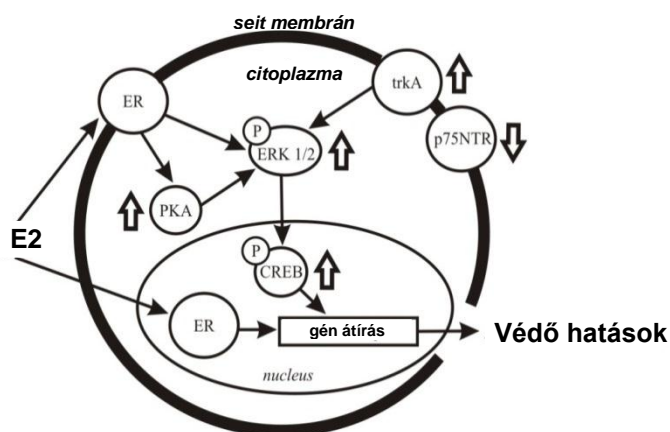
Az egyszeri E2 kezelés neuroprotektív a BEK neuronokon: az ER α és a nem-klasszikus hatások központi szerepe

Kísérleteinkben megmutattuk, hogy az E2, az NMDA SI/NBM-be való injektálása után 1 órával adva, csökkenti a kolinerg rostkiesés mértékét. Korábban hosszan tartó, krónikus E2 előkezelést alkalmaztak a kutatók, ami egy prevenciósi kezelési modellnek felelt meg. Ezzel szemben a mi kísérleti elrendezésünkben az E2-t a lézió után adtuk az állatnak, amely így a klinikumban az akut agyi katasztrófák illetve traumák kezelését modellezi.

Megfigyeltük, hogy az E2 kezelés képes volt növelni a kolinerg rostdenzitást, de a kolinerg sejtpusztulást nem befolyásolta. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy az NMDA irtást követően az E2 kezelés hatására, a megmaradó kolinerg neuronok axon kollaterálisokat növesztenek a kérgi területeken azért, hogy a sérült illetve az elpusztult kolinerg neuronok funkcióit átvegyék. A korábbi vizsgálatok kiderítették, hogy az E2 képes az axon növekedését serkenteni, az entorhinális kéregben és a hippocampusban, léziót követően. Ennek alapján az E2 injekció hatásáról azt gondoljuk, hogy restauráló folyamatokat indít el a túlélő kolinerg neuronokban azáltal, hogy növeli azok axon kollaterálisainak mennyiségét az SI/NBM kortikális projekciós területein.

A restauráló folyamatokban szerepe lehet az E2 BEK neuronok TrkA receptorát érintő aktivációinak, amit az egy-molekula detekciós méréseink is alátámasztanak.

Korábbi vizsgálatokból tudjuk, hogy az ER α jelentős szerepet játszik az E2 protektív hatásaiban agyi ischaemiában. A BEK neuronok a klasszikus ösztrogén receptorokból kizárólag ER α -át expresszálnak, ezért az E2 protektív hatásaiban feltételezhetően szerepe van ennek a receptornak. Ezt erősítették meg az nER α KO egereken elvégzett kísérleteink is, melyek megmutatták, hogy az E2 az ER α -án keresztül fejti ki neuroprotektív hatásait a BEK neuronokon. Ezt az elképzelést támasztja alá az a megfigyelés, hogy az öregedő állatokban az E2 adása nem bizonyult hatékonynak. Öregedő egerekben ugyanis a BEK neuronokban az ER α expressziója csökken, ami megmagyarázhatja az E2 hatástalanságát az öreg állatokban. Habár a gliasejtek is expresszálnak ösztrogén receptorokat és jelentős szerepet tölthetnek be a neuroprotektióban, kísérletünkben kizárólag neuronokból ütöttük ki az ER α -át, ami egyértelműen a neuronális ER α szerepét hangsúlyozza az E2 hatásmechanizmusában a gliális ösztrogén receptorokkal szemben. Mivel az ER α delécio nem korlátozódott a kolinerg neuronokra, így nem zárható ki, hogy az E2 protektív hatása interneuronokon keresztül is érvényesülhet.



