

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

Doktori értekezés

Dr. Bagó Attila György

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Dobolyi Árpád, Ph.D.

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

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

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Bevezetés	7
2.1. A parathormon 2 (PTH2) receptor	7
2.1.1. Parathormon receptorok	7
2.1.2. A PTH2 receptor izolálása.....	7
2.1.3. A PTH2 receptor lokalizációja	8
2.1.4. A PTH2 receptor endogén ligandumának keresése	9
2.2. A tuberoinfundibularis peptid 39 (TIP39).....	11
2.2.1. Az endogén ligandum izolálása	11
2.2.2. TIP39 gén azonosítása és szerkezete	11
2.2.3. A TIP39 mint a PTH2 receptor liganduma	13
2.2.4. A TIP39 lokalizációja	14
2.2.5. Életkori és nemi különbségek a TIP39 expressziójában	17
2.3. A TIP39-PTH2 receptor rendszer leírása rágcsálókban	18
2.4. A TIP39-PTH2 receptor rendszer funkcionális vizsgálata	19
3. Célkitűzések	23
3.1. TIP39-et expresszáló neuronok vizsgálata patkányokban embrionális és postnatalis korban	23
3.2. TIP39-PTH2 receptor rendszer kimutatása főemlős agyban	24
4. Anyagok és módszer.....	25
4.1. Kísérleti állatok.....	25
4.1.1. Patkány	25
4.1.2. Majom szövetek.....	26
4.2. Humán agyszövet	26
4.3. Immuncitokémia	28
4.3.1. TIP39 immunfestés patkány agyon	28
4.3.2. TIP39 és CGRP kettős immunfestés patkány agyban.....	29
4.3.3. PTH2 receptor immunfestés majom agyban.....	29
4.3.4. PTH2 receptor és VGLUT2 kettős immunfestés majom agyban.....	30
4.3.5. PTH2 receptor immunfestés humán agyban	30
4.3.6. PTH2 receptor és CRH vagy somatostatin kettős immunfestés humán agyban	31
4.4. RT-PCR vizsgálatok emberi agyon	32
4.5. In situ hibridizáció	33
4.5.1. TIP39 in situ hibridizációs hisztokémia patkány agyon	33
4.5.2. TIP39 és PTH2 receptor in situ hibridizációs hisztokémia majom agyon	33
4.6. Mikroszkópos vizsgálatok és képrögzítés	34
5. Eredmények	36
5.1. Patkány agyon végzett vizsgálatok.....	36
5.1.1. TIP39 expresszió az embrionális és korai posztnatalis patkány agyban	36
5.2. Majom agyszöveten végzett vizsgálatok.....	44
5.2.1. TIP39 mRNS eloszlásának kimutatása majom agyban in situ hibridizációs hisztokémiával	44

5.2.2.	PTH2 receptor mRNS kimutatása majom agyban in situ hibridizációs hisztokémiával.....	45
5.3.	Humán agyszöveten végzett vizsgálatok.....	50
5.3.1.	PTH2 receptor immunreaktivitás eloszlása a humán agyszövetben	50
5.3.2.	PTH2 receptor expresszió eloszlása humán agyszövetben RT-PCR vizsgálatokkal	53
5.3.3.	PTH2 receptor immunreaktív rostok viszonya emberi hypothalamus somatostatin és CRH termelő neuronjaihoz.....	55
5.4.	A PTH2 receptor térképezés összefoglaló eredményei főemlős és rágcsáló agyon. 57	
6.	Megbeszélés.....	61
6.1.	Anatómiai leírás	61
6.2.	Metodikai megfontolások.....	63
6.3.	A TIP39 expresszió megjelenése a korai életszakaszban patkányban	65
6.4.	A TIP39 és a PTH2 receptor expressziója főemlős agyban.....	68
6.4.1.	TIP39-et expresszáló sejtek	68
6.4.2.	PTH2 receptort expresszáló sejtek humán és majom agyban	68
6.4.3.	PTH2 receptor mRNS eloszlás – homológia és különbözőség rágcsáló és főemlős agyban	69
6.4.4.	PTH2 receptor immunreaktivitás – rostok és terminálisok a főemlős agyban.....	70
6.5.	A TIP39 feltételezett hatásmechanizmusa a hypothalamus-hypophysis rendszeren	71
6.6.	Összegzés	74
7.	Következtetések	75
8.	Összefoglalás.....	77
9.	Summary	78
10.	Irodalomjegyzék.....	79
11.	Saját közlemények jegyzéke.....	88
11.1.	Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények	88
11.2.	Az értekezés témájában készített idézhető absztraktok.....	88
11.3.	Egyéb közlemények.....	89
12.	Köszönetnyilvánítás	91

1. Rövidítések jegyzéke

A jegyzékben az ábrákon használt rövidítéseknek megfelelő anatómiai elnevezéseket soroltam fel. Mind a rövidítés jegyzékben, mind a dolgozatban vegyesen fordulnak elő hagyományos latin, illetve latin eredetű, de már angol formában elterjedt anatómiai nevek. A kettősség oka az, hogy a magyar idegsebészeti-neurológiai-idegtudományi köznyelvben mindennaposan használt latin, vagy latinos anatómiai neveket (például nucleus ruber, eminentia mediana, lemniscus medialis) nem akartam angol formájukban használni (red nucleus, median eminence, cerebral aqueduct, medial lemniscus), mert ez idegenül hangzott volna a magyar szövegkörnyezetben. Természetesen a hagyományos latin alakban nem létező, vagy latin formában széles körben nem használt neuroanatómiai elnevezéseket (például bed nucleus of stria terminalis, dorsal vagal complex) a nemzetközi irodalomban elterjedt és a neuroanatómiai atlaszokban is közölt angol formájukban használom.

