



Najnowsze osiągnięcia w neuroendokrynologii w świetle doniesień IV Międzynarodowego Kongresu Neuroendokrynologicznego (Kokura, Japonia, 11-16 października 1998 r.)

Alina Gajewska

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
Polska Akademia Nauk, Jabłonna k. Warszawy

Organizowane co cztery lata spotkanie badaczy z dziedziny neuroendokrynologii jest najważniejszym forum, na którym prezentowane są najnowsze osiągnięcia w tej dziedzinie. Sprawozdanie dotyczy najciekawszych zagadnień prezentowanych na zjeździe.

1. Regulacja wzrostu

Dr I. Robinson (Wielka Brytania) przedstawił wykład poświęcony neuroendokrynologicznym aspektom regulacji sekrecji hormonu wzrostu (GH). Sekrecja hormonu wzrostu, jak wcześniej sądzono, regulowana jest przez dwa antagonistycznie działające hormony podwzgórza: hamującą sekrecję GH somatostatynę (SRIF) oraz — pobudzającą sekrecję GH — hormon uwalniający hormon wzrostu (GHRH). Obecnie wiadomo już, że regulacja sekrecji hormonu wzrostu jest zjawiskiem bardziej złożonym i w procesie tym, poprzez mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego, uczestniczy także insulinoподобny czynnik wzrostu (IGF-I) oraz receptory hormonu wzrostu (GHRs) zlokalizowane w jądrze łukowatym (Arc) i okołokomorowym (PVN) podwzgórza. Co znamienne, zmiany w podwzgórzowych GHRs podlegające autoregulacji zarówno poprzez GH jak i steroidy gonadowe i nadnerczowe nie odzwierciedlają ekspresji receptorów dla GH w wątrobie. Dowiedziono również, że liczne syntetyczne peptydy

Adres do korespondencji

Instytut Fizjologii
i Żywienia Zwierząt,
Polskiej Akademii Nauk,
05-110 Jabłonna
k. Warszawy.

biotechnologia

1 (48) 199–204 2000

i niepeptydowe czynniki pobudzające uwalnianie (GHS) mają wyraźną zdolność do pulsacyjnego uwalniania GH poprzez aktywację nowego, wrażliwego na regulację endokrynną receptora (GHSR) zlokalizowanego w podwzgórzu i przysadce mózgowej. Sklonowanie receptora dla GHS pozwoliło określić jego przynależność do białek rodziny G, otrzymano ponadto dwa wysoce specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko trzeciej pętli wewnątrzblonowej KM-1 receptora dla GHS oraz przeciw fragmentowi C-końca tego receptora (T. Shuto, Japonia). Prace nad syntetycznym peptydem GHRP-6 o wydatnych właściwościach uwalniania GH zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, dostarczyły danych świadczących o jego zdolności do depolaryzacji błony komórek somatotropowych przysadki poprzez zwiększenie jej przepuszczalności dla jonów sodowych (M. Kato, Japonia). GHRP-6 aktywował też (ekspresja białka *c-fos*) neurony jądra łukowatego projektujące do jądra okołokomorowego (K. Honda, Japonia). Dr M. Sato (Japonia) wykazał ekspresję genu dla receptora GHS w obszarach jądra łukowatego (w tym także na neuronach uwalniających GHRH) i podwzgórza brzuszno-przysrodkowego (VMH). Aktywacja neuronów (indukcja białka *c-fos* po dokomorowym podaniu białka GHRP-2) jaką zaobserwował tylko w obszarze jądra łukowatego wskazuje, że to neurony jądra łukowatego, a nie neurony VMH mogą być miejscem pierwotnego oddziaływania GHS. Jakkolwiek nie zidentyfikowano dotychczas endogennego liganda dla GHSR to jednak przypuszcza się, że może to być nowy peptyd podwzgórzowy regulujący aktywność osi GHRH-GH. Musi zatem istnieć, jak się wydaje, dodatkowy endogenny system regulujący sekrecję GH, choć jego zdolność do stymulacji uwalniania GH ściśle zależy od prawidłowo funkcjonującego GHRH. Dr K. Mayo (USA) przedstawiła wykład dotyczący GHRH i jego receptora w regulacji wzrostu. Badania wykonane na komórkach ssaczych zawierających zmutowane i chimeryczne białka receptora GHRH dowodzą komplementarnej roli domeny N-końcowej, pętli wewnątrzkomórkowych oraz domen transmembranowych receptora w jego interakcji z ligandem oraz świadczą o aktywacji zależnych od cAMP wewnątrzkomórkowych kinaz MAP. Dalsze jej prace nad ekspresją genu dla receptora GHRH skoncentrowane wokół zagadnień aktywacji jego promotora, dostarczyły danych o roli komórkowospecyficznych czynników (m.in. czynnika transkrypcyjnego Pit-1) w regulacji ekspresji genu dla receptora GHRH. Autorka wykazała też, że gen ten jest regulowany przez glukokortykoidy i GH. W badaniach nad regulacją przysadkowospecyficzną ekspresji genu dla receptora GHRH (G. Iguchi, Japonia) wykazano, że zarówno czynnik transkrypcyjny Pit-1 jak i zlokalizowany w obszarze od -130 do -120 bp promotora czynnik P1 są ważnymi *cis*-elementami wpływającymi na przysadkowospecyficzną ekspresję genu dla receptora GHRH.

