

A tuberoinfundibularis peptid 39 és receptorának leírása kísérleti állatok és ember központi idegrendszerében

Doktori tézisek

Dr. Bagó Attila György

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Dobolyi Árpád, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Komoly Sámuel, egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Wenger Tibor, egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kamondi Anita, egyetemi tanár, Ph.D.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lövey József, főorvos, Ph.D.
Dr. Lukáts Ákos, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest
2012

1. Bevezetés

A 39 aminosavból álló tuberoinfundibularis peptid 39 (TIP39) nevű neuropeptid a parathormon (PTH) receptorral rokon szekvenciájú parathormon 2 receptor (PTH2 receptor) fiziológias liganduma. Míg a PTH2 receptor a központi idegrendszer számos területén, legkifejezettebben a hypothalamusban és az agytörzsben expresszálódik korábbi, alacsonyabb rendű emlősökön végzett vizsgálatok alapján, addig a TIP39-et expresszáló neuronok csak két helyen, a thalamus, illetve a rostralis pons egy-egy területén voltak megtalálhatók.

A thalamusban a TIP39 sejtek a thalamus hátsó, ventromedialis részén található subparafascicularis areaként (SPF) leírható terület két kompartmentjében, medialisan a periventricularis szürkeállományban (PVG) és a lateralisabban illetve caudalisabban az SPF parvicelullaris, a thalamus intralaminaris komplexumához tartozó területen helyezkednek el (PIL). Mindkét sejtcsoport afferenciája döntően a hypothalamus és limbikus rendszerből származik míg efferenciájuk különböző, a medialis magcsoport (SPF-PVG) inkább a limbikus rendszer, a lateralis magcsoport (SPF-PIL) inkább a hypothalamus felé vetül.

A másik TIP39 magcsoport a pontomesencephalicus átmenetben, a lemniscus lateralistól medialisan helyezkedik el. Itt a TIP39 sejtek egy morfológiailag is jól definiálható magot, a medialis paralemniscalis magot alkotják (MPL). A mag afferenciája a hallórendszer és hypothalamus felől származik, efferenciája a hallórendszert és a gerincvelőt célozza. A TIP39 expresszáló sejtcsoportok egymással is afferens-efferens neuronális kapcsolatban állnak.

A TIP39 sejtekkel ellentétben a PTH2 receptor széleskörű, kiterjedt subcorticalis kifejeződést mutat rágcsálókban, amint azt in situ hibridizációval, immunhisztokémiával és transzgen egértörzs felhasználásával végzett vizsgálatokban igazolták. A PTH2 receptor nagy mennyiségben expresszálódik a limbikus rendszerben, a hypothalamusban, a thalamus egyes területein, az agytörzsben és a gerincvelőben is. Patkányban a PTH2 receptort kifejező sejtestek immunhisztokémiailag jól festhetőek és megfelelnek az in situ hibridizációval talált lokalizációknak. Ezzel szemben egérben PTH2 receptor immunpozitív

sejteket immunfestéssel kimutatni nem tudtak, csak a PTH2 receptor immunpozitív rostokat, annak ellenére, hogy a PTH2 receptort kifejező neuronok jelenlétét egérben is igazolták in situ hibridizációval. A PTH2 receptor gén első exonja helyett β -galaktozidázt expresszáló egértörzsben (knockin mice) hisztokémiai úton végzett vizsgálatok is jól korreláltak az in situ hibridizációs hisztokémia eredményeivel. Hasonló jelenséget tapasztaltunk főemlősökön végzett vizsgálatainkban. Magyarázatot valószínűleg az egérben és főemlősökben jelen lévő gyors (a patkányénál gyorsabb) axonális transzport magyarázza, mely a perikaryonból a PTH2 receptor fehérjét a szintézis után gyorsan az axon vagy a dendritek felé továbbítja. A PTH2 receptort expresszáló rostok korábbi vizsgálatok alapján glutamátergnek bizonyultak.

Míg a PTH2 receptor az egész életen át folyamatosan expresszálódik az idegrendszerben, a TIP39 kifejeződése a serdülőkör után jeletősen lecsökken és csak különleges élettani körülmények között aktiválódik újra.

A TIP39-PTH2 receptor rendszer funkciójáról eddig keveset tudunk. Korábbi, rágcsálókön végzett vizsgálatok szerint a TIP39 hiányában (knock out egerekben) szorongásos, depressziós viselkedés minta alakul ki. TIP39 intrecerebroventricularis adásával a fájdalomtűrés növekedik, csökken a növekedési hormon (GH), emelkedik a cortocotropin releasing hormone (CRH) elválasztása. TIP39 sejtek mediálják az auditoros stresszre bekövetkező CRH választ, illetve legújabb eredmények szerint az SPFp-PIL és MPL területben levő TIP39 sejtek aktiválódása részt vesz a laktáció során az anyai adaptáció szabályozásában.