Rövidítés	Angol elnevezés	Latin elnevezés
ac	anterior commissure	commissura anterior
AcN	accumbens nucleus	nucleus accumbens
Ahi	amygdalo-hippocampal transition zone	
al	ansa lenticularis	ansa lenticularis
AM	anteromedial thalamic nucleus	
AN	accumbens nucleus	nucleus accumbens
AON	anterior olfactory nucleus	nucleus olfactorius anterior
Apr	anteroprincipal thalamic nucleus	
aq	cerebral aqueduct	aquaeductus cerebri
BL	basolateral amygdaloid nucleus	
BNST	bed nucleus of the stria terminalis	
CeA	central amygdaloid nucleus	
CG	periaqueductal central gray	
CoA	cortical amygdaloid nucleus	
cp	cerebral peduncle	pedunculus cerebri
cu	cuneate fasciculus	fasciculus cuneatus
DG	dentate gyrus	gyrus dentatus
DH	dorsal horn	
dlf	dorsolateral fasciculus	
DLPAG	periaqueductal gray, lateral subdivision	
DM	dorsomedial hypothalamic nucleus	
DpMe	deep mesencephalic nucleus	
DR	dorsal raphe nucleus	
DTg	dorsal tegmental nucleus	
EGP	external globus pallidus	
f	fornix	fornix
fr	fasciculus retroflexus	fasciculus retroflexus

IGP	internal globus pallidus	
Inf	infundibular nucleus	
L2	lamina 2 of the dorsal horn	
LG, CGL	lateral geniculate body	corpus geniculatum laterale
LGN	lateral geniculate nucleus	
LH, LHA	lateral hypothalamic area	
ll	lateral lemniscus	lemniscus lateralis
LPAG	periaqueductal gray, lateral subdivision	
LS	lateral septal nucleus	nucleus septi lateralis
LV	lateral ventricle	ventriculus lateralis
M5	motor trigeminal nucleus	nucleus motorius nervi trigemini
MD	mediodorsal thalamic nucleus	
me	median eminence	eminentia mediana
MeA	medial amygdaloid nucleus	
mbf	medial forebrain bundle	
MG, CGM	medial geniculate body	corpus geniculatum mediale
MGN	medial geniculate nucleus	
ml	medial lemniscus	lemniscus medialis
mlf	medial longitudinal fasciculus	fasciculus longitudinalis medialis
MMG	medial nucleus of the medial geniculate body	
MMN	medial mamillary nucleus	
MPA	medial preoptic area	
MPL	medial paralemniscal nucleus	nucleus paralemniscalis medialis
MPN	medial preoptic nucleus	
nu	motor oculomotor nucleus	nucleus motorius nervi oculomotorii
OT	olfactory tubercle	tuberculum olfactorium
ot	optic tract	tractus opticus
ox	optic chiasm	chiasma opticum
Pa	hypothalamic paraventricular nucleus	
PAG	periaqueductal gray	
PBG	parabigeminal nucleus	
PBL	lateral parabrachial nucleus	
Pe	hypothalamic periventricular nucleus	
PH	posterior hypothalamic nucleus	
PIL	posterior intralaminar complex	
Pir	piriform cortex	
Pn	pontine nuclei	nuclei pontis
PnO	pontine reticular nuclei	
PP	peripeduncular nucleus	
Pu	putamen	putamen nuclei lentiformis
Pul	pulvinar thalami	pulvinar thalami
PVG	periventricular gray of thalamus	
PVT	paraventricular thalamic nucleus	
py	pyramidal tract	tractus pyramidalis
R	red nucleus	nucleus ruber
rs	rubrospinal tract	tractus rubrospinalis
Rt	reticular thalamic nucleus	
Sag	sagulum nucleus	
SC	superior colliculus	colliculus superior
SCh	suprachiasmatic nucleus	
scp	superior cerebellar peduncle	pedunculus cerebellaris superior
SI	substantia innominata	substantia innominata

sm	stria medullaris	stria medullaris thalami
SN	substantia nigra	substantia nigra
SO	supraoptic nucleus	nucleus supraopticus
SOC	superior olivary complex	
SPF	subparafascicular area	
SPF	subparafascicular nucleus	nucleus subparafascicularis
SPFp	subparafascicular nucleus, parvicellular part	
VA	ventroanterior thalamic nucleus	
VLL	ventral nucleus of the lateral lemniscus	
VMG	ventral nucleus of the medial geniculate body	
VMH	hypothalamic ventromedial nucleus	
VPL	ventral posterolateral thalamic nucleus	
VPM	ventral posteromedial thalamic nucleus	
ZI	zona incerta	zona incerta
7	motor facial nucleus	nucleus nervi facialis
3V	third ventricle	ventriculus tertius, ventriculus III
4n	trochlear nerve	nervus trochlearis
4V	fourth ventricle	ventriculus quartus, ventriculus IV
5n	trigeminal nerve	nervus trigeminus

2. Bevezetés

2.1. A parathormon 2 (PTH2) receptor

2.1.1. Parathormon receptorok

A parathormon (PTH) receptorok a II. típusú (vagy más néven B osztályba sorolt, glucagon/secretin típusú) G-proteinhez kapcsolt receptorok közé tartoznak, hasonlóan a glucagon, a calcitonin, a calcitonin related peptide (CGRP), gastric inhibitory peptide (GIP), a growth hormone releasing hormone (GHRH), parathyroid hormone related peptide (PTHrP), a secretin és a vasoactive intestinal peptide (VIP) ismert receptoraihoz. Ezek a receptorok hét transzmembrán doménnel rendelkeznek (heptahelikális szerkezet), a receptor struktúrát az extracellularis hurkokban levő, az egész receptor családra jellemző cisztein tartalmú szakaszok között kialakult diszulfid hidak biztosítják. Hatásukat tipikusan több másodlagos hírvivő mechanizmus útján fejtik ki (Usdin és mtsai 2002). A Gs protein α -alegységén keresztül, a ciklikus-adenozin-monofoszfát (cAMP) szintézis serkentésével a protein-kináz A-t (Segre és mtsai 1992), míg a Gq fehérjén keresztül a foszfolipáz-C (PLC) és inozitol-trifoszfát (IP3) kaszkádot aktiválják (Friedman és mtsai 1999). Ez utóbbi intracellularis Ca^{2+} szint emelkedéshez vezet, mely vizsgálatok szerint elsősorban citoplazmában jelenlévő endogén Ca^{2+} raktárakból történik (Tanaka és mtsai 1995). Jelenleg emlősben kétfajta PTH receptort ismerünk, a PTH1 és PTH2 receptorokat (Usdin és mtsai 1995). Az emlősben leírt két PTH receptor mellett a zebrahalban (*Danio rerio*) egy harmadik receptort is izoláltak, melyet zPTH3 receptornak nevezünk (Rubin és mtsai 1999; Rubin és Juppner, 1999).

