

## OTKA 81522 témapályázat részletes zárójelentése.

Dr. Nagy M. György

2013.

A hypophysis elülső lebeny prolaktin sejtjeinek intracelluláris jelátviteli mechanizmusait vizsgálva, megállapítottuk, hogy hím állatokban a dopamine (DA) megvonás (haloperidol, raclopride,  $\alpha$ MpT) hatására a hypophysis elülső lebenyében a pAkt (Thr308-on) és pERK szintje jelentősen megemelkedik. Laktáló állatokban szopási stimulus hatására az Akt és ERK foszforilációja ugyancsak jelentősen fokozódik. Ovariectomizált (OVX) nőstény állatokban haloperidol kezelés fokozza az Akt foszforilációját a (Thr308-on) mind a hypophysis elülső- mind a köztilebenyében. Igazoltuk, hogy az ERK foszforiláció feltehetőleg szerepet játszik a laktáció során bekövetkező hipofizeális hormonválaszokban, de a prolaktin elválasztás szabályozásában közvetlenül nem vesz részt. A norepinephrin transzporter (NET),  $\beta$ -arrestin és GSK3 immunhisztokémiai (IHC) kimutathatósága a hypothalamo-hypophysealis rendszerben alátámasztja azt, hogy a D2-es típusú DA receptorhoz kapcsolt ún.  $\beta$ -arrestin-függő jelátviteli mechanizmus szerepet játszik a hypophysisben egyes fiziológiás (szoptatás), továbbá bizonyos farmakológiás kezeléseket követően (pl. D2 receptor antagonist, mint haloperidol, raclopride) és patológiás állapotokban (mint pl. hypophysis adenoma), ahol a megváltozott D2 receptor érzékenység hátterében a jelátvivő mechanizmusokban történt változás ill. váltás valószínűsíthető. Az amphetamine (AMPH) előkezelés, mely nagymértékben fokozza a DA ürítését a DAerg neuronok terminálisaiból, csökkentette a szopási inger hatására bekövetkező plazma prolaktin szint emelkedést. Ezzel párhuzamosan a szopási inger hatására bekövetkező hypophysealis Akt foszforilációt teljesen kivédte. Ez a megfigyelés ugyancsak arra utal, hogy a prolaktin elválasztás DAerg tónusos gátlásáért, legalább is részben, egy  $\beta$ -arrestin-függő jelátviteli mechanizmus is felelős. (Márk Oláh, Ibolya Bodnár, Zsuzsanna Szepesi, Pálma Fehér, Miklós Vecsernyés, György M. Nagy: Tonic dopamine (DA) inhibition of pituitary prolactin (PRL) secretion is due to a  $\beta$ -arrestin- dependent and cAMP-independent signaling mediated by D2 DA receptors. Kézirat elküldve, 2013.)

Az ún. „arrestin-függő szignálszóm” (arrestin/Akt/PP2A) létrejöttét megakadályozandó intracerebro-ventriculáris (icv) okadánsav (PP2A gátló) beadását követően emelkedik a plazma prolaktin szint, továbbá a haloperidol (D2-receptor gátló) kezelésre bekövetkező prolaktin szint emelkedése csökken. Vizsgálataink során, amikor arra kerestünk választ, hogy milyen egyéb fiziológiás állapotban játszhat még szerepet az arrestin-függő (G fehérjétől független) jelátviteli a prolaktin elválasztás szabályozásában

megállapítottuk, hogy ovariectomizált állatokban a két hetes ösztrogénkezelés szétkapcsolja az arrestin-függő jelátvivő útvonalat. Ezen kísérleti eredményeink arra utalnak, hogy az ösztrogén hatása részben membránhoz kötött receptorok kölcsönhatása (cross-talk) révén (D2 receptor és membránhoz kötött ösztrogén receptor között) valósul meg. Ezt a feltételezést további kísérletekkel kell még igazolni. Megvizsgáltuk azt is, hogy az általunk korábban leírt prolactin releasing factor (PRF), a salsolinol miként befolyásolja az Akt foszforilációt, azaz jelátvivő mechanizmusként az arrestin-függő vagy a G-fehérje-függő mechanizmust használja-e. Megállapítottuk, hogy a salsolinol fokozza az Akt foszforilációt, azaz a DA mediálta arrestin függő tónusos prolaktin gátlást kapcsolja szét. Ennek a megfigyelésnek azért van különös jelentősége, mivel fiziológias körülmények között (mint laktáció idején, vagy különböző stressz helyzetekben) a prolaktin szint emelkedése a salsolinol emelkedett szintjének köszönhető (Oláh M, Bodnár I; Galit D, Tóth EB, Vecsernyés M, Nagy GM. *Role of Salsolinol in the Regulation of Pituitary Prolactin and Peripheral Dopamine Release. Reproductive Medicine and Biology* 10(3):143-151. 2011).

