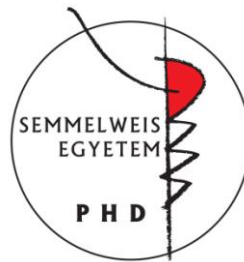


**A tuberoinfundibuláris peptid 39 és a kettes típusú
parathormon receptor neuromodulátor rendszer szerepe az
anyai adaptációk központi idegrendszeri szabályozásában**

Doktori tézisek

Cservenák Melinda

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Dobolyi Árpád tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Szabó Gábor osztályvezető, az MTA doktora
Dr. Földes Anna tudományos munkatárs, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Halász Béla prof. emeritus, az MTA doktora
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kiss József tud. tanácsadó, az MTA doktora
Dr. Rácz Bence egyetemi docens, Ph.D.

**Budapest
2013**

I. BEVEZETÉS

A tuberoinfundibuláris peptid 39 (TIP39) egy 39 aminosavból álló neuropeptid, amit a kettes típusú parathormon receptor (PTH2 receptor)-hoz való affinitása alapján 1999-ben izoláltak borjú hypothalamusának tuberoinfundibuláris régiójából. A TIP39-et tartalmazó sejtek csupán két helyen fordulnak elő a patkány központi idegrendszerében: az area subparafascicularis (SPA) területén a posterior thalamusban és a nucleus paralemniscalis medialis (MPL)-ban, a híd laterális részén. A posterior thalamus területén a TIP39-et expresszáló neuronok megtalálhatóak a magnocellularis (medialis) subparafascicularis magban és az azt körülvevő subparafascicularis areában a thalamus periventricularis szürkeállományán belül (periventricularis szürkeállomány, PVG). Innen hosszan elnyúlva oldalra és hátrafelé húzódnak a parvicellularis (lateralis) subparafascicularis magban és környékén a lemniscus medialis felett elhaladva egészen a peripeduncularis területig (posterior intralaminaris thalamicus komplex, PIL).

A kettes típusú parathormon receptort (PTH2 receptor) Usdin és mtsai 1995-ben írták le. A PTH2 receptor TIP39 általi aktiválása cAMP és Ca^{2+} akkumulációt is eredményez. A TIP39 neuronokkal ellentétben a PTH2 receptor az agy számos területén megtalálható. PTH2 receptort expresszáló neuronokat írtak le a limbikus rendszerben, a thalamus, a hypothalamus, a középagy, a híd, a nyúltvelő egyes magjaiban és a gerincvelőben.

Míg a PTH2 receptor az egész életen át folyamatosan expresszálódik az idegrendszerben, a TIP39 kifejeződése a pubertás után jelentősen lecsökken.

Eddig kevés információ látott napvilágot a TIP39-PTH2 receptor rendszer funkciójáról. Ezek szerint a TIP39 neuronok közvetítik az

auditoros stresszre adott kortikotropin releasing hormon (CRH) választ. TIP39 agonista intracerebroventricularis beadásakor a fájdalomtűrés és a CRH elválasztás növekedik, a növekedési hormon (GH) felszabadulás viszont csökken.

Az emlősállatok nőtény egyedei hatalmas megterhelésnek vannak kitéve a reprodukció során, hiszen - fajtól függő mértékben -, de mindenképpen elsősorban rájuk hárul az utódok táplálása és gondozása. A kölykökről való megfelelő gondoskodást szolgálják a terhesség időszakában és a szoptatás alatt a nőtényekben lezajló adaptációs folyamatok. A terhesség alatt bekövetkező adaptációs változásokat elsősorban a hormonok (placentális laktogének, korion gonadotropin, progeszteron, ösztrogén) határozzák meg, míg a postpartum időszakban a kölyök és az anya közötti interakció az adaptációs folyamatok fő hajtóereje. Ebben a tekintetben a fejlődő újszülött – részben a szopási stimuluson keresztül- határozza meg, hogy milyen változások zajlanak le az anya agyában.