2. ábra Klasszikus és nem-klasszikus ösztrogén jelátvivő pályarendszerek szerepe az E2 indukálta protektív hatások kialakításában a BEK neuronokon. Az üres nyilak mutatják a receptorok illetve jelátvivő molekulák aktivitását a BEK neuronban. ER α : ösztrogén receptor α ; trkA: tropomyosinhoz kapcsolt kináz A; p75NTR: p75 neurotrophin receptor; pERK 1/2: foszforilált extracelluláris signal-regulált kináz 1/2; PKA: protein kináz A; pCREB foszforilált cAMP response element-binding protein.

Kísérleteinkben a nem-klasszikus ösztrogén jelátvivő útvonal aktivátor ösztérn, hasonlóan az E2 adásához, neuroprotekción eredményez a BEK neuronokon. Az ösztérnről korábban *in vitro* kísérletekben leírták, hogy megvédte a kortikális tenyészeteket az A β neurotoxikus hatásaival szemben és nem indukált ERE mediálta géntranszkripciót. Az ösztérn kísérletek azt jelzik, hogy az E2 neuroprotektív hatásaiban a nem-klasszikus jelátviteli folyamatoknak jelentős szerepe lehet. Ezt támasztották alá jelátviteli rendszerek blokkolóival (MEK illetve PKA blokkoló) elvégzett kísérleteink, melyek megmutatták, hogy képesek az E2-nek a BEK neuronok rostdenzitására gyakorolt restauráló hatásait gátolni. Ezekből az eredményekből arra a következtetésre juthatunk, hogy az E2 a PKA és a MAPK jelátviteli rendszereken keresztül indukálja a kolinerg rost restaurációt az NMDA léziót követően (2. ábra).

Az egyszeri nagy dózisé E2 injekció terápiás relevanciája

Kísérleteink eredménye szerint az endogén E2 koncentráció (ovariectomia versus intakt állatok) nem befolyásolta az NMDA indukálta rostpusztulás mértékét. Valójában csak szuprafiziológiás E2 dózissnál figyelhetünk meg protektív hatásokat. Azt is kimutattuk, hogy a terápiás időablak viszonylag szűk mivel 24 óra múlva az E2 egyszeri injekciójának nem volt hatása az NMDA indukálta kolinerg rostpusztulásra. A nőstényeken és hímeiken végzett kísérletek nem mutattak nemi differenciát. Azonban az öreg állatokban az E2 protektív hatása nem érvényesült. Ezek a kísérletek arra mutatnak rá, hogy az E2 egyszeri dózisének egy adott időintervallum és koncentráció tartomány mellett lehet releváns terápiás hatása a nemtől függetlenül. Ugyanakkor arra is felhívja a figyelmet, hogy ez a jótékony hatás az öregedéssel beszőkül.

A WHI vizsgálatok óta tudjuk, hogy a hormon pótló terápiák alkalmazásával jelentős problémák merülnek fel a mellékhatások miatt, ezért fontos, hogy olyan ösztrogénszerű vegyületek után kutassunk, amelyek rendelkeznek az E2 jótékony gyógyító hatásaival, lehetőleg mellékhatások nélkül. A jelenlegi vizsgálatok szerint a nem-klasszikus ösztrogén jelátvivő pálya aktivátorok (Activators of Non-Genomic Estrogen Like Signaling (ANGELS)), mint az ösztérn, ígéretes vegyületek lehetnek, mivel E2-szerű protektív hatásokkal rendelkeznek az E2 feminizáló hatása nélkül. Az ösztérn és a hozzá hasonló vegyületek nagy valószínűséggel fontos szerephez jutnak majd a HPT-ban, mivel biztonságosabbak lehetnek, mint az idáig alkalmazott nem szelektív ösztrogén vegyületek. A nem-klasszikus ösztrogén hatások neuroprotektív potenciáljának felfedezése és továbbfejlesztése segítséget jelenthet a BEK neuronok degenerációjával összefüggő kognitív deficittel bíró betegek terápiájában is.