***Eredményeik egyértelműen alátámasztják a pályázat kutatási koncepciójában megfogalmazott feltételezésünket, hogy az un. arrestin-függő (G-fehérje független) jelátvivő út fiziológias körülmények között alapvető jelentőséggel bír a hypophysis prolaktin elválasztásának tónusos hypothalamikus gátló szabályozásában*** (Viktória Reinthoffer, Márk Oláh, Miklós Vecsernyés, Béla E. Tóth and György M. Nagy: *The Regulation of Pituitary Prolactin Secretion: Hypothalamic, Intrapituitary and Intracellular Factors and Signaling Mechanisms, Chapter 10, Prolactin. Edited by György M. Nagy and Bela E. Toth, ISBN 978-953-51-0943-3, Hard cover, 230 pages, Publisher: InTech, Published in January 23, 2013*).

A reverse hemolytikus plaque assay módszerének segítségével megállapítottuk, hogy az arrestin knock-out hím egerek elülső lebenyében a mammotrop sejtek száma szignifikánsan magasabb mint a vad típusú egerekben. Ezzel párhuzamosan megvizsgáltuk azt is, hogy különbözik-e az arrestin hiányos egerekben a DA kezelésre bekövetkező hormon válasz. A DA gátló hatása mind a sejtszám mind az átlagosan ürített hormon vonatkozásában arrestin knock-out állatokban csökkent mértékű. Ez a kísérleti eredmény arra utal, hogy az arrestin hiányában mind a mammotrop proliferáció mind a prolaktin ürítés gátlása zavart szenved. A proliferáció fokozott és a DA-nal való gátlhatóság csökkent mértékű. Ezek az eredmények további megerősítést jelentenek ahhoz, hogy az arrestin függő jelátvivő mechanizmus szerepet játszik a prolaktin elválasztás DAerg gátlásában. Ami a deszenzitizáció (arrestin) hiányában várható prolactin elválasztást serkentő faktorokkal kapcsolatos érzékenyítést (szenzitizációt)

illeti, megállapítottuk, hogy az angiotensin prolactin ürítést serkentő hatása arrestin knock-out egerekben csökkent mértékű (*Közlésre előkészítés alatt*).

A hipofízis elülső lebenyi metszeteiken a  $\beta$ -arrestin és GSK3 immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatok során, kontrollként tyrosin hydroxylase (TH) ill. phospho-TH (p-TH) immunfestéseket is készítettünk. Ezen vizsgálatok kapcsán a hypophysis közti-hátsó lebenyében történő TH immunoreaktív rostok kimutatása mellett, nagyon jellegzetes megoszlásban TH/p-TH immunoreaktív sejteket is találtunk egerek (CD1) hypophysisének elülső lebenyében. Ez merőben új megvilágításba helyezi az egér hypophysis elülső lebenyének működéséről vallott eddigi felfogásunkat. A p-TH kimutathatósága arra utal, hogy az enzim aktív (azaz phosphorylált) formája is jelen van elülső lebenyi mirigy sejtekben. TH in situ hybridizációval sikerült igazolni, hogy a TH immunpozitív sejtekben a TH mRNA is jelen van. Még meglepőbb volt az a további megfigyelés, hogy PCR segítségével a DA-NE átalakulásban szerepet játszó enzim, a DA-béta-hydroxylase (DBH) is kimutatható az elülső lebenyben. Ez arra utal, hogy a szintézis DA-nál nem áll le, hanem NE is keletkezhet. Ezen eredmények tükrében a NE transzporter (NET) immunfestés különös jelentőséget nyert, mely vizsgálatok pozitív eredménnyel zárultak. (*A fenti megfigyeléseket tartalmazó kézirat közlése előkészületben van, 2013*). A hypophysis elülső lebenyének immunhisztokémiai vizsgálata során mind a vad típus mind az arrestin knock-out állatokba, a CD1 típusú egerekhez hasonlóan, TH-t termelő sejteket találtunk. A TH pozitív elülső lebenyi sejtek jórésze p-TH antitestel is kimutatható. Ezek száma szignifikánsan magasabb az arrestin knock-out állatokban mint a vad típusú egerekben, ami felveti egy „**intrahypophysealis kompenzatórikus DAerg szabályozó mechanizmus**” **jelenlétét**. Időközben a fentiekben leírtak jelentőségét az a megfigyelésünk is alátámasztotta, miszerint a szopási inger hatására bekövetkező prolactin válasz a TH ill. p-TH normál működéséhez kötött. (*Fehér P, Oláh M, Bodnár I, Hechtl D, Bácskay I, Juhász B, Nagy GM, Vecsernyés M. Dephosphorylation/inactivation of tyrosine hydroxylase at the median eminence of the hypothalamus is required for suckling-induced prolactin and adrenocorticotrop hormone responses. Brain Res Bull. 29;82(1-2):141-5, 2010*).