Komórkowa linia Mt/TS szczurzych somatotropów wykazująca ekspresję receptorów dla GHRH stanowi dogodny obiekt badań nad regulacją transkrypcji GH. Stwierdzono aktywację genu GH po stymulacji syntezy cAMP w tych komórkach (C. Voss i D. L. Hurley USA) i przedstawiono dane świadczące o udziale GHRH i SIRF w regulacji aktywności 5' promotora genu dla GH (M. Morishita, Japonia). GHRH stymulował aktywność promotora, podczas gdy SRIF znacząco hamował tę aktywność w komórkach uprzednio stymulowanych GHRH. Hormon wzrostu przynajmniej częściowo sam reguluje swoją sekrecję poprzez krótką pętlę ujemnego sprzężenia zwrotnego z udziałem zlokalizowanych centralnie receptorów GH, na co wskazują wyniki otrzymane po infuzjach antagonisty hormonu wzrostu do bocznych komór mózgowych szczura (R. Nass, USA). Na podstawie prac prze-

prowadzanych nad zmianami w ekspresji genu GHRH, genu dla receptora GHRH i genu dla receptora GHS u transgenicznych szczurów niosących gen dla ludzkiego hormonu wzrostu sądzi się, że głównym obszarem docelowym negatywnego sprzężenia zwrotnego wywieranego przez GH może być układ GHRH-GHRH-R (N. Miki, Japonia).