IV. Összefoglalás

A nem-klasszikus ösztrogén hatások a központi idegrendszerben és azok jelátvivő mechanizmusa a kolinerg és a GnRH neuronokban

Kísérleteinkben a CREB és az ERK1/2 foszforilációját mintegy indikátorként használva kimutattuk, hogy az E2 gyorsan, nem-klasszikus módon képes aktiválni ezeket a molekulákat a központi idegrendszer különböző területein, mely nemi különbségeket mutat és ezt a hatást a klasszikus ösztrogén receptorok mediálják. Kimutattuk továbbá, hogy az E2-hez hasonlóan a genistein gyors, nem-klasszikus hatást gyakorol a hypothalamicus CREB foszforilációra neonatális korban. *In vivo* egy sejten végzett méréseink azt is igazolták, hogy az E2 gyorsan, nem-klasszikus módon képes az CREB-et foszforilálni a GnRH és a kolinerg neuronokban és ezt a hatást ezekben az esetekben is a klasszikus ösztrogén receptorok közvetítik.

In vitro és in vivo méréseinkkel kimutattuk, hogy az E2 a CREB-et az ERK1/2 aktivációján át egy jelátvivő hálózaton keresztül foszforilálja a GnRH neuronban. Ebben az aktivációban részt vesznek a CaMKII és a PKA jelátvivő molekulák is. Az E2-indukálta CREB foszforilációhoz szükséges az ERK1/2 molekulának az ER β -án keresztül megvalósuló direkt valamint az interneuronon keresztül létrejövő indirekt aktivációja. Az ERK1/2 feltehetőleg koincidencia detektorként működve szabályozza ezt a folyamatot. A indirekt hatások egyik lényeges eleme az E2-nek a GABAerg neuron ER α -ján keresztül megvalósuló hatása, mely a GnRH neuronban az IP3 receptoron keresztül emeli a Ca²⁺ tranziensek számát. Ennek a jelenségnek valószínűleg szerepe van a CREB foszforiláció szabályozásában is.

In vivo és in vitro kísérleteinkben azt is kimutattuk, hogy az E2 képes a BEK neuronok TrkA receptorainak immobilizációját növelni, mely fontos szerepet játszhat a receptor és a hozzá tartozó ERK/CREB jelátviteli rendszerek aktivációjában. Megmutattuk továbbá, hogy az E2 a BEK neuronokon az ER α segítségével gyorsan és közvetlenül foszforilálja a CREB-et. Ebben a foszforilációban a PKA illetve az ERK1/2 jelátvivő molekulák alapvető szerepet játszanak. Érdekes módon a CREB-et foszforiláló E2 szenzitív jelátvivő pályarendszerek anatómiai specificitást mutatnak a BEK neuronokban, mivel az MS-ben lévő kolinerg neuronokban elegendő volt az ERK1/2 az E2 indukálta CREB foszforilációhoz, míg az SI-ben a PKA is szükséges volt ehhez.

A nem-klasszikus ösztrogén hatások jelentősége

Mint minden orvosbiológiai kutatás, ezen eredmények igazi értékét is a jövőbeni klinikai hasznosulással lehet igazán lemérni, azzal, hogy a felfedező kutatás elvezet-e olyan eredményekhez, melyek később a klinikumban hasznosíthatóak lehetnek.

A szója alapú táplálékokban lévő fitoösztrogén genisteinről megtudtuk, hogy jelentős nem-klasszikus hatást gyakorol a fejlődő agy hypothalamusára. Ezek az adatok, jó támpontot szolgáltatnak további klinikai kutatásokhoz, amelyekben a genisteinnek a szexuális magatartásformák kialakulására és a fertilitásra gyakorolt felnőttkorban megjelenő hatásait elemzik.