2. Célkitűzések

1.1. TIP39-et expresszáló neuronok vizsgálata patkányokban embrionális és postnatalis korban

Korábban rágcsálókban már vizsgálták a TIP39 immunpozitív neuronok fejlődését a postnatalis élet során. Mint a bevezetésben részleteztük, a vizsgálatok során azt találták, hogy a TIP39 neuronok mind a két ismert lokalizációban, a subparafascicularis areaban (SPF) és a mediális paralemniscalis magban (MPL), már az újszülöttekben jelen vannak. Ezután a TIP39 expresszió a születés utáni 14. napig (PND-14) fokozódik, majd a 33. naptól

(PND-33) fokozatosan csökken, és a 125. napon (PND-125) már kifejezetten alacsony (Dobolyi és mtsai 2006b). A nemi éréssel párhuzamosan elkezdődő csökkenés a hímelekben kifejezettebb, így idősebb állatok esetén a nőstényekben valamelyest több TIP39-et találunk, mint a hímelekben. A TIP39 az életkorral változó, átmeneti expressziója arra utal, hogy a TIP39 valamilyen specifikus funkcióval bírhat az ontogenezis és a reprodukciós folyamatok során. A célból, hogy a TIP39 neuronok életciklusát teljesen fel tudjuk térképezni, fontosnak találtuk a TIP39 expresszió vizsgálatának kiterjesztését az embrionális és a korai postnatalis életkorra, mivel ilyen vizsgálatok eddig még nem történtek.

Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

- 1) Mikor jelenik meg a TIP39 immunreaktivitás az egyedfejlődés során?
- 2) Különbözik-e a TIP39 immunreaktivitás az ismert TIP39 pozitív területekben (SPF, MPL)?
- 3) Vannak-e jelei a korai egyedfejlődés során a SPF-ben található TIP39 neuronok kompartmentalizációjának (SPF-PVG ill. SPF-PIL csoportokra)?
- 4) Van-e olyan, eddig még nem ismert TIP39-et kifejező terület, amelyet a postnatalis fejlődés során már nem találunk?

1.2. TIP39-PTH2 receptor rendszer kimutatása főemlős agyban

Annak ellenére, hogy a TIP39-PTH2 receptor rendszert részletesen feltérképezték egér és patkány agyban, főemlős (majom és humán) agyban vizsgálatok nem történtek. Eddigi ismereteink arra szorítkoztak, hogy a humán TIP39-et és PTH2 receptort kódoló gént klónozták, és azonosították a génjeiket a humán genomban.

Ahhoz, hogy későbbiekben a TIP39 esetleges humán fiziológiai vagy patofiziológiai jelentőségét megérthessük, fontosnak tartottuk a TIP39-PTH2 receptor rendszer feltérképezését főemlős (majom és emberi) agyban. Mivel irodalmi adatok alapján ismert, hogy a TIP39-PTH2R rendszer kiterjedt hypothalamicus reprezentációval rendelkezik, érdemesnek találtuk a hypothalamo-hypophysis tengellyel való anatómiai kapcsolatot, és az esetleges endokrin szabályozásában betöltött szerepének közelebbi vizsgálatát is. Korábbi adatok arra utaltak, hogy a TIP39 CRH-n keresztül serkenti az adenohypophysis ACTH

termelését, míg somatostatinon keresztül csökkenti a GH termelést, ezért vizsgálatainkban ennek a hatásnak a morfológiai hátterét is tisztázni kívántuk. Munkánk során az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

- 1) Kimutatható-e TIP39 expresszió főemlős agyban, és ha igen, akkor annak milyen az eloszlása?
- 2) Kimutatható-e PTH2 receptor expresszió főemlős agyban, és ha igen, akkor annak milyen az eloszlása?
- 3) Látunk-e különbséget a rágcsáló, majom és emberi agyban a TIP39-PTH2R rendszer tekintetében?
- 4) Igazolható-e a PTH2 receptor immunreaktív rostok glutamáterg transzmissziója főemlősökben is?
- 5) Kimutatható-e közvetlen anatómiai kapcsolat a TIP39-PTH2 receptor rendszer és a hypothalamo-hypophysis tengely között, elsősorban CRH és somatostatin termelés szabályozásában?
- 6) Korábbi irodalmi és saját adatok alapján mi lehet a TIP39-PTH2 receptor rendszer potenciális élettani szerepe?

3. Anyagok és módszerek

Minden patkányon végzett vizsgálatunkat a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanácsa által jóváhagyott, az Európai bizottság ide vonatkozó 1986. november 24-én kelt (86/609/EE) direktívájával és a National Institute of Health (NIH) kísérleti állatok gondozásáról és felhasználásáról szóló utasításaival összhangban lévő útmutatások alapján végeztük.

Minden majom szövet kivételi eljárás a National Institute of Mental Health (NIMH) kísérleti állatok gondozásával és felhasználásával foglalkozó bizottsága által jóváhagyott, az állatkísérletek végzéséről, valamint a kísérleti állatok gondozásáról és felhasználásáról rendelkező utasításokkal, és nemzetközi etikai irányelvekkel is összhangban levő kísérleti protokoll alapján történt.

A humán agymintákat az emberi szövetek orvosi kutatásokhoz való felhasználását szabályozó etikai kódexének (HM 34/1999) és a Helsinki Deklaráció etikai kódexének megfelelően gyűjtöttük. Az agymintákat a Semmelweis Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetében és a Pécsi Tudományegyetem Pathológiai Intézetében végzett szekciók során nyertük a Humán Agyszövet Bank program keretén belül, a Semmelweis Egyetem és a Pécsi Tudományegyetem etikai jóváhagyásával. A vizsgálatban használt humán agyszöveti minták kísérő dokumentációjából a vizsgálatok előtt minden személyes azonosítót töröltünk, a mintákat számkóddal láttuk el.

A vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében végeztük, majom vizsgálatok esetén az NIH-ben Dr. Ted Usdin munkacsoportjával kollaborációban.

Patkányok korai életkorában végzett vizsgálataink során a TIP39 kimutatására koncentráltunk, mivel erről korábbi irodalmi adatok nem álltak rendelkezésre. Itt jól bevált, korábban is közölt metodikákat alkalmaztunk (TIP39 immuncitokémia, TIP39 in situ hibridizáció). A munka másik vonala a PTH2 receptor kimutatását célozta főemlős agyban, melyről korábbi érdemi közlések nem álltak rendelkezésre. Humán és Rhesus majom agyon többfajta vizsgálati módszert is alkalmaztunk, melyek közül nem mindegyik működött megfelelően (például TIP39 immunfestés humán agyban), így ezek közlésre nem kerültek. A munkánk során alkalmazott és publikálható eredményeket hozó vizsgálati módszereket az alábbi táblázatban foglaltuk össze.

patkány	TIP 39	immuncitokémia
	TIP 39	kettős immunfestés (CGRP)
	TIP 39	in situ hibridizáció
majom	TIP 39	in situ hibridizáció
	PTH2R	immuncitokémia
	PTH2R	kettős immunfestés (VGLUT)
	PTH2R	in situ hibridizáció
humán	PTH2R	RT-PCR
	PTH2R	immuncitokémia
	PTH2R	kettős immunfestés (CRH, SS)

Mint korábban leírtuk, ellentétben a patkánnyal, sem humán sem eger mintákon nem sikerült PTH2 receptor pozitív sejtesteket immunhisztokémiai módszerrel festeni, hanem csak a

rosthálózat volt azonosítható. Ez feltehetően a gyors axonális transzport következménye lehet, ami a receptor fehérjét a szintézis után azonnal a terminálisok felé mozgatja. Éppen e homológia miatt választottuk a mapping során összehasonlításként az egeret és nem a patkányt. A rostok kimutatását immunhisztokémiai módszerekkel végeztük, míg a sejttesteket a PTH2 receptor mRNS kimutatásával térképeztük fel, így a főemlős és az egér agyból azonos metodikákkal nyert eredményeket hasonlítottuk össze.

A főemlős agyban PTH2 receptor mRNS kimutatását két módszerrel, humán mintákon RT-PCR-rel, majmokban in situ hibridizációval végeztük el. Humán mintákon is próbálkoztunk in situ hibridizációval, de ez feltehetően az RNS bomlása miatt nem volt értékelhető. Bár az RT-PCR humán minták egy 56 és egy 89 éves elhunytból származtak, míg a majom 3 napos volt, ismerve a PTH2 receptor expresszió életkortól és nemtől független voltát, a korrelációt lehetségesnek tartottuk. Az RT-PCR vizsgálatok előtt a tisztított RNS minőségét ellenőriztük, a vizsgálathoz azokat a mintákat használtuk fel, ahol a 28S rRNS mennyisége meghaladta a 18S rRNS-ét, így kizártuk az RNS lebomlásából eredendő álnegatív eseteket. Az RT-PCR reakció pozitív kontrolljaként a minden GAPDH primerpár hozzáadásával futtatott minta, negatív kontrollként RNS-t nem tartalmazó minta szolgált. A humán minták két agy különböző területeiből származtak, de 9 területet mindkét agyból megvizsgáltunk, ezek közül 6 esetben teljesen identikus eredményeket kaptunk, míg 3 esetben a két agyból nyert mintákban a PTH2 receptort jelző DNS csík intenzitásában különbözött. Ennek elsősorban metodikai okát látjuk: a mikrodisszekcióval nyert minták nem feltétlenül homogének, amint a PTH2 receptort expresszáló sejtek eloszlása sem homogén egy-egy vizsgált területen belül, amint ezt a majom in situ hibridizációs eredmények mutatják például a corpus geniculatum mediale vagy a hypothalamus területén.

Így összességében PTH2 receptort expresszáló sejtek tekintetében a humán és majom agy összehasonlítását két eltérő metodikával, RT-PCR és in situ hibridizációval nyert topográfiai adatok birtokában végeztük el, majd ezeket vetettük össze a korábban leírt egér adatokkal.

Mivel a TIP39 expresszió a thalamus SPFP-PIL területében rágszálókban születés után a legmagasabb, a TIP39 mRNS in situ hibridizációs vizsgálatokat a rendelkezésre álló 3 napos Rhesus majom agyon végeztük, ilyen fiatal humán minta nem volt. Ugyanezt a majom agyat használtuk a PTH2 receptor mRNS in situ hibridizációs hisztokémiával történő kimutatásához

is. A PTH2 receptor immunhisztokémiai kimutatásához egy 9 éves, más kísérletes célból túlaltatott majom agyát használtuk, de rácsálókon végzett vizsgálatokból tudjuk, hogy a PTH2 receptor expressziója az élet folyamán nem változik, így a különböző életkorú állatok ellenére az eredmények összevethetőek, ezzel minimalizálható volt a kísérletekben felhasznált majmok száma. Humán mintákon három különböző TIP39 ellenes antitestet teszteltünk, de az antitestek nem működtek, ellenben a PTH2 receptor immunfestés látványos eredményeket adott. Ezek összehasonlíthatóak voltak az egér PTH2 receptor immunfestés adataival.