A postpartum időszak legszembetűnőbb endokrin eseménye a laktogenezis/galaktopoezis. A tejelválasztás szabályozásában központi helyet foglal el a prolaktin (PRL). Ezt a polipeptid hormont az agyalapi mirigy elülső lebenyének laktotróp sejtjei szintetizálják és megfelelő stimulusokra (szopási inger, ösztrogénhatás, stressz) a vérkeringésbe szekretálják. A PRL felszabadulás leghatásosabb fiziológias stimulusa anyákban a kölyök által kifejtett szopási inger, amelynek hatására az anyaállat szérum PRL szintje már néhány perc múlva az alapérték többszörösére emelkedik. A PRL felszabadulást befolyásoló dopaminerg neuronok a hypothalamicus nucleus periventricularis (A14 katekolaminerg sejtcsoport) és a nucleus arcuatus (A12 katekolaminerg sejtcsoport) területén helyezkednek el.

Jay Rosenblatt motivációs modellje szerint az anyai magatartás akkor tud megnyilvánulni, amikor a kölykök felől érkező ingerekre való válaszképességi hajlandóság nagyobb lesz, mint a kölyköktől való elzárkózásra, illetve a kölykök elkerülésére való törekvés. Ez olyan belső folyamatok lezajlását feltételezi a peripartum időszakban, amelyek elősegítik a nőtény vonzódását a kölykök iránt, illetve felkeltik a nőtény érdeklődését a kölykök felől érkező ingerek iránt, miközben ezzel egy időben elnyomják az antagonisztikusan ható rendszereket, amelyek aktiválnák az elkerülő és visszahúzódó válaszokat. Léziós és aktivációs kísérletek azt bizonyítják, hogy a hypothalamus medialis preopticus területe (MPOA) és a szomszédos nucleus interstitialis striae terminalis ventralis része (vBNST) alapvető fontosságú az anyai motiváció szabályozásában.

II. CÉLKITŰZÉSEK

1. A PIL-ben elhelyezkedő TIP39 idegsejtek topográfiai elhelyezkedésének, valamint neuronális kapcsolatrendszerének a leírása anya patkányokban az alábbi szempontok szerint:

A. Milyen neuronális markereket expresszáló neuronok vannak a PIL-ben és ezeknek milyen topográfiai kapcsolata van a TIP39 sejtekkel?

B. Hova vetülnek a PIL-ben elhelyezkedő TIP39 idegsejtek?

B/1. A PIL elektromos léziójának hatására eltűnnek-e a TIP39 rostok a hypothalamus magjaiból?

B/2. Hol és hogyan futnak le a PIL-ből eredő TIP39 rostok?

B/3. Milyen a PIL sejtek projekciós mintázata neuronális nyomjelző anyagok terjedése alapján?

C. Milyenek a PIL afferens neuronális kapcsolatai?

2. A TIP39 indukcióját és a TIP39 neuronok aktiválódását vizsgáltuk anya patkányokban. Kérdéseink a következők voltak:

- A. Változik-e a TIP39 mRNS mennyisége vemhesség és laktáció alatt?
- B. Változik-e a TIP39 immunreaktivitás laktáció alatt?
- C. A TIP39 sejtek milyen hatásra aktiválódnak anyaállatokban?

3. Az endogén TIP39 antagonizálás hatását az alábbi két kísérleti modellben kívántuk vizsgálni a szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra:

- A. Van-e hatása a PTH2 receptor antagonistá (HYWH-TIP39) agykamrába való injektálásának a szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra?
- B. Van-e hatása a HYWH-TIP39-GFP lentivírus vektor mediobasalis hypothalamicus injektálásának a szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra?

4. Az endogén TIP39 antagonizálás hatását vizsgáltuk az anyai motivációra. Az alábbi kérdésre kerestük a választ:

- A. Van-e hatása a HYWH-TIP39-GFP lentivírus vektor medialis preopticus területre való injektálásának az anyai motivációra?

III. MÓDSZEREK

Az állatkísérletek tervezése és kivitelezése az European Communities Council 2010. szeptember 22-ei direktívája (2010/63/EU), a Semmelweis Egyetem Egyetemi Állatkísérleti Bizottságának Állatvédelmi Szabályzata és az ÁNTSZ 3453/003/2009. számú engedélye szerint történt.

A vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében végeztük.

A PIL topográfiájának leírására Luxol fast blue festést, a PIL-ben előforduló neurokémiai markerek és a TIP39 neuronokkal való viszonyuk vizsgálatára pedig fluoreszcens immunhisztokémiát használtunk.

A PIL-ben elhelyezkedő TIP39 idegsejtek neuronális kapcsolatrendszerét léziós és transzekciós technikákkal, valamint neuronális nyomjelző anyagok (kolera toxin β -alegység, biotinilált dextrán amin) felhasználásával tanulmányoztuk.