A GnRH neuron specifikus CREB KO egerekkel elvégzett kísérleteink felhívták arra a figyelmet, hogy a GnRH neuron CREB molekulái alapvető szerepet játszhathatnak az ösztrogén negatív visszacsatolásában és a reprodukciós öregedésben. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az E2-nek a CREB-re gyakorolt hatása a GnRH neuronban alapvető szerepet tölt be a szaporodás szabályozásában, ezáltal egy új lendületet jelenthet az infertilitás kezelését célzó klinikai kutatásoknak is.

A kolinerg neuronok vizsgálatával megtudtuk, hogy az E2 indukálta nem-klasszikus hatásnak a neuroprotekciónban betöltött szerepe alapvető jelentőségű. A nem-klasszikus ösztrogén jelátvivő pályarendszerek szelektív aktivációjával jelentős neuroprotekción értünk el, mely fontos támpontot adhat hatékonyabb hormonpotló kezelési stratégiák kialakításához, valamint új irányt mutat a neuroprotektív gyógyszerek fejlesztésében is.

V. Az értekezés alapjául szolgáló, a szövegben sorszámmal citált saját közlemények jegyzéke

1. Kőszegi Zs, **Ábrahám IM** Effect of ageing on post-lesion oestradiol treatment on mouse cholinergic neurones in vivo JOURNAL OF NEUROENDOCRINOLOGY 24:(9) pp. 1243-1248. (2012) IF: 3,138
2. Cheong RY, Kwakowsky A, Barad Z, Porteous R, Herbison AE, **Abraham IM** Estradiol Acts Directly and Indirectly on Multiple Signaling Pathways to

- Phosphorylate cAMP-Response Element Binding Protein in GnRH Neurons. ENDOCRINOLOGY 153:(8) pp. 3792-3803. (2012) IF: 4,459
3. Andrea Kwakowsky , Allan E Herbison, **István M Ábrahám** The Role of cAMP Response Element Binding Protein in Estrogen Negative Feedback Control of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons JOURNAL OF NEUROSCIENCE 32:(33) 11309-17 (2012) IF:7,1
 4. Szego EM, Csorba A, Janaky T, Kekesi KA, **Abraham IM**, Morotz GM, Penke B, Palkovits M, Murvai U, Kellermayer MS, Kardos J, Juhasz GD Effects of Estrogen on Beta-Amyloid-Induced Cholinergic Cell Death in the Nucleus Basalis Magnocellularis NEUROENDOCRINOLOGY 93: pp. 90-105. (2011) IF: 2.376, Független idézetek száma: 3
 5. Kőszegi Zs, Szegő ÉM, Cheong RY, Tolod-Kemp E, **Ábrahám IM** Post-lesion estradiol treatment increases cortical cholinergic innervations via estrogen receptor alpha dependent non-classical estrogen signaling in vivo ENDOCRINOLOGY 152:(9) pp. 3471-3482. (2011) IF:4,45.