2.1.2. A PTH2 receptor izolálása

A PTH receptorát (PTH1 receptor) 1991-ben izolálták (Juppner és mtsai 1991). Ezen a receptoron keresztül fejt ki fiziológiás hatását a PTH, mely a vese Ca^{2+} reszorpciójának és a csontrendszer osteoclast aktivitásának fokozásával a szérum Ca^{2+} szint emelésében

nyilvánul meg. 1995-ben a patkány genom feltérképezése során szekvencia hasonlóság alapján találták meg egy új, addig le nem írt, ismert ligandummal nem rendelkező receptor génjét, majd magát a receptor fehérjét is (Usdin és mtsai 1995). Mivel az új receptor aminosav sorrendje 70%-ban egyezett a PTH receptoréval (PTH1 receptor), PTH 2 receptornak nevezték el (PTH2 receptor). A hasonlóság ellenére a patkány PTH (rPTH) ezt a receptort nem aktiválta, ezért a PHT2 receptort kezdetben az „orphan” (árva) receptorok közé sorolták. A ligandum keresés első lépése a receptor anatómiai lokalizálása volt.

2.1.3. A PTH2 receptor lokalizációja

A PTH1 receptor elsősorban a vesében és a csontszövetben fordul elő, bár kis mennyiségben a központi idegrendszerben is kifejeződik (Hurwitz, 1996; Rizzoli és mtsai 1992). Ezzel szemben Northern blot technikával a legtöbb PTH2 receptort a központi idegrendszerben (Usdin és mtsai 1995), valamivel kisebb mennyiségben a herékben, a tüdőben és a placentában találták. In situ hibridizációval ezen kívül PTH2 receptor jelenlétét igazolták az artériák endotheliumában, bronchusokban, vese glomerulusokban, a pancreasban, az ovariumban, a mellékherében, a pajzsmirigyben és a csontokban (Usdin és mtsai 1996; Usdin és mtsai 1999a).

A PTH2 receptor központi idegrendszeri eloszlása, melyet részletesen leírtak patkányban és egérben, jelentősen különbözik a PTH1 receptor idegrendszeri lokalizációjától (Faber és mtsai 2007; Wang és mtsai 2000). A PTH2 receptor neuroanatómiai feltérképezését reverz-transzkriptáz PCR-ral (RT-PCR), in situ hibridizációval, immunhisztokémiával és transzgén egértörzs felhasználásával végezték (Faber és mtsai 2007). Érdekes, hogy míg patkányban a PTH2 receptort kifejező sejtek immunhisztokémiailag jól festhetőek és megfelelnek az in situ hibridizációval talált lokalizációknak (Wang és mtsai 2000), addig egérben PTH2 immunpozitív sejteket immunfestéssel kimutatni nem tudtak, csak a PTH2 receptor immunpozitív rostokat, annak ellenére, hogy a PTH2 receptort expresszáló neuronok jelenlétét egérben is igazolták in situ hibridizációval (Faber és mtsai 2007).

A korábban közölt vizsgálatok a rágcsáló agyban PTH2 receptort az alábbi területeken írtak le (Dobolyi és mtsai 2006a; Dobolyi és mtsai 2002; Faber és mtsai 2007; Wang és mtsai 2000):

Limbikus rendszer: nucleus olfactorius anterior, tuberculum olfactorium, nucleus lateralis septi, bed nucleus of the stria terminalis, amygdala, amygdala-hippocampal transitional zone, hippocampus, cortex, gyrus dentatus, subiculum, claustrum, nucleus endopiriformis, nucleus accumbens, nucleus caudatus, putamen, striatum ventralis része, substantia innominata.

Thalamus: corpus geniculatum mediale, középvonali és intralaminaris magok, nucleus habenulae.

Hypothalamus: medialis praeopticus terület, nucleus paraventricularis, periventricularis magok, nucleus arcuatus, lateralis hypothalamus, nucleus tuberomamillaris, ventralis praemamillaris terület.

Mesencephalon: lateralis interpeduncularis magok, paranigralis magok, raphe magok, nucleus colliculi superioris, nucleus colliculi inferioris.

Pons: nucleus sphenoidalis, nucleus corporis trapezeoidi, cochlearis magok.

Medulla oblongata: nucleus tractus solitarii, nucleus és tractus spinalis nervi trigemini.

Cerebellum: cortex.

Gerincvelő: a szürkeállomány dorsalis szarva, ganglion spinale.

2.1.4. A PTH2 receptor endogén ligandumának keresése

A PTH1 receptor két endogén ligandumát ismerjük, a PTH-t, valamint a parathormon related peptide-t (PTHrP), melyek körülbelül azonos mértékben aktiválják a PTH1

receptort (Gensure és mtsai 2005). A PTH a mellékpajzsmirigyben termelődik, elsődleges szerepe a szervezet Ca^{2+} homeosztázisának biztosítása, melyet a Ca^{2+} renalis reszorpciójának és csontban raktározott Ca^{2+} mobilizálásának szabályozásával hajt végre. Élettani hatásában a pajzsmirigy világos sejtjei által termelt calcitonin hatását ellensúlyozza. A PTHrP 1988 óta ismert, különböző szervekben (csont, emlő, bőr, vese) termelődik. Élettani szerepe sokrétű, érinti az enchondralis csontosodást, a fogzást, az emlők fejlődését, de a PTH-hoz hasonló hatással is rendelkezik (Martin és mtsai 1997). Kóros körülmények között egyes humán malignus tumorok szekretálhatnak PTHrP-t, ami paraneopláziás tünetként hypercalcaemiához vezet.