A TIP39 anyákban bekövetkező indukcióját immunhisztokémiával, *in situ* hibridizációs hisztokémiával és RT-PCR-rel is demonstráltuk. A TIP39 neuronok aktivációját anya patkányokban Fos immunhisztokémiával vizsgáltuk.

Az endogén TIP39 antagonizálás hatását a szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra anya patkányokban két módszerrel tanulmányoztuk. Egyrészt a PTH2 receptor antagonist (HYWH-TIP39) agykamrába való injektálásának hatását, másrészt a HYWH-TIP39-GFP lentivírus vektor mediobasalis hypothalamicus injektálásának hatását vizsgáltuk a szopási inger által kiváltott prolaktin szekrécióra. A prolaktin szintek meghatározásához juguláris kanülön keresztül vért vettünk az anyaállatoktól és radioimmunoassay módszerrel határoztuk meg a prolaktin koncentrációját a vérplazmában.

Végül a HYWH-TIP39-GFP lentivírus vektor medialis preopticus területre való injektálásának hatását az anyai motivációra a kondicionált helypreferencia teszttel analizáltuk.

IV. EREDMÉNYEK

1. A PIL-ben elhelyezkedő TIP39 idegsejtek topográfiai elhelyezkedése, valamint neuronális kapcsolatrendszerük anya patkányokban

A PIL, mint neuroanatómiai egység, a TIP39 neuronok jelenléte alapján definiálható. Magába foglalja a nucleus intralaminaris posterior thalami-t, a nucleus subparafascicularis parvicellularis-t és a zona incerta caudalis részét.

A calbindin-ir neuronok megjelenése a TIP39-ir neuronokhoz hasonlóan szintén csak a PIL területére korlátozódott, kivételt csupán a PIL-lel dorsalisán szomszédos nucleus triangularis posterior thalami képezett, ahol a calbindin-immunreaktív neuronok megtalálhatóak voltak, de TIP39 neuronokat nem találtunk a területen.

Coolen és mtsai két elkülönülő szubdivízióra osztották fel a PIL-t a neurokémiai markerek eltérő jelenléte alapján. A medialis szubdivízió galanin-immunreaktív axonokat tartalmaz, melyek a lumbosacrális gerincvelő galanin neuronjaiból erednek. Míg a laterális szubdivízió calcitonin-gén rokon peptid (CGRP)-ir neuronokat és rostokat tartalmaz. A calbindin-ir neuronok és a substance P-ir rostok mindkét szubrégióban megtalálhatóak. Emellett párzás-indukálta neuronális aktivációt csak a mediális szubdivízió sejtjei mutattak.

Mivel a TIP39 neuronokat a CGRP neuronoktól medialisán, a galanin-rostokkal viszont átfedésben találtunk és a TIP39 sejtek c-fos aktivációt mutatnak a hímek ejakulációjával asszociációban, a korábbi felosztást alkalmazva őket a medialis szubdivízió részeként azonosítottuk.

A PIL-ben található TIP39 neuronok kapcsolatrendszere eddig jobbra felderítetlen maradt. A dolgozatban szereplő anterográd technikát

használó kísérlet anyáállatokban történt a beadási hely TIP39 sejtekhez képest történő azonosítása érdekében, mivel a TIP39 sejtek a TIP39 indukciója miatt anyákban válnak jól láthatóvá. Így kimutattuk, hogy egyebek mellett a nucleus septi lateralis, az area praeoptica medialis, a nucleus interstitialis striae terminalis ventralis része, a nucleus paraventricularis és periventricularis, a nucleus arcuatus és a nucleus amygdaloideus medialis kap afferens rostokat a PIL-ből. Az anterográdan jelölt rostok a PIL-ből a tractus opticus felett futó decussatio supraopticus pályában haladtak a hypothalamus felé. A pálya egyoldali átvágása anyákban a TIP39 rostok denzitásának azonos oldali csökkenését okozta a hypothalamusban, ami arra utal, hogy az itt elhelyezkedő TIP39 a rostok és rostvégződések a PIL-ből származnak.