4. Eredmények

4.1. A TIP39 expresszió megjelenése a korai életszakaszban patkányban

Korábbi vizsgálatok szerint a TIP39 neuronok mind a két ismert lokalizációban, a subparafascicularis areaban (SPF) és a mediális paralemniscalis magban (MPL) már az újszülöttekben is jelen vannak, majd a TIP39 expresszió a születés utáni 14. napig fokozódik, majd a 33. naptól, fokozatosan csökken, és a 125. napon már csak alig kimutatható. A nemi éréssel párhuzamosan elkezdődő csökkenés a hímekben kifejezettebb, így idősebb állatok esetén a nőstényekben valamelyest több TIP39-et találunk, mint a hímekben. Mivel a postnatalis szakaszban mindkét lokalizációban hasonló módon változott a TIP39 száma és festődési intenzitása, feltételeztük, hogy mindkét TIP39-et expresszáló terület hasonló, közös szabályozás alá esik .

Ezen feltételezésünkkel ellentétben az embrionális korban végzett vizsgálataink során a két terület között jelentős fejlődési különbséget találtunk. Míg a mediális paralemniscalis magban (MPL) már a 14,5. embrionális napon megjelenik a TIP39 expresszió, addig a subparafascicularis terület mediális részén (SPF-PVG) csak a 20,5. embrionális napon találtunk TIP39-immunpozitív sejteket.

Maga az SPF, amit projekciós különbségek alapján egy medialisabb paraventricularis (SPF-PVG) és egy caudo-lateralisabb, az SPF parvicelullaris, a thalamus intralaminaris komplexumához tartozó területére osztunk (SPFp-PIL) sem egységesen fejlődik az embrionális életben. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a PIL területén már a 14,5.

naptól jelen vannak a TIP39 sejtek, a legintenzívebb TIP39 expresszió az egész élet során az embrionális 16,5. napon észlelhető, ettől kezdve az PIL területi TIP39 expresszió folyamatosan csökken, és az 5. postnatalis napra eléri a kifejlett egyedekben található nagyon alacsony szintet. Ezzel szemben a medialis területen (SPF-PVG) csak később a 20,5. naptól jelenik meg az expresszió, ami az 5. postnatalis napig folyamatos növekedést mutat. Mindez a fejlődéstani különbség alátámasztja azt az elképzelést, hogy két, különböző neuronális összeköttetésekkel, eltérő fejlődéstannal és szabályozással rendelkező magcsoportról van szó.

A 16,5. embrionális napon vizsgált embriókban TIP39 pozitív neuronok megjelenését észleltük az amygdala-hippocampus átmeneti zóna területén. Ezek a neuronok a postnatalis élet korai szakaszában eltűnnek, kifejlett állatokban nem kimutathatóak.

Az embrionális és korai postnatalis vizsgálatok során talált legfontosabb tény a TIP39 expresszió tranziens megjelenése volt. Két esetben látjuk a TIP39 expressziójának átmeneti fokozódását: 1. Az pSPF-PIL területben a korai embrionális életben jelenik meg kifejezett expresszió, mely jelentős csökkenést mutat már a korai postnatalis életben 2. Az embrionális életben tranziens expresszió jelenik meg az amygdalo-hippocampalis átmenetben, mely a születés után hamarosan eltűnik. A tranziens expresszió, mely a mind a TIP39 neuronokat, mind a rosthálózatot érinti, mindenképpen felveti a TIP39 ontogenezisben betöltött szerepét, melynek anatómiai bizonyítékául szolgálhatnak eredményeink. Valójában nem tudjuk, hogy maguk a TIP39 neuronok degenerálódnak, vagy esetleg migrálnak (akár a PIL-ből medialis felé, az SPF-PVG területbe), vagy csak TIP39 expresszió szűnik meg a sejtekben. A TIP39 neuronok elhelyezkedése és intenzív kapcsolata a hypothalamusszal, valamint az élet folyamán észlelt változó mértékű expresszió mindenképpen felvetik a peptid reprodukciós és szexuális viselkedést meghatározó folyamatokban való részvételét.

4.2. A TIP39 és a PTH2 receptor expressziója főemlős agyban

4.2.1. TIP39-et expresszáló sejtek majom agyban.

A TIP39-et expresszáló sejtek kimutatását in situ hibridizációval végeztük el 3 napos majom agyon. Majomban a TIP39 a rágcsálókban leírt két ismert lokalizációban fordult elő: a thalamusban, a subparafascicularis area medialis, illetve caudolateralis részében, a korábban

részletezett SPF-PVG, illetve SPFP-PIL területekben, továbbá a ponsban a medialis paralemniscalis magnak megfelelően (MPL). Humán agyban a TIP39 mRNS-t nem tudtunk kimutatni, ennek háttérében két tényező játszhat szerepet: 1. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a TIP39 expressziója a postnatalis élet során gyorsan csökken, az csak speciális élettani körülmények között, például laktáció alatt aktiválódik újra. Az mRNS vizsgálatokhoz rendelkezésre álló humán minták idős agyakból származtak. 2. A mikrodisszekcióval nyert minták között nem volt olyan, mely a specifikusan TIP39 sejteket tartalmazó területek valamelyikéből származott volna. Figyelembe véve a tényt, hogy a PTH2 receptort expresszáló sejtestek és rostok tekintetében rendkívüli homológia észlelhető a rágcsálók és a humán illetve nem-humán főemlősök agyában, feltételezzük, hogy a TIP39 eloszlása emberben is megegyező a majomban vagy rágcsálókban találtakkal.