Az emlősökkel ellentétben, a zebrahalban a PTH két formáját is leírták (zPTH1 és zPTH2), itt a kétfajta PTH és a három ismert receptor (zPTH1, zPTH2 és zPTH3 receptorok) az emlősökénél komplexebb rendszert alkot (Gensure and Juppner, 2005; Gensure és mtsai 2005).

A humán PTH (hPTH) erős agonistaként hat a humán PTH1 és parciális agonistaként a humán PTH2 receptorokon (hPTH2 receptor), és hatástalan a patkány PTH2 receptoron (rPTH2 receptor). A patkány PTH (rPTH) erős agonistaként hat a patkány PTH1 receptoron (rPTH1 receptor) és nem hat a patkány PTH2 receptoron (rPTH2 receptor). A PTHrP nem hat sem a patkány, sem a humán PTH2 receptoron (rPTH2 receptor, hPTH2 receptor) (Goold és mtsai 2001).

Az a tény, hogy a PTH2 receptor elsősorban a központi idegrendszerben fordul elő és PTH az idegrendszerben nem mutatható ki, valamint, hogy a humán PTH (hPTH) csak gyenge parciális agonistaként hat a PTH2 receptoron (Usdin és mtsai 1995) és a patkány PTH (rPTH) nem hat a patkány PTH2 receptoron (rPTH2 receptor), arra utalt, hogy a PTH2 receptor saját, eddig ismeretlen endogén ligandummal rendelkezik, ami a központi idegrendszerben termelődik.

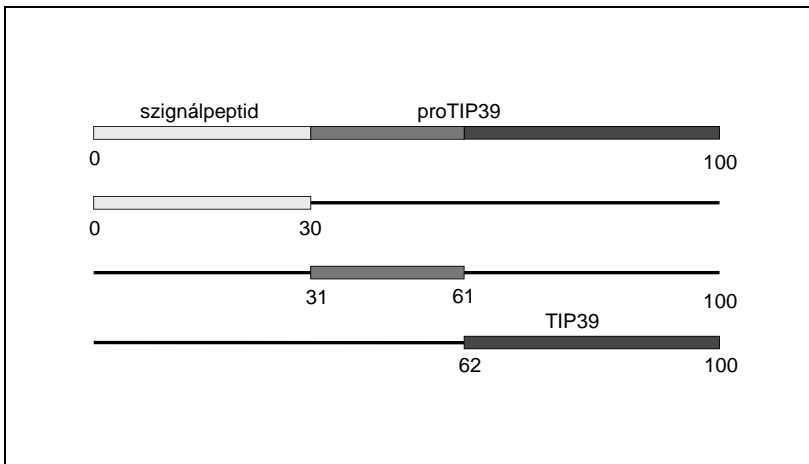
2.2. A tuberoinfundibularis peptid 39 (TIP39)

2.2.1. Az endogén ligandum izolálása

Az endogén ligandum keresését PTH2 receptorral transzfektált HEK293 sejt kultúrán, a receptor aktiválódásra bekövetkező cAMP szint mérésével végezték (Usdin és mtsai 1999b). Mivel a korábbi vizsgálatokkal PTH2 receptorok bőséges előfordulását igazolták az agytörzsben és a diencephalonban, feltehető volt, hogy az endogén ligandum is innen származik. Friss szarvasmarha agy különböző területeiből készített homogenizátumokkal végzett stimulációs vizsgálatok során a hypothalamusból származó kivonattal nagyobb cAMP választ kaptak a receptoron, mint PTH-ra (Hoare és mtsai 1999; Usdin, 1997), így hypothalamikus homogenizátumok a további tisztítását végezték el. Savas extrakcióval végül 25kg szarvasmarha hypothalamus szövetből izoláltak és tömegspektrometriával azonosítottak egy 39 aminosavból álló, a PTH2 receptorhoz szelektíven kötődő, azt potensen aktiváló ligandumot, melyet tuberoinfundibularis peptid 39-nek (tuberinfundibular peptide of 39 residues, TIP39) neveztek el (Usdin és mtsai 1999b).

2.2.2. TIP39 gén azonosítása és szerkezete

A szarvasmarha TIP39 (bTIP39) tisztítását és izolálását követően szekvencia homológia alapján azonosították a humán, a patkány és egér TIP39 gént (Dobolyi és mtsai 2002; Hansen és mtsai 2002; John és mtsai 2002). A humán TIP39 gén a 19-es kromoszóma hosszú karján helyezkedik el, 19q13.33 pozícióban. A TIP39 gén két exont és egy közbeékelte intront tartalmaz. A kódolt prekursor fehérje 100 aminosavból áll, az elülső exon az 1-34 pozícióban lévő aminosavakat, a hátsó exon a 35-100 elhelyezkedő aminosavakat kódolja. A TIP39 szintézise során a prekursor peptid két proteolízisen megy át, az 1-30 aminosavak egy szignálpeptidet kódolnak, míg 31-100 aminosavak a propeptidet (proTIP39), melyből a második hasítással jön létre a tisztítással nyert TIP39, mely az eredeti prekursor peptid 62-100 pozícióban lévő aminosavait tartalmazza (1. ábra).



1. ábra

A TIP39 egy 100 aminosavból álló pre-pro-TIP39 prekurzorból származik, két proteolízissel. A 30/31 aminosav között hely lízise lehasítja a szignálpeptidet. A hasítás után egy 70 aminosavból álló propeptid marad (proTIP39). A propeptid első 30 aminosavának leválasztása után keletkezik maga a TIP39, mely az eredeti prekurzor 62-100 aminosavait tartalmazza.