 6. Adori M, Kiss E, Barad Zs, Barabás K, Kiszely E, Schneider A, Kövesdi D, Sziksz E, **Abraham IM**, Matkó J, Sármay G Estrogen augments the T cell-dependent but not the T-independent immune response CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 67:(14) pp. 1661-1674. (2010) IF: 7,047, Független idézetek száma:3
 7. Sarvari M, Szego EM, Barabas K, Javor A, Toth S, Kovacs Z, **Abraham IM** Genistein Induces Phosphorylation of cAMP Response Element-binding Protein in Neonatal Hypothalamus In Vivo JOURNAL OF NEUROENDOCRINOLOGY 21:(12) pp. 1024-1028. (2009) IF: 3,700, Független idézetek száma: 3
 8. **Ábrahám IM**, Kőszegi Zs, Tolod-Kemp E, Szegő ÉM Action of estrogen on survival of basal forebrain cholinergic neurons: promoting amelioration. PSYCHONEUROENDOCRINOLOGY 34: pp. S104-S112. (2009) IF: 4,194, Független idézetek száma: 6
 9. Romano N, Lee K, **Abraham IM**, Jasoni CL, Herbison AE Nonclassical Estrogen Modulation of Presynaptic GABA Terminals Modulates Calcium Dynamics in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons ENDOCRINOLOGY 149:(11) pp. 5335-5344. (2008) IF: 4,945, Független idézetek száma: 27
 10. Szego EM, Barabas K, Balog J, Szilagyi N, Korach KS, Juhasz G, **Abraham IM** Estrogen induces estrogen receptor alpha-dependent cAMP response element-binding protein phosphorylation via mitogen activated protein kinase pathway in basal forebrain cholinergic neurons in vivo. JOURNAL OF NEUROSCIENCE 26:(15) pp. 4104-4110. (2006) IF: 7,453, Független idézetek száma: 53
 11. Barabas K, Szego EM, Kaszas A, Nagy GM, Juhasz GD, **Abraham IM** Sex differences in oestrogen-induced p44/42 MAPK phosphorylation in the mouse brain in vivo JOURNAL OF NEUROENDOCRINOLOGY 18:(8) pp. 621-628. (2006) IF: 2.774, Független idézetek száma: 5
 12. **Abraham IM**, Herbison AE Major sex differences in non-genomic estrogen actions on intracellular signaling in mouse brain in vivo NEUROSCIENCE 131:(4) pp. 945-951. (2005) IF: 3.410, Független idézetek száma: 33
 13. **Abraham IM**, Todman MG, Korach KS, Herbison AE Critical in vivo roles for classical estrogen receptors in rapid estrogen actions on intracellular signaling in mouse brain ENDOCRINOLOGY 145:(7) pp. 3055-3061. (2004) IF: 5.151, Független idézetek száma: 109
 14. **Abraham IM**, Han SK, Todman MG, Korach KS, Herbison AE Estrogen receptor beta mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in