2. Regulacja pobierania pokarmu

W wykładzie o interakcjach podwzgórzowych pomiędzy siecią neuronalną regulującą procesy rozrodu (RRN) a siecią neuronalną odpowiedzialną za regulację apetytu (ARN) dr S. P. Kalra (USA) przedstawił koncepcję funkcjonalnych połączeń między nimi obejmujących zarówno sygnały pobudzające (neuropeptyd Y, galanina, oreksyna, glutaminian) jak i hamujące (α -MSH, transkrypty regulowane przez kokainę i amfetaminę), a także sygnały o zmiennym działaniu (β -endorfina, kwas γ -aminomasłowy). Oreksyna-A i oreksyna-B powstające z jednej cząsteczki prekursorowej są nowo wyizolowanymi neuropeptydami podwzgórzowymi stymulującymi pobieranie pokarmu. Neurony wykazujące ich ekspresję są zlokalizowane w obszarze bocznym podwzgórza i – jak się wydaje – są one wrażliwe na poziom glukozy co może świadczyć o ich funkcji monitorowania osoczowego poziomu glukozy we krwi (T. Moriguchi, Japonia). Projekcja ich włókien do regulujących pobieranie pokarmu jąder przykomorowego i łukowatego, a także do takich obszarów pozapodwzgórzowych jak jądra przykomorowe wzgórza, miejsce sinawe, ciało migdałowate, jądra szwu, kora i hipokamp świadczą, że oreksyny mogą współdziałać nie tylko z takimi regulatorami apetytu jak: leptyna, neuropeptyd Y i melanokortyny, lecz także mogą przekazywać sygnały z podwzgórza do licznych obszarów mózgu (T. Nambu, Japonia; S. C. Williams, USA). Sklonowano także pełną sekwencję ludzkiego genu kodującego preprooreksynę (D. J. Bregmsa, USA). Gen ten składa się z dwóch eksonów i jednego intronu obejmujących długość 1,434bp. Ekson pierwszy zawiera obszar 5' nie podlegający translacji oraz sekwencję kodującą pierwszych siedem aminokwasów sekwencji sygnałnej cząsteczki, zaś ekson drugi koduje pozostałą jej część wraz z nie podlegającym translacji obszarem 3' genu. Sekwencja ludzkiej oreksyny A jest identyczna z sekwencją występującą u bydła i gryzoni, podczas gdy ludzka oreksyna-B różni się dwoma aminokwasami w porównaniu z sekwencją u gryzoni. W badaniach nad leptyną wykazano, że ten kodowany przez gen *ob* i uwalniany z tkanki tłuszczowej hormon, przywracał zahamowaną procesem głodzenia aktywność transkrypcyjną genu dla neuronalnej syntazy tlenu azotu (NOS) w obszarze jądra okołokomorowego i nadwzrostkowego (SON) podwzgórza (Y. Ueta, Japonia). Leptyna, jak się wydaje, jest zaangażowana we wzrost zużycia glukozy przez takie narządy jak: serce, szpik kostny, mięśnie szkieletowe i brązowa tkanka tłuszczowa poprzez aktywację obszaru brzuszno-przyśrodkowego podwzgórza (VMH) i współczulnego układu nerwowego (M. S. Haque, USA). Centralnie podawana leptyna stymulowała w podwzgorzu ekspresję genu dla neurotensyny, co jak się zdaje, świadczy, że neuropeptyd ten także pośredniczy w regulacji pobierania pokarmu (A. Sahu, USA). Wykazano też, że leptyna podwyższa ekspresję genu dla proopiomelanokortyny (POMC) i kortykoliberyny (CRF), a jej hamujące działanie na pobieranie pokarmu odbywać się może przez receptory dla melanokortyny zlokalizowane w obszarze jądra okołokomoro-

wego i podwzgórza brzuszno-grzbietowego (N. Satoh, Japonia).). Stwierdzono także, że leptyna przyspiesza osiągnięcie dojrzałości rozrodczej u gryzoni i zapobiega utracie cykliczności podczas głodzenia (R. S. Ashima, J. S. Flier, USA), co jak się zdaje, świadczy, że oś rozrodcza jest miejscem pierwotnego działania leptyny. Jest także zaangażowana w procesy uczenia się i pamięć poprzez swój stymulujący wpływ na aktywność neuronów w hipokampie (Y. Oomura, Japonia).

3. Regulacja rozrodu

Udział stresu metabolicznego i psychologicznego w regulacji procesu rozrodu u wybranych gatunków małp był przedmiotem wykładu dr J. L. Cameron, (USA). W prezentowanych wynikach dowiedziono silnego wpływu — niewielkiego nawet — stresu metabolicznego na poziom uwalnianych hormonów odpowiedzialnych za regulację rozrodu (LH, FSH, estradiol). Odpowiedzialnym za reakcję układu rozrodczego, jak się wyłaje, jest wywołana tym stresem zmiana aktywności układu noradrenergicznego w podwzgórzu i wiążące się z nią zmiany w aktywności podwzgórzowych neuronów NPY. W najnowszym badaniach dowodzi się, że ośrodkowa regulacja dojrzewania płciowego u ssaków wymaga nie tylko zmian w komunikacji transsynaptycznej neuronów w mózgu, lecz także udziału komórek glijowych. Wiadomo bowiem, że neurony i astrocyty regulują proces dojrzewania płciowego poprzez regulację aktywności podwzgórzowych neuronów GnRH — neuropeptydu odpowiedzialnego za rozwój płciowy poprzez bezpośredni wpływ na biosyntezę i uwalnianie przysadkowych hormonów LH i FSH. Spośród czynników wzrostu działających poprzez aktywność kinazy tyrozynowej, nabłonkowy czynnik wzrostu (EGF) i neureguliny (NRG) syntetyzowane przez podwzgórzowe astrocyty (komórki glijowe) stymulują — pośrednio — uwalnianie GnRH. Stymulacja ta odbywa się poprzez aktywację ich specyficznych (EGF-R i erbB4) receptorów zlokalizowanych nie na neuronach GnRH, lecz na astrocytach. Pobudzenie receptorów EGF-R i erbB4 powoduje aktywację receptora erbB2 w komórkach glijowych czego konsekwencją jest bezpośrednia stymulacja uwolnienia prostaglandyny E_2 w tych komórkach. Uwolniona z komórek glijowych prostaglandyna bezpośrednio działa na neurony GnRH wpływając pobudzająco na uwalnianie tego neuropeptydu do krążenia wrotnego przysadki. Wykazano też że podwzgórzowa ekspresja genów obu tych ligandów, jak i ich specyficznych receptorów nasila się w okresie poprzedzającym pierwszą hormonalną manifestację dojrzałości płciowej (S. R. Ojeda, Y. J. Ma, USA). Zagadnienia związane z interakcjami komórek glijowych i neuronów LHRH w procesach migracji i różnicowania tych neuronów we wczesnych fazach rozwoju, badane były w układzie *in vitro* na modelu wykorzystującym linię nieśmiertelnionych podwzgórzowych komórek GT_{1-1} (B. Marchetti, Włochy). Wykazano że syntetyzowany przez komórki glijowe główny czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) jest zaangażowany w regulację różnicowania neuronalnej sieci LHRH. Także fluktuacje poziomu insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-I) w jądrze łukowatym podwzgórza w czasie cyklu estralnego, towarzyszące zmianom w synaptycznych połączeniach axosoma-tycznych (GABA-ergicznym i komórkach astrogleju), świadczą o jego udziale w regulacji aktywności układu rozrodczego. Stwierdzono, że w regulacji akumulacji IGF-I z płynu