4.2.2. PTH2 receptort expresszáló sejtek humán és majom agyban

A PTH2 receptor expressziót humán mintákban RT-PCR technikával, míg majomban in situ hibridizációs hisztokémiával mutattuk ki. PTH2 receptor mRNS expressziót számos helyen igazoltunk a központi idegrendszerben. A hemisphaeriumokban a kéregben, illetve kifejezettebben a septum pellucidumban láttunk PTH2 receptor expressziót humán agyban. Míg az amygdala területén humán RT-PCR vizsgálatokkal csak közepes mértékű expressziót találtunk, addig majmokban in situ hibridizációval kifejezett expressziót találtunk elsősorban a centrális és a medialis magban. A különbséget valószínűleg a micropunch technikával nyert nagyobb minta okozta, így PTH2 receptort kevésbé termelő amygdala részek (basalis és lateralis mag) is a PCR mintába kerültek.

A diencephalonban és az agytörzsben mindkét technikával magas expressziót találtunk a medialis hypothalamusban, a corpus geniculatum medialeban, és híd tegmentumában, míg egyik módszerrel sem találtunk expressziót a thalamus ventralis, mediodorsalis magvaiban, sem a pulvinarban. Alacsony expressziót találtunk a corpus geniculatum lateraleban, a nucleus subthalamicusban és a ventralis tegmentalis areában és a híd formatio reticularisában, míg a substantia nigra, vagy a nucleus ruber területében a középagyban egyik technikával sem volt igazolható PTH2 receptor kifejeződés. Összességében a humán RT-PCR és a majom in situ hibridizációs eredmények szinkronban vannak, csak egy lokalizációban találtunk markáns különbséget. Ez a praetectalis area, ahol emberben RT-PCR-rel magas expressziót mértünk, míg majomban in situ hibridizációval nem találtunk

PTH2 receptor mRNS-t. A különbség származhat abból, hogy más életkorú agyaktól származtak a minták, de a kifejezett homológia ellenére létezhetnek főemlős fajok közötti különbségek, mint azt más neuropeptideknél is leírták.

4.2.3. PTH2 receptor mRNS expresszió összehasonlítása rágcsáló és főemlős agyban

A RT-PCR technikával kapott eredményeink szerint a PTH2 receptor expressziója nagy hasonlóságot mutat az egérben leírtakkal. Magas PTH2 receptor expressziót találtunk a septumban, a nucleus caudatusban, a corpus geniculatum medialeban, a hypothalamusban, a pons tegmentumában és a cerebellumban, míg alacsony expressziót igazoltunk a cortexben, a hippocampusban, az amygdalában, a corpus geniculatum lateraleban, a ventralis tegmentalis areaban, a pons formatio reticularisban, a dorsal vagal complexben, a nucleus spinalis trigeminiben. Nem fejeződik ki PTH2 receptor a legtöbb thalamus magban, a nucleus suprachiasmaticusban, a corpus mamillareban, a substantia nigrában, a nucleus ruberben és az agytörzs motoros agyideg magjaiban. Mindezek nagyon jó egyezést mutatnak az egérben talált PTH2 receptor mRNS eloszlásával. In situ hibridizációval egyes területek részletesebb feltérképezésére is lehetőség nyílt. Ezek alapján még szubregionális szinten is nagyon jó egyezést találtunk majom és egér agy között, például a hypothalamusban, vagy a corpus geniculatum medialeban. Összesen két területen, a lateralis hypothalamus ventralis részén és a nucleus paraventricularisban találtunk különbséget. Ezekben a régiókban majomban jól definiált, PTH2 receptort kifejező sejtsoportot találtunk, míg egérben csak egy-egy elszórt sejt található, ez megfelelhet fajok közötti expressziós különbségnek.

4.2.4. PTH2 receptor immunreaktivitás – rostok és terminálisok a főemlős agyban

Eredményeink szerint az emberben a sejttestek nem mutatnak PTH2 receptor immunfestődést – feltehetően a gyors axonális transzport következtében –, ezért a PTH2 receptor immunreaktivitás csak PTH2 receptor expresszáló sejtek axonhálózatát demonstrálja. Humán agyban sűrű PTH2 receptor immunreaktív rosthálózatot találtunk az endokrin hypothalamusban, a mediális preopticus areaban, a nucleus paraventricularisban, a nucleus arcuatusban és az eminentia mediana területén. Kifejezett immunfestődés találtunk a septumban, a thalamus nucleus paraventricularisában és a periaqueductalis szürkeállományban. PTH2 receptor pozitív rostokat találtunk még egyéb, elsősorban somatosensoros és viscerosensoros érzékelésben résztvevő struktúrákban, mint a gerincvelő hátsó szarva, a trigeminus sensoros magvai, a nucleus tractus solitarii és lateralis

parabrachialis mag. Majom agyban csak a hypothalamus területét vizsgáltuk immuncitokémiával, az eredmények teljes egyezést mutattak a humán mintákban találtakkal. A humán vizsgálatokat döntően a diencephalonból és agytörzsből származó mintákon végeztük, ezeket az eredményeket összevetve az egérből származó PTH2 receptor immunfestés eredményeivel szinte teljes egyezést találtunk.