A humán TIP39 (hTIP39) megegyezik a szarvasmarhából izolált TIP39-el (bTIP39) (Della Penna és mtsai 2003), hasonlóan a patkány TIP39 (rTIP39) és az egér TIP39 (mTIP39) aminosav sorrendje is azonos (Della Penna és mtsai 2003; Dobolyi és mtsai 2003b). A humán TIP39 89%-ban azonos az egér/patkány TIP39-el, attól négy aminosavban tér el (2. ábra).

TIP39	SLALADDAAFRERARLLAALERRHWLNSYMHKLLVLDAP	humán / szarvasmarha
TIP39	SLALADDAAFRERARLLAALERR R W L D SYM Q K L L L LDAP	patkány / egér

2. ábra

A humán (szarvasmarha) és a patkány (egér) TIP39 aminosav sorrendje, a négy különböző aminosavat színessel emeltük ki.

A TIP39-et nemcsak emlősökben, hanem csontos halakban is kimutatták, mégpedig a következő fajokban (Papasani és mtsai 2004; Shoemaker és mtsai 2006): fugu (Takifugu rubripes), zebrahal (Danio rerio), nílusi és mozambiki tilápia (Oreochromis niloticus, Oreochromis mossambicus). Ez utóbbi két fajban a TIP csak 38 aminosavból áll, így TIP38-nak nevezzük (Shoemaker és mtsai 2006). A halakban leírt TIP változatok kb. 60%-os homológiát mutatnak az emlős TIP-el. A zebrahalban korábban említett zPTH2 nem azonos a zTIP39-el, az előbbi inkább az emlős PTH-ra, míg az utóbbi az emlős TIP39-re hasonlít.

2.2.3. A TIP39 mint a PTH2 receptor liganduma

Farmakológiai vizsgálatok szerint a TIP39 szelektíven és nagy affinitással kötődik a PTH2 receptorhoz. A PTH parciális agonistaként hat a PTH2 receptoron, de más jellegű választ találunk TIP39 vagy PTH okozta aktiválódáskor. Míg PTH-ra csak átmeneti és kismértékű cAMP válasz alakul ki, addig a TIP39 tartósan magas cAMP akkumulációt, protein-kináz C aktivációt, receptor internalizációt okoz, hatására átmeneti deszenzitizáció alakul ki. A humán TIP39 (hTIP39) nem hat sem a humán PTH1 receptoron (hPTH1 receptor), sem a zebrahal PTH1 és PTH3 receptorán (zPTH1 és zPTH3 receptorok), viszont aktiválja a humán, a patkány, és a zebrahal PTH2 receptort is (Goold és mtsai 2001).

Az előbbieket arra utaltak, hogy a PTH, ami az idegrendszerben nem található meg, és a PTH2 receptoron csak enyhe átmeneti aktiválódást okoz, nem lehet a PTH2 receptor fiziológiás liganduma. A fiziológiás ligandum nagy valószínűséggel a PTH2 receptorhoz nagy szelektivitással kötődő és annak tartós aktiválódását okozó, a központi idegrendszerben is jelenlévő új neuropeptid, a TIP39.

A két ligandum (TIP39 és PTH) PTH receptorokon való kötődésének hatásait, melyeket irodalmi adatok alapján korábbiakban részleteztünk, az 1. táblázatban foglaltuk össze.

	hPTH1R	hPTH2R	rPTH1R	rPTH2R
hPTH	erős agonista	parciális agonista		hatástalan
rPTH		agonista	erős agonista	hatástalan
hTIP39	hatástalan	erős agonista	hatástalan	erős agonista
rTIP39	hatástalan	erős agonista	hatástalan	erős agonista
PTHrP	parciális agonista	hatástalan	parciális agonista	hatástalan

1. táblázat

A táblázatban a korábbi vizsgálatokban a humán (hPTH1R és hPTH2R) és patkány (rPTH1R és rPTH2R) parathormon 1 és parathormon 2 receptorok különböző ligandumokra adott válaszait összegeztük (hPTH humán parathormon, rPTH patkány parathormon, hTIP39 humán TIP39, rTIP39 patkány TIP39, PTHrP parathormone related peptide).

2.2.4. A TIP39 lokalizációja

TIP39 expresszióját számos szervben igazoltak. Patkányban jelentős TIP39 kifejeződést találtak RT-PCR technikával az agyszövetben és a herékben, emellett TIP39-et mutattak ki a szemben, a spinális ganglionokban (Dobolyi és mtsai 2002), a vesében és a pancreasban (Eichinger és mtsai 2002). Emberben az agyban, a tracheában, a foetalis májban, a vesében és a szívben írták le. Mivel a TIP39 a vérben nem mutatható ki, feltételezhető, hogy a szervekben auto-, vagy parakrin módon fejti ki hatását.

A PTH2 receptort tartalmazó számos agyterülettel szemben a TIP39-et expresszáló neuronok az emlős agy csak két nagyon jól körülírt helyén, a thalamusban a subparafascicularis areanak nevezett subparafascicularis mag körüli területen (Dobolyi és mtsai 2002; John és mtsai 2002), valamint a pontomesencephalicus átmenet magasságában a lemniscus lateralistól mediálisan találhatóak meg (Dobolyi és mtsai 2003a; Dobolyi és mtsai 2002). Míg a rostralis ponsban található TIP39 sejtek egy jól definiálható körülírt sejtcsoportot alkotnak, amit medialis paralemniscalis magként (MPL) sikerült azonosítani (Varga és mtsai 2008), a subparafascicularis area (SPF) TIP39 sejtei komplexebb anatómiai elrendezést mutatnak. Maga a subparafascicularis area a thalamus hátsó, ventromedialis területében helyezkedik el a fasciculus retroflexus