A retrográd nyomkövető anyag felhasználásával történt beadásaink alátámasztották a PIL projekciós kapcsolatát az area praeoptica medialis-sal és a nucleus arcuatus-sal. Emellett ezen eredményeink azt is demonstrálták, hogy a posterior thalamuson belül a retrográdan jelölt neuronok megjelenése kizárólag a PIL területére korlátozódik, illetve ezek egyenletesen oszlanak el a PIL-en belül. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a PIL egy topográfiai egység, még akkor is, ha nem felel meg egyértelműen egy citoarchitektonikailag definiált magnak, valamint azt is, hogy a TIP39 neuronok csak egy részét képezik a PIL-ben lévő projekciós neuronoknak, emellett a PIL-ben elhelyezkedő TIP39-negatív neuronok szintén vetülnek az area praeoptica medialis-ba és a nucleus arcuatus-ba.

Retrográd neuronális tracer PIL-be való juttatásával bizonyítottuk, hogy a PIL direkt és indirekt felszálló projekciót is kap az ellenkező oldali gerincvelőből. A direkt projekció a gerincvelő számos thoracalis és lumbalis szegmentumából ered, többnyire azokból a neuronokból, amelyek a gerincvelő hátsó szarvának mélyebb rétegeiben foglalnak helyet, míg az

indirekt projekció a nucleus gracilis-en és a nucleus cuneatus-on keresztül érkezik a PIL-be.

2. A TIP39 neuronok aktiválódása anya patkányokban

A TIP39 neuronok aktiválódását a PIL-ben és az MPL-ben *in situ* hibridizációs hisztokémiával vizsgáltuk anya patkányokban és egy másik független módszerrel, RT-PCR-ral is megerősítettük eredményeinket. A TIP39-immunreaktivitás anyákban megfigyelt növekedése a PIL-ben és az MPL-ben, arra utal, hogy a nagyobb TIP39 mRNS expresszió emelkedett szintű peptidszintézist is eredményez.

In situ hidridizációs kísérleteinkből nyert eredményeink alapján a TIP39 aktiválódása a PIL-ben a terhesség alatt még nem következik be. A szülés utáni első napon viszont már emelkedett a TIP39 mRNS szint és az expresszió a laktáció végéig magas szinten marad.

A két posterior thalamicus TIP39 sejtesoportot összehasonlítva elmondhatjuk, hogy a PIL-ben indukálódik a TIP39 expresszió anyákban, a PVG-ben viszont nem figyelhető meg ez a változás. Bár a PIL-ből előbb eltűnik a TIP39 az egyedfejlődés során, mint a PVG-ből, felnőtt állatokban mindkét régióban alacsony a TIP39 expressziója. Mivel vannak olyan agyterületek (nucleus septi lateralis, medialis prefrontalis cortex), amelyek kizárólag a PVG-ből kapnak TIP39 rostokat és PTH2 receptort is magas koncentrációban tartalmaznak, feltételezhető, hogy a PVG-beli TIP39 idegsejtek, melyek anyákban ugyan nem aktiválódnak, valamilyen eddig azonosítatlan fiziológiás hatásra szintén aktiválódhatnak.

A paralemniscalis TIP39 neuronban a TIP39 indukciójának időbeli mintázata az anyaállatokban megegyezik a posterior intralaminaris thalamicus TIP39 sejtesoportéval. Bár indukciós mintázatuk azonos, a két

TIP39 sejtcsoport két független sejtmaghoz tartozik, amelyek 3 mm-re vannak egymástól és citoarhitektonikailag, valamint afferens neuronális kapcsolataik tekintetében is különböznek egymástól.

A Fos, mint korai transzkripciós faktor gén, az adott körülmények között aktiválódott sejtekben mutatható ki. Szoptatás hatására megjelent a PIL-ben és az MPL-ben lévő TIP39 sejtekben, ami arra utal, hogy ezek a sejtek megemelkedett aktivitással válaszolnak erre az ingerre. Munkánkban megvizsgáltuk, hogy a PIL-beli TIP39 sejtek aktivitása milyen tényezőktől függhet. Az aktiváló stimulusra vonatkozóan azt a megállapítást tettük, hogy a szaglási, hallási és látási ingerek nem váltanak ki Fos expressziót a PIL-beli TIP39 neuronokban, kizárólag a szopási inger aktiválja a TIP39 neuronokat a PIL-ben.