4.2.5. A TIP39 feltételezett hatásmechanizmusa a hypothalamus-hypophysis rendszerben

Patkányban korábban leírták a PTH2 receptor rostok glutaminerg természetét. Majom hypothalamusban kettős immunfestéssel végzett vizsgálatainkban a septumban és a hypothalamusban nagyon sűrű VGLUT-2 immunreaktív hálózatot találtunk, ezek egy része PTH2 receptorra is pozitívnak bizonyult, viszont gyakorlatilag az összes PTH2 receptor immunreaktív terminális is festődött VGLUT-2-re. A szoros kolokalizáció alapján arra következtetünk, hogy a septum, a hypothalamus és feltételezhetően egyéb területekben lévő PTH2 receptor terminálisok – a rágcsálókban leírtakhoz hasonlóan – glutamátergek.

Humán hypothalamusban kettős immunfestést végeztünk PTH2 receptor és somatostatin vagy corticotropin releasing hormone (CRH) ellenes antitestekkel. A somatostatint termelő sejtek a nucleus periventricularisban foglalnak helyet, innen vetülnek az eminentia mediana felé, ahol a somatostatin felszabadul, majd a portális keringésen át a hypophysisbe jut és a növekedési hormont termelő sejteken hat. Az eminentia medianan található somatostatint tartalmazó terminálisok egy része a PTH2 receptor receptorral kolokalizált, mely arra enged következtetni, hogy a TIP39 a PTH2 receptoron keresztül serkenti a somatostatin felszabadulását, és így közvetve a növekedési hormon szint csökkenését okozza.

A somatostatin szabályozással szemben más hatásmechanizmust feltételezünk a CRH esetében. CRH immunfestés esetén nem láttunk kolokalizációt PTH2 receptorokkal, viszont a PTH2 receptor pozitív terminálisok nagyon megközelítették a CRH pozitív neuronokat. Bár a CRH pozitív sejtestek nem tartalmazzák a PTH2 receptort, viszont számos serkentő glutamáterg szinapszis vesz részt ezen neuronok szabályozásában, és ezen szinapszisok egy része PTH2 receptor pozitivitás mutat, így azt feltételezzük, hogy a TIP39 ezeken a szinapszisosokon keresztül serkenti a CRH szekréciót, amint azt korábban hypothalamus szöveten in vitro igazolták.

Vizsgálataink anatómiai magyarázatot adhatnak a TIP39- PTH2 receptor neuromodulátor rendszer hypothalamo-hypophysis rendszeren korábban leírt hatásaira. Mindkét előbb ismertetett hatásmechanizmus preszinaptikus modulációt feltételez, mely a somatostatin esetében közvetlenül segíti a hormon felszabadulást a terminálison, míg a CRH esetében magának a CRH sejttest excitátoros ingerlésének facilitálása során vezet a hormonelválasztás fokozásához. A preszinaptikus moduláció elméletét alátámasztják azok a tények is, hogy a PTH2 receptor gyorsan transzportálódik az axon terminálisok felé, valamint, hogy a TIP39 pozitív és a PTH2 receptor pozitív axon terminális szubregionális eloszlása jelentős mértékű egyezést mutat.

4.3. Összegzés

Elsőként mutattuk ki az embrionális életben a TIP39 átmeneti expresszióját az amygdalában, mely mindenképpen felveti a peptid ontogenezisben, majd később a reprodukciós folyamatokban való szerepét, melyet irodalmi adatok is alátámasztanak. Igazoltuk, hogy a thalamomesencephalis átmenetben, az SPF-ben talált TIP39 sejtek már az embrionális élet során két különböző magcsoportra oszlanak, így ezek anatómiai és funkcionális megkülönböztetése is indokolt.

Főemlős agyszöveten végzett vizsgálatainkban elsőként igazoltuk a TIP39-PTH2 receptor neuromodulátor rendszer jelenlétét humán és majom központi idegrendszerében, mind a PTH2 receptor és a TIP39 mRNS kimutatásával, mind a PTH2 receptor immunreaktivitás feltérképezésével. A főemlősökben talált anatómiai eloszlás nagyfokú hasonlóságot mutat a korábban rágcsálókban végzett vizsgálatokban találttal, mely arra enged következtetni, hogy a TIP39-PTH2 receptor rendszer az emberi idegrendszerben is az endokrin, reprodukzív, viscerosensoros funkciókban vehet részt. Hypothalamuson végzett vizsgálataink alapján feltételezzük, hogy a TIP39- PTH2 receptor neuropeptid rendszer preszinaptikus moduláció segítségével fejt ki hatását a hypothalamus-hypophysis működésének szabályozásakor.