és a parafascicularis thalamicus mag körül. A subparafascicularis area TIP39-et expresszáló sejtjei két, morfológiailag és funkcionálisan is elkülöníthető csoportra oszlanak. Az egyik a mediális, középvonali, a parafascicularis mag magnocellularis részben elhelyezkedő, a thalamus periventricularis szürkeállományához (PVG) tartozó tömegesebb sejtcsoport (SPF-PVG), míg a másik, ettől caudalisan és lateralisán, egészen a corpus geniculatum mediale-ig húzódó, a subparafascicularis mag parvicellularis részében (SPFp) elhelyezkedő, a thalamus hátsó intralaminaris komplexumához (PIL) tartozó szétszórtabb, ritkább sejtcsoport (SPFp-PIL) (Dobolyi és mtsai 2003a). A TIP39-et expresszáló neuronok kis területre korlátozódó megjelenése ellenére TIP39-immunpozitív rostokat igen kiterjedten találunk az agyban. Roncsolással, anterográd és retrográd tracer vizsgálatokkal feltérképezték a TIP39 neuronok széles projekciós és afferens kapcsolatait.

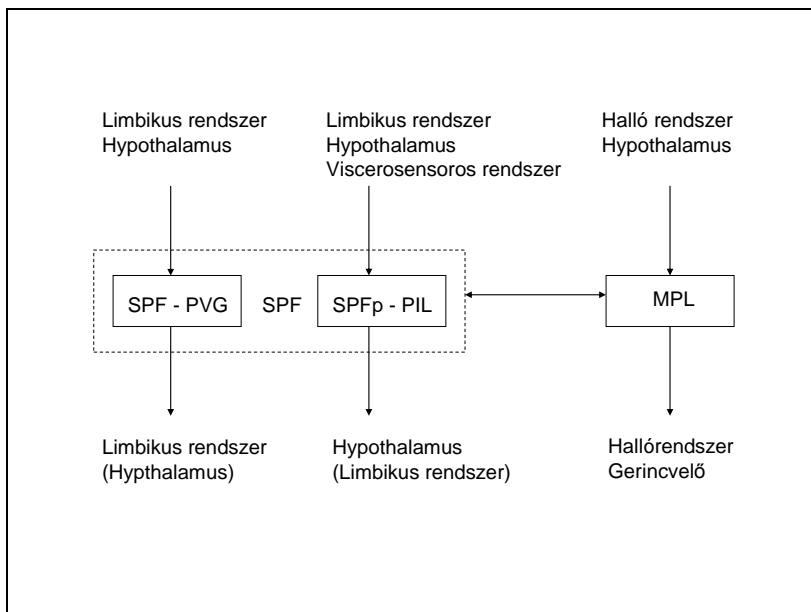
A mediális subparafascicularis, a periventricularis szürkeállományhoz (SPF-PVG) tartozó TIP39 neuronok elsődlegesen a mediális prefrontalis cortex, a nucleus septi lateralis (LS), a bed nucleus of the stria terminalis (BNST), az amygdala, a thalamus periventricularis magok, valamint a fundus striati irányába vetülnek, tehát az efferens projekció döntően a limbikus rendszer felé történik (Dobolyi és mtsai 2003a; Wang és mtsai 2006c). Az SPF-PVG jelentős bemenetet kap a limbikus rendszerből (mediális prefrontalis kéreg, ectorhinalis kéreg, subiculum, septum) és a diencephalonból, hangsúlyosan a hypothalamusból (ventromedialis, periventricularis, dorsomedialis magok, a praeopticus area, a zona incerta) (Wang és mtsai 2006b). Ez az afferentáció különbözik a középvonali és intralaminaris thalamikus magok afferens kapcsolataitól (Van der Werf és mtsai 2002), mintázatában a középagy periaquaeductalis szürkeállományának (PAG) neuronális inputjához (Beitz, 1982) hasonlatos.

A laterális subparafascicularis, a thalamus hátsó intralaminaris komplexumához tartozó TIP39 neuronok (SPFp-PIL) projekcióinak célterületei a hypothalamus paraventricularis és dorsomedialis magjai, az amygdala, valamint a mediális prefrontalis cortex, a nucleus accumbens (AN) és a bed nucleus of the stria terminalis (BNST). Itt a projekció a limbikus és a neuroendokrin rendszert célozza (Dobolyi és mtsai 2003a). Az SPFp-PIL TIP39 neuronok legfontosabb afferens kapcsolatai a limbikus rendszer (amygdala,

medialis praefrontalis cortex), a hypothalamus (lateralis praeopticus terület, paraventricularis magok), a somatosensoros kéreg, valamint az agytörzsi viscerosensoros központok felől (locus coeruleus, nucleus tractus solitarii, nucleus spinalis nervi trigemini) származnak (Coolen és mtsai 2003).

A medialis paralemniscalis mag (MPL) elsősorban az agytörzs irányába vetül, a colliculus superior mélyebb rétegeibe, a colliculus inferior külső kérgébe, a nucleus parabrachialis lateralisba, a corpus trapezoidumba, a periaquaeductalis szürkeállományba (PAG) és a gerincvelőbe (Dobolyi és mtsai 2003a), vagyis az MPL projekciója jelentős a hallórendszer agytörzsi átkapcsoló magvai irányában. Az MPL afferentációjában is hangsúlyos a hallórendszer (auditoros kéreg, corpus geniculatum mediale, colliculus superior, colliculus inferior, periolivaris terület) valamint a hypothalamus (elsősorban a ventromedialis magok) (Herbert és mtsai 1991; Varga és mtsai 2008; Winer és mtsai 1998).

Az TIP39 neuroncsoportok (PVG, PIL, MPL) egymás irányában is adnak efferenseket illetve kapnak afferentációt, viszont ez nem TIP39 sejteken keresztül történik, amint ezt retrográd tracer vizsgálatok igazolták (Varga és mtsai 2008; Wang és mtsai 2006c). Az SPF- PVG, SPFp-PIL és MPL TIP39 sejtek projekciói döntően ipsilateralisak. Legjelentősebb contralateralis vetületei PIL-nek vannak, melyek rostjai a supraopticus decussation keresztül vetülnek az ellenoldali hypothalamusba. Ezen kívül az MPL vetül az ellenoldali MPL-be, de ezt a kapcsolatot nem TIP39 rostok közvetítik (Varga és mtsai 2008) (3.ábra).