3. Az endogén TIP39 antagonizálás hatásának vizsgálata a szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra anya patkányokban

A kölykök 4 órás elválasztása az anyjuktól az anya vérplazmájában mérhető prolaktin drasztikus esését eredményezi, amely a szoptatás beindulásakor percekben belül megemelkedik és körülbelül 30 perc elteltével egy csúcsot ér el. Fiziológias sóoldat laterális agykamrába való injektálásakor a várt görbét kaptuk, mely megfelelt a fent leírt prolaktin szintváltozásoknak. A PTH2 receptor antagonistá injejtálása viszont blokkolta a prolaktin szint megemelkedését a vérplazmában. Az általunk alkalmazott speciális PTH2 receptor antagonistá (HYWH-TIP39) szelektíven kötődik a TIP39 receptorához, amely bőségesen megtalálható a kamrát határoló periventricularis, paraventricularis és arcuatus magokban, így valószínűleg a HYWH-TIP39 ezeken a PTH2 receptorokon keresztül hatva fejt ki gátló hatását a szopási inger által kiváltott prolaktin

felszabadulásra. A TIP39 közvetlen hatása nem valószínű a dopaminerg neuronokon, mivel nem találtak PTH2 receptorokat a tirozin-hidroxiláz (TH)- sejteken a periventricularis és arcuatus magokban. A HYWH-TIP39 olyan interneuronokon hathat, amelyek expresszálják a PTH2 receptort és beidegzik a dopaminerg neuronokat. A TIP39 a PTH2 receptorra hatva emeli a cAMP és Ca^{2+} szinteket, ez a mechanizmus a neuropeptid serkentő hatását feltételezi. Így, a TIP39 a dopaminerg neuronokat gátló neuronokon keresztül befolyásolhatja. Ilyen jelöltek a dinorfin-tartalmú neuronok az arcuatus magban, mivel ezek beidegzik a TIDA neuronokat.

Az általunk használt lentivírus vektor képes termelni és az általa megfertőzött sejtek pedig konstitutívan szekretálni a PTH2 receptor antagonistá hatású HYWH-TIP39-et. A vírus mediobasalis hypothalamusba való injektálása lecsökkentette az alap prolaktin szintet és gátolta a szopás-indukálta plazma prolaktin szintemelkedést. Az extracelluláris térbe szekretált antagonistá képes bizonyos távolságra diffundálva elérni a PTH2 receptorokat és hozzájuk kötődve blokkolja az intracelluláris szignalizációs útvonalát.

A PTH2 receptor antagonistá jelenlétében megfigyelt csökkent prolaktin elválasztás, az endogén TIP39-nek fiziológiás szerepet tulajdonít a prolaktin felszabadulás regulációjában. TIP39 rostok és idegvégződések bőségesen beidegzik a mediobasalis hypothalamust, különösen nagy mennyiségben találhatóak meg a nucleus arcuatus-ban, nucleus periventricularis-ban és a nucleus paraventricularis-ban. Ezek a TIP39-tartalmú axonterminálisok lehetnek a forrásai annak az endogén TIP39-nek, amely befolyásolja a prolaktin felszabadulást. Eredményeink szerint ezek a rostok a PIL-ből erednek. A laktáció alatt a TIP39 iránt jelentkező megemelkedett igényt a TIP39 mRNS expressziójának emelkedése fedezi a PIL-ben. A TIP39 laktáció időszakában betöltött specifikus hatásai

összhangban vannak azzal, hogy a TIP39 mRNA szint a terhesség végéig nem emelkedik meg és a bazális értékre tér vissza a kölykök eltávolításakor. A TIP39-PTH2 receptor neuromodulátor rendszer fiziológiás jelentősége a laktáció idején megerősítést nyert transzgen egerekben is: a PTH2 receptort nem expresszáló anyák kölykei kisebb testtömegűek, mint a vad típusú anyák kölykei.

4. Az endogén TIP39 antagonizálás hatása az anyai motivációra

A célvezérelt magatartások kivitelezésének háttérében álló motivációs folyamatokat egy összetett neuronális hálózat vezérli, amelynek fő elemei: az orbitofrontalis és medialis prefrontalis kéreg, a nucleus amygdaloideus basolateralis magcsoportja, a hippocampus, a nucleus accumbens és ennek bemenetei az area tegmentalis ventralisból. A nucleus accumbens konvergens serkentő kapcsolatot tart fenn az összes fent említett kortikális és szubkortikális struktúrával. A postpartum időszakban további agyrégiók csatlakoznak a hálózatba, amelyek közül a legfontosabb a medialis preopticus terület. Az MPO|A kapcsolatban áll az area tegmentalis ventralissal, a nucleus accumbens-sel és a medialis prefrontalis kéreggel, ami lehetővé teszi, hogy az MPO|A a kölykök felől érkező szenzoros modalitások függvényében hatást gyakoroljon a motivációs neuronális körre, hogy az anya figyelmét a kölykök irányába terelje.