Egy Japán munkacsoporttal kollaborációban számos állatmodelben, így tehénben, juhban és disznóban is kimutattuk, hogy a salsolinol, mely képes a D2 receptor arrestin függő jelátviteli útját szétkapcsolni, prolactin ürítő hatása, mind *in vivo* mind *in vitro* körülmények között, a thyrotropin-releasing hormon (TRH) prolactin ürítő hatásától független mechanizmus révén jön létre. Megállapítottuk továbbá, hogy a patkányokban leírtakhoz hasonlóan, a salsolinol plazma prolactin szint emelő hatását a DA előkezelés teljes mértékben kivédi. (*Hashizume T, Sawada T, Yaegashi T, Saito H, Ezzat Ahmed A, Goto Y, Nakajima Y, Jin J, Kasuya E,*

Nagy GM. Characteristics of prolactin-releasing response to salsolinol in vivo in cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 39(1):21-5, 2010.; Yaegashi T, Jin J, Sawada T, Saito H, Fülöp F, Nagy GM, Hashizume T. Effects of photoperiod on salsolinol-induced prolactin secretion in goats. *Anim Sci J.* 83(5):418-25, 2012.; Hashizume T, Sawada T, Nakajima Y, Yaegashi T, Saito H, Goto Y, Jin J, Fülöp F, Nagy GM. Bromocriptine inhibits salsolinol-induced prolactin release in male goats. *Anim Sci J.* 83(1):63-7, 2012.; Hashizume T, Yaegashi T, Jin J, Sawai K, Fülöp F, Nagy GM. Effects of melatonin on salsolinol-induced prolactin secretion in goats. *Anim Sci J.* 84(4):334-40, 2013.).

A támogatási periódus alatt számos megtisztelő felkérésnek is eleget tettünk. Nevezetesen 2010- ben a Japán Andrológiai Társaság meghívásának eleget téve, plenáris előadóként „*Physiological Role of Salsolinol in the Regulation of Pituitary Prolactin Secretion*” címmel tartottam előadást (9th Annual Meeting of Japan Society of Andrology, Nippon Veterinary and Life Science University, Musashino-shi, Tokyo, Minami Sakai city, July 30-31, 2010. Japan), melyet követett a felkérés egy összefoglaló cikk megírására. Ez a pályázat támogatásával elért eredmények összefoglalására adott nagyszerű alkalmat, mely 2011-ben jelent meg. (Oláh M, Bodnár I; Galit D, Tóth EB, Vecsernyés M, Nagy GM. Role of Salsolinol in the Regulation of Pituitary Prolactin and Peripheral Dopamine Release. *Reproductive Medicine and Biology* (2 May 2011), pp. 1-9. doi:10.1007/s12522-011-0086-5 Key:citeulike:9263013, 2011.). 2012-2013-ban komoly kihívást jelentett a Prolactin (Edited by György M. Nagy and Bela E. Toth, ISBN 978-953-51-0943-3, Hard cover, 230 pages, Publisher: InTech, Published in January 23, 2013 under CC BY 3.0 license DOI: 10.5772/2950) címmel megjelent könyv szerkesztői feladata. A tizenkét (12) fejezetet tartalmazó könyv szerkesztése mellett két fejezetet (Chapter 8: The Role of Prolactin in the Regulation of Male Copulatory Behavior written by Toru R. Saito, Márk Oláh, Misao Terada and György M. Nagy; Chapter 10: The Regulation of Pituitary Prolactin Secretion: Hypothalamic, Intrapituitary and Intracellular Factors and Signaling Mechanisms written by Viktória Reinhoffer, Márk Oláh, Miklós Vecsernyés, Béla E. Tóth and György M. Nagy, <http://www.intechopen.com/books/mostdownloaded/prolactin>) magunk írtunk a könyvben, melyek közül különösen az második (Chapter 10) kitűnő alkalmat jelentett a jelen beszámolómban részletezett eredmények egy részének leírására. Ugyancsak 2013-ban jelent meg Stress and Immunity címmel az *Advances in Neuroimmune Biology*, (Volume 3, Number 3-4 / 2012, Publisher IOS Press, ISSN 1878-948X Guest Editors: Istvan Berczi, Andrés Quintanar Stephano and György <http://iospress.metapress.com/content/v6715241235v/?p=4593d5d285eb4d93b5df91d1e9493e2a&pi=2>) különszáma, melyben ugyancsak szerkesztőként működtem közre és egy fejezetet írtunk (Miklós Vecsernyés, Krisztina J. Kovács, Béla E. Tóth, Laura Welke and György M. Nagy: *New Aspects of the Immunoregulation by the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis*, pp:287-295, in *Advances in Neuroimmune Biology, Stress and Immunity, Volume 3, Number 3-4 / 2012*)

A kutatási terv kidolgozásában résztvevők közül Oláh Márk 2011-ben védte meg PhD értekezését. Kutatási témája a pályázat anyagára épült. Ezen felül a témával kapcsolatos

kísérleti eredmények szolgálták alapot 2011 és 2013 között három, Reinhoffer Viktória, Sándor Réka Zsuzsanna és Salamon Petra végzős orvostanhallgatók által készített szakdolgozat megírásához.