5. Következtetések

- a. A TIP39 expressziója patkányokban az embrionális élet 14. napján kezdődik, elsősorban a ponsban a mediális paralemniscalis mag (MPL) és thalamusban a subparafascicularis area (SPF), valamint temporomedialisán az amygdalo-

- hippocampalis átmenet területében. Az amygdalában elsőként igazoltuk TIP39 tranziens expresszióját, mely itt csak az embrionális élet során volt kimutatható.
- b. A subparafascicularis areaban észlelt korai TIP39 expresszió elsősorban a caudo-lateralis, kissejtes (SPFp-PIL) területben jelentkezik, míg a medialis területekben (SPF-PVG), csak később az embrionális élet 20. napjától jelenik meg. Az SPF-PVG területben jelentkező TIP39 expresszió a postnatalis élet folyamán perzisztál, míg a SPFp-PIL TIP39 expressziója a születés után jelentősen lecsökken, és kutatócsoportunk további eredményei alapján csak speciális körülmények között (pl. laktáció) aktiválódik újra. Ez a fejlődéstani különbség mindenképpen indokoltá teszi a két magcsoport anatómiai és funkcionális elkülönítését, melyet korábban projekciós és funkcionális vizsgálatok is alátámasztottak.
 - c. Elsőként igazoltuk TIP39 és a PTH2 receptor jelenlétét humán és Rhesus majom központi idegrendszerében. TIP39 sejtek a primata agyban is három területen: a thalamus subparafascicularis területének PIL és PVG magcsoportjaiban, valamint a ponsban a MPL-ben helyezkednek el, míg a PTH2 receptor expresszió legkifejezettebb a septumban, a nucleus caudatusban, a corpus geniculatum medialeban, a hypothalamusban, a pons tegmentumában és a cerebellumban.
 - d. A részletes anatómiai térképezés során kifejezett homológiát találtunk a főemlős (humán és Rhesus majom) és rágcsáló (egér) agy PTH2 receptor expressziós mintázatában, még szubregionális szinten is.
 - e. Igazoltuk a PTH2 receptor immunreaktív rostok glutamáterg természetét főemlős hypothalamusban.
 - f. Humán hypothalamus CRH és szomatostatin termelő sejtjein végzett vizsgálataink alapján feltételezzük, hogy a TIP39 neuropeptidként a PTH2 receptoron keresztül preszinaptikus moduláció formájában módosítja a CRH és szomatostatin szekréció mértékét, ez képezheti a korábban már elírt, a TIP39 hatására bekövetkező hormonális válaszok morfológiai alapját.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. Az értekezés témájában megjelent publikációk

1. Varga T, Mogyoródi B, **Bagó AG**, Cservenák M, Domokos D, Renner É, Gallatz K, Usdin TB, Palkovits M, Dobolyi A: Paralemniscal TIP39 is induced in rat dams and may participate in maternal functions. *Brain Struct Funct* 217(2):323-325, 2012, IF: 4,982
2. **Bagó AG**, Dimitrov E, Saunders R, Seress L, Palkovits M, Usdin TB, Dobolyi A.: Parathyroid hormone 2 receptor and its endogenous ligand tuberoinfundibular peptide of 39 residues are concentrated in endocrine, viscerosensory and auditory brain regions in macaque and human. *Neuroscience* 162(1):128-47, 2009, IF: 3,292
3. **Brenner D***, **Bagó AG***, Gallatz K, Palkovits M, Usdin TB, Dobolyi A: Tuberoinfundibular peptide of 39 residues in the embryonic and early postnatal rat brain, *J. Chem. Neuroanat.* 36(1):59-68, 2008, IF: 2,12, *The first two authors contributed to the manuscript equally.
4. **Bagó AG**, Palkovits M, Usdin TB, Seress L, Dobolyi A: Evidence for the expression of parathyroid hormone 2 receptor in the human brainstem. *Ideggyogy. Sz./Clin. Neurosci.* 61(3-4):123-6, 2008

6.2. Az értekezés témájában készített idézhető absztraktok

1. **Bagó A**, Dobolyi Á, Dimitrov E, Saunders R, Seress L, Palkovits M, Usdin TB: A parathormon-2-receptor (PTH2R) és ligandjának (TIP39) kimutatása emberi és majom agyban. A Magyar Anatómus Társaság 15. Kongresszusa, Parathyroid hormone 2 receptor and its endogenous ligand TIP39 in the brain of macaque and human. 15th Conference of Hungarian Society of Anatomists, Budapest, Hungary, 2009

2. Dobolyi Á, **Bagó AG**, Seress L, Usdin TB, Palkovits M: Parathyroid hormone 2 receptor in the human brain – a combined RT-PCR and fluorescent amplification immunocytochemistry study. BrainNet Europe 2nd International Conference on Human Brain Tissue Research, J. Neural Transm. 115(12), 1730., Munich, Germany, 2008