mózgowo-rdzeniowego biorą udział tanycyty, specyficzne komórki astroglejowe występujące w jądrze łukowatym i wyniosłości pośrodkowej. Akumulacja IGF-I, zmiany w układzie synaps, jak i w komórkach astrogleju są indukowane przez estradiol, a blokowane przez progesteron i pojawiają się one wraz z początkiem dojrzałości rozrodczej samic. Poprzez regulację ilości membrany neuronalnej dostępnej dla tworzenia połączeń synaptycznych, komórki astrogleju odgrywają znaczącą rolę w hormonalnej regulacji połączeń nerwowych w jądrze łukowatym. Aktywacja receptora dla IGF-I może być związana z cykliczną przebudową synaps i morfologii astrogleju w obszarze jądra łukowatego podczas cyklu estralnego (L. M. Garcia-Segura, USA). Także steroidy gonadowe wywierają podstawowy i zależny od płci wpływ na organizację sieci neuronalnej w podwzgórzu rozwijających się samic i samców szczura. Sterydy gonadowe poprzez aktywację apoptotycznej śmierci neuronów w jądrze brzuszno-przyśrodkowym i okołokomorowym lub też poprzez wpływ na jej hamowanie w zróżnicowanych płciowo jądrach na obszarze przedwzrostowym bezpośrednio wpływają na ilość neuronów w podwzgórzu. Steroidy stymulując wzrost aksonalny i dendrytyczny, jak i tworzenie się synaps, działają jako czynnik neurotroficzny na rozwijającą się tkankę podwzgorza. Poprzez regulację ekspresji genów takich białek jak tubulina, związane ze wzrostem białko 43 KD oraz białek związanych z mikrotubulami bezpośrednio wpływają na wewnątrzkomórkową organizację sieci neuronalnej i decydują o trwale zróżnicowanej płciowo strukturze podwzgorza odpowiedzialnej zarówno za funkcjonalne zróżnicowanie regulacji uwalniania gonadotropin, a także odmienny behawior seksualny u samic i samców (A. Matsumoto, Japonia). W badaniach nad ontogenezą receptora estradiolowego (ER) w mózgu samic szczura (S. Hayashi, Japonia) wykazano jego obecność – już od okresu perinatalnego – w strukturach podwzgorza: obszarze przedwzrostowym, jądrze łukowatym i brzuszno-przyśrodkowym, a także w jądrze migdałowatym przyśrodkowym odpowiedzialnych za regulację uwalniania gonadotropin w okresie dojrzałości płciowej. Nie stwierdzono natomiast obecności ER, ani aromatazy w jądrze brzuszno-przedsuteczkowatym, które jednak, jak się wydaje, jest miejscem możliwego bezpośredniego działania androgenów podczas płciowego różnicowania mózgu, gdyż obszar ten po stymulacji androgenowej wykazywał silną ekspresję receptora androgenowego. Również aktywacja genu granuliny/epiteliny w okresie neonatalnym, jak się zdaje, odgrywa znaczącą rolę w procesie indukowanej przez testosteron maskulinizacji mózgu samców szczura (M. Suzuki, Japonia). W pracy nad pulsacyjnym uwalnianiem LHRH (E. Terasawa, USA) przeprowadzonym na komórkach neuronów LHRH wyhodowanych z opuszki węchowej zarodka małpy, przedstawiono wyniki świadczące o endogennym mechanizmie generowania pulsów LHRH. O takiej właściwości neuronów LHRH świadczy ich zdolność do pulsacyjnego uwalniania LHRH w układzie *in vitro* i jego zsynchronizowanie ze spontanicznymi oscylacjami wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia. W regulacji pulsacyjnego uwalniania LHRH pewną rolę odgrywać też może cAMP poprzez otwieranie – bramkowanych przez cAMP – kanałów kationowych (R. I. Weiner, USA).