Eredményeink szerint a PIL-beli TIP39 neuronok axonjainak és axonvégződéseinek lefutása a preopticus területen feltűnően hasonló elrendezésű, mint a kölyköknek való kitettség hatására az anyákban a Fos-t expresszáló neuronok megjelenése a nucleus preoptica medialis és az area praeoptica medialis területén, valamint a nucleus interstitialis striae terminalis ventralis részén. Emellett azt is megmutattuk, hogy a PTH2

receptor antagonist hatására lecsökken azoknak az anyáknak a száma, amelyek a kölyök-asszociált kompartmentet preferálták a kondicionált helypreferencia tesztben és az az idő is, amelyet az anyák a kölyök-asszociált kompartmentben töltöttek.

Kísérletünkben az anyák két csoportjának (PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyák, kontroll vírus-injektált anyák) egy kölyök-asszociált és egy semleges, specifikus kondicionált stimulushoz nem köthető környezet között kellett választania. A PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyák szignifikánsan kevesebb időt töltöttek a kölyök-asszociált ketrecben, mint a kontroll vírus-injektált anyák, nem mutattak preferenciát a kölyökre emlékeztető környezet iránt. A kontroll vírus-injektált anyák preferencia indexe $[100 * (\text{kölyök-asszociált kompartmentben töltött idő} - \text{semleges kompartmentben töltött idő}) / (\text{kölyök-asszociált kompartmentben töltött idő} + \text{semleges kompartmentben töltött idő})]$ szignifikánsan magasabb, mint a PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyák preferencia indexe. A PTH2 receptor antagonist expresszióját követő csökkent kölyök-asszociált kompartment preferencia arra utal, hogy az endogén TIP39 is lehet szerepe az anyai motiváció kontrolljában. A medialis preopticus területen elhelyezkedő Fos-expresszáló neuronokat körülvevő TIP39-tartalmú terminálisok a potenciális endogén forrásai az anyai motivációt befolyásoló TIP39-nek. Előzetesen azt is kimutattuk, hogy a PTH2 receptorok jelen vannak a preopticus területen és eloszlásuk nagyon hasonló a TIP39 rostok ezen a területen megfigyelt lefutásához. Retrográd és anterográd neuronális nyomkövető anyagok felhasználásával erős bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy ezek a TIP39-tartalmú axonok a PIL-ből származnak. Eredményeink szerint tehát a PIL-beli TIP39 neuronoknak egyik szerepe lehet, hogy a kölyök felől érkező szenzoros szignálokat

továbbítsák az MPO|A felé, amely más motivációs központokra hatva, a bejövő információk alapján a motivációs irányultságot a kölykök irányába tereli.

V. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Megállapítottuk, hogy a posterior intralaminaris thalamicus komplex neurokémiai markerek alapján két szubdivízióra osztható. A TIP39 neuronok a galanin rostokkal együtt a PIL medialis szubdivíziójában helyezkednek el. Míg a CGRP neuronok a laterális szubdivízióban találhatóak meg. A TIP39 neuronok koexpresszióját mutattuk ki calbindinnal a PIL területén, amely az intralaminaris magvak egyik fő sejtmarkere.

2. Nyomkövető pályajelölési módszerek, pályaatvágás és Fos aktivációs technika segítségével demonstráltuk, hogy a TIP39 neuronok a PIL-ből a hypothalamus több területére is vetülnek. Ezek között szerepelnek azok a hypothalamicus magok, melyek az anyai adaptációk szabályozásában központi helyet foglalnak el. Leírtuk, hogy a PIL kap felszálló bemenetet a nucleus gracilis-tól és cuneatus-tól, a gerincvelőből szenzoros információt szállító fasciculus dorsalis és a lemniscus medialis átkapcsoló magjaitól. Direkt gerincvelői bemenet szintén eléri a PIL-t, valószínűleg a tractus spinothalamicus kollaterálisain keresztül. Kísérleteink során használt protokoll szerint a szopási aktus aktiválta a PIL neuronjait, mivel a Fos expresszió a szoptatás hatására szignifikánsan magasabb volt, mint a közvetlen kontaktus nélküli anya-kölyök együttlét esetén. Egy hasonló kísérleti elrendezésben, Fos-expresszáló neuronokat írtak le a gerincvelő mély rétegeiben a thoracalis és lumbalis szakaszon a szoptatás hatására,