6.3. Egyéb, az értekezéshez fel nem használt publikációk

1. Erőss L, **Bagó AG**, Entz L, Fabó D, Halász P, Balogh A, Fedorcsák I: Neuronavigation and fluoroscopy assisted subdural strip electrode positioning – a simple method to increase intraoperative accuracy of strip localization in epilepsy surgery. J. Neurosurg. 110(2):327-31, 2009, IF:1,99
2. Palkovits M, Harvey-White J, Liu J, Kovacs ZS, Bobest M, Lovas G, **Bagó AG**, Kunos G: Regional distribution and effects of postmortal delay on endocannabinoid content of the human brain, Neuroscience 152(4):1032-9, 2008, IF:3,35
3. **Bagó A**: Felnőttkori agydaganatok műtéti kezelése. Háziorvos Továbbképző Szemle 11: 838-846, 2006
4. Hunt MA, **Bagó AG**, Neuwelt EA: Single-dose contrast agent for intraoperative MR imaging of intrinsic brain tumors by using Ferumoxtran-10. Am. J. Neurorad. 26: 1084-1088, 2005, IF:2,53
5. Neuwelt EA, Varallyay P, **Bagó AG**, Muldoon LL, Nesbit G, Nixon R: Imaging of iron oxide nanoparticles by MR and light microscopy in patients with malignant brain tumours. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 30(5):456-71, 2004, IF: 3,40
6. Veres R, **Bagó A**, Fedorcsak I: Early experiences with image-guided transoral surgery for the pathologies of the upper cervical spine. Spine 26(12):1385-8, 2001, IF: 1,85

7. Bognár L, **Bagó A**, Orbay P, Gyorsok Zs, Berény E, Kónya E, Lázár E.: Chiari I malformation, a “new” childhood disease? *Orv. Hetil.* 141(11):567-571, 2000
8. Bognár, L., **Bagó A.**, Nyáry, I.: Neuronavigation in the Paediatric Neurosurgery *Orv. Hetil.* 141(7):343-346, 2000
9. **Bagó A**, Fedorcsák I, Nyáry I: Neuronavigation and its role in the modern neurosurgery. Description of the methods, and the first experiences in Hungary. *Clin. Neurosci./Ideggy. Szle.* 53(1-2):20-27, 1999
10. **Bagó A**, Fedorcsák I, Nyáry I: Early experiences with BrainLAB neuronavigation system in the surgery of supratentorial lesions. *Comput Aided Surg, Special Issue for the 1st International Congress on Computer Integrated Surgery in the Areas of Head and Spine, Linz, Austria, 1997*
11. Hunyady L, Rohács T, **Bagó A**, Deák F, Spät A: Dihydropyridine-sensitive initial component of the ANG II-induced Ca²⁺ response in rat adrenal glomerulosa cells. *Am. J. Physiol.* 266:C67-C72, 1994, IF: 3,28
12. Rohács T, **Bagó A**, Deák F, Hunyadi L, Spät A: Capacitative Ca²⁺ influx in adrenal glomerulosa cells: possible role in angiotensin II response. *Am. J. Physiol.* 267:C1246-1252, 1994, IF: 3,28
13. Hajnóczky G, Csordás G, **Bagó A**, Chiu AT, Spät A: Angiotensin II exerts its effect on aldosterone production and potassium permeability through receptor subtype AT1 in rat adrenal glomerulosa cells. *Biochem. Pharmacol.* 43(5):1009-12, 1992, IF: 2,22

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Dobolyi Árpádnak azt a sok baráti segítséget és türelmet, amivel egy állandóan rohanásban lévő idegsebészt bevezetett a neuromorfológiai alap kutatás világába, és rendíthetetlenül hitt abban, hogy ez a dolgozat egyszer valóban elkészül. Köszönöm laborvezetőmnek, Dr. Palkovits Miklós professzor úrnak, hogy lehetővé tette számomra külsősként a munkacsoporthoz való csatlakozást és hogy mindvégig figyelemmel kísérte munkám elkészültét. Köszönettel tartozom a Neuromorfológiai Laboratórium minden dolgozójának, akiknek segítségével ez a munka nem készülhetett volna el. Köszönöm Dr. Csillag András professzor úrnak, hogy támogatta az Intézetben végzett tudományos munkámat.

Köszönet illeti Dr. Spät András professzor urat és Dr. Hajnóczky Györgyöt, az Élettani Intézetben egykori TDK-s vezetőimet, akiknek az alap kutatással való első ismerkedésemet köszönhettem.

Baráti köszönettel tartozom Dr. Fedorcsák Imrének, főnökömnek, aki mellett a hosszú évek idegsebész-onkológussá válhattam és Ph.D. munkámat kezdetektől támogatta. Köszönettel tartozom dr. Vajda Jánosnak, dr. Czirják Sándornak, akik sok türelemmel tanítottak a bázis sebészet és vascularis idegsebészet alapjaira. Köszönet illeti Dr. Nyáry István professzor urat, aki alatt idegsebészeti tanulmányaimat megkezdhettem Köszönettel tartozom közvetlen kollegáimnak az egykori B osztályon, Dr. Eröss Lorándnak és Dr. Elor Guynak, valamint minden idegsebész kollegámnak az Amerikai úton, idősebbeknek, akiktől tanulhattam, kortársaimnak és a fiataloknak, akik a mindennapi munkában támogattak. Köszönettel tartozom Sztanó Emiliának, akivel évek óta osztozom a neuroonkológiai beteggondozás örömeiben és terheiben, illetve Király Katalin főnövének a több mint egy évtizede tartó közös munkáért. Az ő biztos hátterük nélkül nem nyílt volna lehetőség külső kutatómunkára.

Végül, legfontosabbként, köszönettel tartozom szüleimnek, testvéreimnek, de elsősorban családomnak, feleségemnek Annának, fiainknak Andrásnak, Máténak, Mártonnak és Ádámnak, hogy türelemmel és derűvel vártak és várnak haza minden nap, és ezzel is segítették a munkám befejezését.