4. Zegar biologiczny

Lokalizacja endogennego *pacemaker* w obrębie neuronów jądra nadskrzyżowaniwego (SCN) potwierdzona została endogenną rytmiczną aktywnością metaboliczną i elektryczną tych neuronów, a także rytmicznym uwalnianiem neurotransmiterów z ich zakończeń nerwowych. Wykazano, że wazopresyna i kwas γ -aminomasłowy (GABA) uwalniane z zakończeń nerwowych neuronów SCN w obrębie jądra przykomorowego, brzuszno-przyśrodkowego i jąder przedwzrostkowych podwzgórza są bardzo istotnymi sygnałami w generacji okołodobowej rytmiki wydzielania, odpowiednio, melatoniny, kortykosteronu i LH (A. Kalsbeek, Holandia). W najnowszych pracach nad identyfikacją genów zegara biologicznego (*clock genes*) w SCN myszy doprowadzono do identyfikacji genów *mPer1*, *mPer2* i *mPer3* (wykazujących strukturalną homologię z genem *dPer* u *D. melanogaster*). Geny te odznaczają się gwałtowną i rytmiczną (z wyraźnym szczytem w ciągu dnia i w ciągu nocy) ekspresją w obrębie SCN. Stwierdzono ponadto, że profil ekspresji poszczególnych genów jest zindywidualizowany, gdyż gen *mPer1* jest gwałtownie indukowany poprzez krótką nawet ekspozycję na światło, gen *mPer2* również jest aktywowany przez ekspozycję na światło choć faza odpowiedzi obu tych genów różni się. Ekspozycja taka nie indukuje natomiast ekspresji genu *mPer3* (H. Okamura, Japonia). W obrębie jądra nadskrzyżowaniwego można histologicznie wyróżnić dwie klasy neuronów: występujące w obszarze brzuszno-grzbietowym neurony zawierające wazoaktywny peptyd elitowy (VIP) oraz występujące w obszarze grzbietowo-przyśrodkowym neurony zawierające wazopresynę (AVP). Istnieją dane świadczące, że sekrecja tych neuropeptydów w obrębie SCN jest regulowana przez różne *pacemakers*; wydaje się bowiem, że neurony w obrębie SCN charakteryzują się zdolnością do okołodobowej multioscytacji. Sądzi się że oscylacje okołodobowe mogą być generowane przez molekularną pętlę sprzężenia zwrotnego, w której produkty genu regulują jego transkrypcję. W obrębie sklonowanego ostatnio ssaczego genu *Clock* zlokalizowano sekwencję kodującą czynnik transkrypcyjny typu bHLH/PAS. Sklonowanie genu *BMAL1* (należącego do rodziny genu bHLH/PAS) pozwoliło na wykazanie, że produkt tego genu tworzy heterodimery z genem *Clock*, a ich ekspresja w obrębie jądra nadskrzyżowaniwego wykazuje rytmikę okołodobową. Nie wykluczone zatem, że *BMAL1* i *Clock* zaangażowane mogą być w molekularne sprzężenie zwrotne lub/i w okołodobową organizację systemu multioscylacyjnego w SCN (S. Honna, Japonia).