éppen ott, ahol a retrográdan jelölt neuronokat megfigyeltük a CTb PIL-be való injektálása után. Mindezekből arra következtetünk, hogy a PIL TIP39 neuronjai a gerincvelőből származó szopási információt továbbítják a hypothalamus irányába.

3. Leírtuk, hogy a pubertás utáni időszak alacsony szintjével szemben anyákban a TIP39 neuronok aktiválódnak a PIL-ben és az MPL-ben, míg a PVG területén a TIP39 expressziójának növekedését nem tapasztaltuk. A TIP39-el ellentétben a PTH2 receptor expressziója a postnatalis egyedfejlődés során végig magas szinten marad, így a megjelenő TIP39 képes hatni a már jelenlévő receptorán. Mindez arra utal, hogy a TIP39 neuropeptidnek szerepe lehet az anyai működések szabályozásában. Mivel irodalmi adatok szerint az MPL a lemniscus lateralis magjainak közvetlen közelében helyezkedik el és anatómiai kapcsolatban áll a hallási információk feldolgozásában részt vevő agyrégiókkal, valamint nagy intenzitású zaj aktiválja a paralemniscalis TIP39 neuronokat, azt feltételezzük, hogy a paralemniscalis TIP39 neuronokat a kölykök által kiadott ultrahangok aktiválhatják és a TIP39 neuronok az MPL-ben közvetíthetik a kölykök ultrahangos sírását magasabb agyi központok felé, ezáltal hozzájárulva az anyai adaptációs folyamatok lejátszódásához a postpartum időszakban.

4. Jelen dolgozatban funkcionális bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a TIP39 hatással van a prolaktin felszabadulásra a thalamo-arcuatus projekción keresztül és az anyai motivációra a thalamo-preopticus projekción keresztül. Két, egymástól független módszerrel is kimutattuk, hogy a PTH2 receptor antagonista blokkolja a szopási inger által kiváltott prolaktin felszabadulást. Ezzel elsőként igazoltuk, hogy a hypothalamus

mediobasalis területén felszabaduló TIP39 szerepet játszik a prolaktin szekréció szabályozásában. Emellett szintén elsőként mutattuk ki a preoptikus területen elhelyezkedő PTH2 receptorok gátlásával, hogy az itt felszabaduló TIP39 hozzájárul az anyai motiváció kialakulásához vagy fenntartásához. Összefoglalva tehát egy, a hypothalamusba vetülő peptiderg felszálló pályát írtunk le és jellemeztük, mint ami a szopási ingerek prolaktin felszabadulásra, valamint az anyai motivációra kifejtett hatását közvetíti. A TIP39-PTH2 receptor rendszer emberben és patkányban korábban leírt hasonlósága okán feltételezhetjük, hogy eredményeink a nőkben lezajló, szoptatást befolyásoló folyamatokra is extrapolálhatóak.

VI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. Az értekezés témájában megjelent publikációk

1. **Cservenák M**, Bodnár I, Usdin TB, Palkovits M, Nagy GM, Dobolyi A. (2010) Tuberoinfundibular Peptide of 39 Residues Is Activated during Lactation and Participates in the Suckling-Induced Prolactin Release in Rat. *Endocrinology*, 151: 5830-5840. **IF: 4,993**

2. Varga T, Mogyoródi B, Bagó AG, **Cservenák M**, Domokos D, Renner E, Gallatz K, Usdin TB, Palkovits M, Dobolyi A. (2012) Paralemniscal TIP39 is induced in rat dams and may participate in maternal functions. *Brain Struct Funct*, 217: 323-335. **IF: 7,837**

2. Az értekezés témájában készített idézhető absztraktok

1. **Cservenák M**, Usdin TB, Palkovits M, Dobolyi A. (2009) Activation of TIP39 neurons in the lateral subparafascicular area of mother rats. 12th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society (MITT), Budapest. Frontiers in Systems Neuroscience. Conference Abstract, doi: 10.3389/conf.neuro.01.2009.04.007.