3. ábra

A TIP39-et expresszáló nagy sejtszámú csoportok legfontosabb afferens és efferens kapcsolatai. A subparafascicularis area (SPF) mediális TIP 39 sejtszámú csoportja (SPF-PVG) elsősorban a limbikus rendszer és hypothalamus felől kap bemenetet, és főleg a limbikus rendszer, kisebb mértékben a hypothalamus felé vetül. Az SPF laterális TIP39 sejtszámú csoportja (SPFp-PIL) fő afferensei a limbikus rendszer, a hypothalamus és a visceromotoros rendszer felől jönnek, efferenciája elsősorban hypothalamikus, kisebb mértékben limbikus. A pontin TIP39 sejtszámú csoport, amint mediális paralemniscalis magként (MPL) tartunk számon, afferenciát kap a hallórendszer és a hypothalamus felől, efferenciájának fő célja maga a hallórendszer és a gerincevelő.

2.2.5. Életkori és nemi különbségek a TIP39 expressziójában

Különböző életkorú (1-125 napos) patkányokon végzett in situ hibridizációs, kvantitatív RT-PCR és immuncitokémiai vizsgálatok szerint a TIP39 expresszió a subparafascicularis területen (SPF) és a mediális paralemniscalis magban (MPL) születés után folyamatosan emelkedik, tetőpontját a születés utáni 14. napon éri el, a 33. napig platon marad és ezután folyamatosan csökken (Dobolyi és mtsai 2006b). A csökkenés nagyobb mértékű hímeiben. Fiatal hím és nőstény patkányokban a TIP39 expresszió nem különbözött, de tekintettel a hímeiben bekövetkező markánsabb csökkenésre, idősebb állatokban a TIP39 mennyiségében nemi különbséget találunk, a

nőstények javára. A TIP39 kifejeződés csökkenése részben megakadályozható volt pubertás előtt végzett gonád kiirtással. A TIP39-el ellentétben a PTH2 receptor expressziója a postnatalis egyedfejlődés során változatlan maradt, és a két nem között sem találtak különbséget (Dobolyi és mtsai 2006b).

2.3. A TIP39-PTH2 receptor rendszer leírása rágcsálókban

A TIP39 neuronok a korábbiakban leírt, két jól meghatározott területen helyezkednek el (SPF, MPL), és innen a diencephalon és az agytörzs irányában hosszú TIP39-immunpozitív efferens hálózattal rendelkeznek. Ezzel szemben a PTH2R pozitív rostok a PTH2 receptor pozitív sejtestek közelségében, kiterjedten helyezkednek el elsősorban a diencephalon és agytörzs számos területén. Egér és patkány agyon végzett vizsgálatok szerint a TIP39 projekciós célterületekben a TIP39-immunpozitív és a PTH2 receptor immunpozitív rostok és végződések eloszlása azonos, még szubregionális szinten is (Dobolyi és mtsai 2003a; Dobolyi és mtsai 2006a). Ez az anatómiai helyzet, valamint az a tény, hogy farmakológiailag a TIP39 a PTH2 receptor ligandumaként viselkedik, azt bizonyítja, hogy a TIP39 a PTH2 receptort expresszáló neuronokon hat, és együtt egy új, sajátos neuropeptid-receptor rendszert alkotnak. Mivel a TIP39 immunpozitív rostok és végződések eloszlása azonos a PTH2 receptor pozitív rostokéval és a sejtesteken a PTH2 receptor immunreaktivitás mennyisége alacsony volt, elképzelhető, hogy TIP39 és PTH2R neuronok között axo-axonális kapcsolat lehet.

A korábbi vizsgálatok azt is igazolták, hogy egyes területeken a PTH2 receptor jelenléte ellenére TIP39 immunreaktivitást nem látunk, ilyen az eminentia mediana, az interpeduncularis magok, a nucleus spinalis nervi trigemini és a gerincvelő hátsó szarva. Feltételezhetjük, hogy ezeken a területeken a receptor nem, vagy pedig csak meghatározott speciális körülmények között, a TIP39 megjelenését követően aktiválódik, vagy pedig a TIP39 ismeretlen helyen auto- vagy parakrin módon képződhet, esetleg a receptoron egy ismeretlen másik neuropeptid hat.

A PTH2 receptor immunpozitív rostok glutamáterg természetét korábban igazolták patkányban (Dobolyi és mtsai 2006a). A vezikuláris glutamát transzporter (VGLUT)

felelős a preszinaptikus terminálison a glutamát szinaptikus vezikulába történő felvételéért. Jelenleg négyfajta vezikuláris glutamát transzportert ismerünk VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3 és glutamátot és aszpartátot transzportáló szialint (Fremeau és mtsai, 2001; Hrabovszky és mtsai, 2008). A patkány hypothalamuson végzett vizsgálatok szerint szinte az összes PTH2 receptor immunpozitív rost kolokalizációt mutatott VGLUT2-vel, viszont nem kolokalizált a GABA szintéziséért felelős glutaminsav-dekarboxilázzal, mely alapján arra következtethetünk, hogy a PTH2 receptor pozitív rostok glutamátergek és nem GABA-ergek. A TIP39 rostok sem GABA, sem glutamáterg markerekkel nem mutattak kolokalizációt.