- vivo JOURNAL OF NEUROSCIENCE 23:(13) pp. 5771-5777. (2003) IF: 8.306, Független idézetek száma: 121
15. **Ábrahám I**, Harkany T, Horvath KM, Veenema AH, Penke B, Nyakas C, Luiten PGM Chronic corticosterone administration dose-dependently modulates A β (1-42)- and NMDA-induced neurodegeneration in rat magnocellular nucleus basalis. JOURNAL OF NEUROENDOCRINOLOGY 12: pp. 486-494. (2000) IF: 2,598, Független idézetek száma: 45
 16. Harkany T, **Ábrahám I**, Timmerman W, Laskay G, Tóth B, Sasvári M, Kónya C, Sebens JB, Korf J, Nyakas C, Zarándi M, Soós K, Penke B, Luiten PGM β -Amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE 12: pp. 2735-2745. (2000) IF: 3,862, Független idézetek száma:121
 17. Kwakowsky A, Potapov, Koszegi Zs, Barad Zs, Bunn S, Kusumi A, **Abraham IM** Single molecule analysis of non-calssical estrogen action on neutrophin receptors. Készülőben.

VI. A PhD fokozat megszerzése óta megjelent egyéb saját közlemények

- Bhattacharai JP, Kaszas A, Park SA, Yin H, Park SJ, Herbison AE, Han SK, **Abraham IM** Somatostatin Inhibition of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons in Female and Male Mice. ENDOCRINOLOGY 151:(7) pp. 3258-3266. (2010) IF: 4.993
- Kwakowsky A, Schwirtlich M, Kooy F, **Ábrahám I**, Máté Z, Katarova Z, Szabó G GABA neurotransmitter signaling in the developing mouse lens: Dynamic regulation of components and functionality. DEVELOPMENTAL DYNAMICS 237:(12) pp. 3830-3841. (2008) IF: 3.018
- Papp AM, Nyilas R, Szepesi Z, Lorincz ML, Takacs E, **Abraham I**, Szilagyí N, Toth J, Medveczky P, Szilagyí L, Juhasz G, Juhasz G Visible light induces matrix metalloproteinase-9 expression in rat eye JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY 103:(6) pp. 2224-2233. (2007) IF: 4.451
- Kovács Z, Kékesi KA, Szilagyí N, **Ábrahám I**, Székács D, Király N, Papp E, Császár I, Szego E, Barabás K, Péterfy H, Erdei A, Bártfai T, Juhász G Facilitation of spike-wave discharge activity by lipopolysaccharides in Wistar Albino Glaxo/Rijswijk rats. NEUROSCIENCE 140:(2) pp. 731-742. (2006) IF: 3.427
- Abraham IM**, Meerlo P, Luiten PG Concentration dependent actions of glucocorticoids on neuronal viability and survival. DOSE-RESPONSE 4:(1) pp. 38-54. (2006)
- Han SK, **Abraham IM**, Herbison AE Effect of GABA on GnRH neurons switches from depolarization to hyperpolarization at puberty in the female mouse. ENDOCRINOLOGY 143:(4) pp. 1459-1466. (2002) IF: 5.095
- Ábrahám IM**, Harkany T, Horvath KM, Luiten PGM Action of glucocorticoids on survival of nerve cells: promoting neurodegeneration or neuroprotection? JOURNAL OF NEUROENDOCRINOLOGY 13:(9) pp. 749-760. (2001) IF: 2.580
- Horvath KM, **Ábrahám IM**, Harkany T, Meerlo P, Bohus BGJ, Nyakas Cs, Luiten PGM Postnatal treatment with ACTH-(4-9) analog ORG 2766 attenuates N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in rat nucleus basalis in adulthood. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY 405: pp. 33-42. (2000) IF: 2.236
- Harkany T, **Ábrahám I**, Kónya C, Nyakas C, Zarándi M, Penke B, Luiten PGM Mechanisms of B-amyloid neurotoxicity: perspectives of pharmacotherapy. REVIEWS IN THE NEUROSCIENCES 11: pp. 329-382. (2000) IF: 3.400

- Harkany T, Dijkstra IM, Oosterink BJ, Horvath KM, **Ábrahám I**, Keijser J, Van der Zee EA, Luiten PGM Increased amyloid precursor protein expression and serotonergic sprouting following excitotoxic lesion of the rat magnocellular nucleus basalis: neuroprotection by Ca²⁺ antagonist nimodipine. NEUROSCIENCE 101: pp. 101-114. (2000) IF: 3.563
- Ábrahám IM**, Kovács KJ Postnatal handling alters the activation of stress-related neuronal circuitries. EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE 12: pp. 3003-3014. (2000) IF: 3.862
- Harkany T, **Ábrahám I**, Laskay G, Timmerman W, Jost K, Zarándi M, Penke B, Nyakas Cs, Luiten PGM Propionyl-IIGL tetrapeptide antagonizes β -amyloid excitotoxicity in rat nucleus basalis. NEUROREPORT 10: pp. 1693-1698. (1999) IF: 2.682
- Harkany T, Mulder J, Sasvári M, **Ábrahám I**, Kónya C, Zarándi M, Penke B, Luiten PGM, Nyakas C N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 and radical scavengers protect cholinergic nucleus basalis neurons against β -amyloid neurotoxicity. NEUROBIOLOGY OF DISEASE 6: pp. 109-121. (1999) IF: 5.023

VII. Szcientometriai adatok (2012. augusztus)

Saját, megjelent cikkek száma nemzetközi folyóiratban: 35

Összes idézetek száma:1225

Független idézetek száma:1010

Összegzett impakt faktor:130,469

Az értekezéshez felhasznált cikkek össz impaktfaktora:74,783

Az értekezéshez felhasznált cikkekre kapott független hivatkozások száma: 529