2. **Cservenák M**, Usdin TB, Palkovits M, Dobolyi A. (2009) TIP39-neuropeptidet szintetizáló idegsejtek a posterior intralamináris talamikus magokban: aktiválódás szoptatós anya patkányokban. A Magyar Anatómus Társaság 15. Kongresszusa, Budapest.

3. **Cservenák M**, Bodnár I, Usdin TB, Palkovits M, Nagy GM, Dobolyi A. (2010) Intracerebroventricular injection of a parathyroid hormone 2 receptor antagonist abolishes suckling induced prolactin release. International IBRO Workshop, Pécs. Frontiers in Systems Neuroscience. Conference Abstract: IBRO International Workshop 2010. doi: 10.3389/conf.fnins.2010.10.00081.

4. **Cservenák M**, Bodnár I, Usdin TB, Palkovits M, Nagy GM, Dobolyi A. (2011) Tuberoinfundibular peptide of 39 residues is activated during lactation and participates in the suckling-induced prolactin release in rat, 13th Conference of the Hungarian Neuroscience Society (MITT), Budapest. Frontiers in Systems Neuroscience. Conference Abstract, doi: 10.3389/conf.fnins.2011.84.00108.

5. **Cservenák M**, Bodnár I, Usdin TB, Palkovits M, Nagy GM, Dobolyi A. (2011) A new component in the regulation of prolactin release in lactation: The TIP39-PTH2 receptor system, The Joint Conference (FAMÉ 2011) of the LXXVth Meeting of the Hungarian Physiological Society, XVth Meeting of the Hungarian Society of Anatomists, Experimental Section of the Hungarian Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Hungarian Society for Microcirculation and Vascular Biology, Pécs. *Acta Physiologica* 2011; Volume 202, Supplement 684: P14.

6. Dobolyi A, **Cservenak M**, Usdin TB, Palkovits M. (2011) Maternally activated posterior thalamic neurons possibly convey the suckling information towards hypothalamic centers, 93rd Annual Meeting & Expo of the Endocrine Society (ENDO), Boston, USA, *Endocrine Reviews*, 32: P3-235.

7. **Cservenák M**, Bodnár I, Nagy GM, Usdin TB, Palkovits M, Dobolyi A. (2012) Posterior thalamic TIP39 neurons project to the medial hypothalamus and regulate prolactin secretion in mothers, IBRO International Workshop, Szeged. *Clinical Neuroscience* 2012; Volume 65, Supplement 1: P14.

3. Egyéb, az értekezéshez fel nem használt publikációk

1. Szabó ER, **Cservenák M**, Dobolyi A. (2012) Amylin is a novel neuropeptide with potential maternal functions in the rat. *FASEB J*, 26: 272-281. **IF: 5,704**

VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Dobolyi Árpádnak, aki megtanított az igényes, önálló kutatói munka lépéseinek elsajátítására. Ezúton szeretném neki megköszönni segítségét és támogatását, tanácsait, amelyekkel szakmai fejlődésemhez hozzájárult. Szeretném megköszönni a Neuromorfológiai Laboratórium vezetőjének, Palkovits Miklós professzor úr támogatását, akitől lehetőséget kaptam, hogy a kutatócsoportban dolgozhassam, és akinek jóindulatú tanácsai és segítsége végigkísért a Ph.D. munkám során.

Külön köszönet illeti Nagy M. György professzor urat és Dr. Bodnár Ibolyát, a prolaktin mérésekben nyújtott szakmai és gyakorlati segítségükért.

Köszönettel tartozom továbbá közvetlen kollégáimnak, Szabó Éva Rebekának, Toronyay-Kasztner Magdolnának, Balázs Tamásnak és Renner Évának szakmai és emberi támogatásukért, Dellaszéga-Lábas Viktóriának, Hanák Nikolettnek és Deák Szilviának a kísérletek gyakorlati kivitelezésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért, valamint a Neuromorfológiai Laboratórium többi dolgozójának a jó hangulatú, intellektuálisan stimuláló légkör megteremtéséért.

Végül, de nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani Szüleimnek tanulmányaim során nyújtott szerető támogatásukért, valamint Vőlegényemnek a sok-sok biztatásért és türelméért.