2.4. A TIP39-PTH2 receptor rendszer funkcionális vizsgálata

A PTH2 receptor jelentős mennyiségben expresszálódik a gerincvelő szürkeállományának II. rétegében (Dobolyi és mtsai 2002), amely a nociceptív fájdalomérzetek továbbításának anatómiai szubsztrátja. Bár TIP39 mRNS jelenlétét a gerincvelőben kimutatni nem tudták, valamint a spinalis ganglionban is csak alacsony TIP39 expressziót mértek, ismerve a medialis paralemniscalis mag (MPL) gerincvelői projekcióját feltételezhető, hogy a gerincvelő oldalsó kötegében leszálló TIP39 rostok részt vesznek a spinalis nociceptív fájdalomérgek továbbításának szabályozásában. Ezzel összhangban, intrathecalis TIP39 adására változott az egyes fájdalmas stimulusokra adott válasz latenciája, valamint a fájdalmat elkerülő magatartás (Dobolyi és mtsai 2002; Dimitrov és mtsai 2010; LaBuda and Usdin, 2004).

A szorongást vagy depressziót modellező patkány vizsgálatokban a szisztémásan adott (exogén) TIP39 anxiolitikumszerű hatással bírt (LaBuda és mtsai 2004). TIP39-gént nem expresszáló transzgen (knock out) egereken végzett kísérletekben azt tapasztalták, hogy a TIP39-et nem tartalmazó egerek a vad típusúakhoz (TIP39-et expresszáló) képest emelkedett szorongási reakciókat mutatnak (Fegley és mtsai 2008). Ezekben az egerekben traumát követően késői fokozott szorongás, depresszió alakult ki (Coutellier and Usdin, 2010). Az affektív viselkedés szabályozásában résztvevő központok (amygdala, bed nucleus of the stria terminalis, nucleus septi lateralis, medialis

praefrontalis cortex) mind bőségesen expresszálnak PTH2 receptort, és TIP39 afferenciával is bírnak, ez képezheti a hatás anatómiai alapját.

Endokrin vizsgálatok igazolták, hogy TIP39 befolyásolja az adrenocorticotropin (ACTH), a luteinizáló hormon (LH), a növekedési hormon (GH) és az antidiuretikus hormon (ADH) szekrécióját. Intracerebroventricularisan adott TIP39 hatására plazma ACTH szint emelkedés volt megfigyelhető (Ward és mtsai 2001). In vitro vizsgálatokban TIP39 stimulációnak kitett hypothalamus szövet corticotropin releasing hormone (CRH) szekrécióval válaszolt, ezért feltételezhető, hogy az in vivo ACTH szint emelkedés is CRH mediált. Az anatómiai kapcsolat itt a hypothalamus paraventricularis magjában és az eminentia medianában talált PTH2 receptor expresszió, valamint az előbbibe történő TIP39 projekció lehet (Dobolyi és mtsai 2003a; Palkovits és mtsai 2004).

Intracerebroventricularis TIP39 beadás hatására gyors LH szint emelkedés jelentkezik, mely – in vitro vizsgálatok szerint – luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) mediál, ugyanakkor az intaperitonealisan adott TIP39-re is bekövetkező gyors válasz felveti direkt hypophysis hatás lehetőségét is, bár ez utóbbit in vitro nem sikerült igazolni (Ward és mtsai 2001).

Patkányban a hypothalamus periventricularis magjában (Pe) levő PTH2 receptorok nagyfokú kolokalizációt mutatnak az itt található somatostatint termelő neuronokkal, melyek az eminentia mediana felé vetülve résztvesznek a GH szekréció szabályozásában (Dobolyi és mtsai 2006a; Usdin és mtsai 1999a). TIP39 intracerebroventricularis beadása után a plazma GH szint csökkenését észlelték (Usdin és mtsai 2003), melyért a TIP39 stimulus által okozott somatostatin felszabadulás lehet a felelős.

Intraventricularis TIP39 beadás után plazma ADH szint csökkenést észleltek. A TIP39 hatása centrálisnak tűnt, mivel nem kísérte sem hemodinamikai, sem szérum ozmolaritás változás. Mivel az ADH szekrécióért felelős nucleus supraopticus és a paraventricularis mag magnocellularis része csak kevés PTH2 receptort fejez ki, a hatásért az opioid neuronokat tartalmazó nucleus arcuatus lehet felelős (Palkovits, 1988;

Van de Heijning és mtsai 1991), mely emellett bőven ellátott PTH2 receptor immunpozitív rostokkal is. Ezt az hipotézist támasztja alá, hogy a TIP39 hatása kivédhető volt opiát antagonistá alkalmazásával (Sugimura és mtsai 2003).

A mediális paralemniscalis mag (MPL) kiterjedt auditoros afferenciációja és efferenciációja (Varga és mtsai 2008) mindenképpen felveti a TIP39-PTH2R rendszer és a hallórendszer funkcionális kapcsolatát. Ezt támasztották alá a patkányban a hangos zaj kiváltotta stressztvizsgáló kísérletek, melyek során a döntően az MPL-ben, kevésbé a subparafascicularis areában (SPFp-PIL) elhelyezkedő TIP39 neuronok c-fos aktivációját írták le (Palkovits és mtsai 2009). Mind az MPL, mind az SPFp-PIL sejtek a hypothalamus paraventricularis magja felé is vetülnek, ahol a CRH szekretáló neuronok helyezkednek el. Ez képezheti az anatómiai alapját a nagy intenzitású auditoros ingerre bekövetkező stressz reakciónak (Palkovits és mtsai 2009).

Hím patkányban a subparafascicularis areában (SPF) párhuzamosan lezajlott ejakuláció után c-fos aktivitást írtak le (Veening and Coolen, 1998). Később igazolták, hogy ez a c-fos aktiválódás az SPF TIP39 neuronjaiban is megjelenik (Wang és mtsai 2006a). Korábban ismertettük a TIP39 expresszió nemi érése alatt bekövetkező változásait és a felnőttkorra kialakuló dimorfizmusát (Dobolyi és mtsai 2006b), valamint a TIP39-PTH2R rendszer neuroendokrin kapcsolatát. Mindezek arra utalnak, hogy a TIP39-PTH2R rendszer szerepet játszik a reprodukciós folyamatok centrális szabályozásában. Anyapatkányokon végzett in situ hibridizációs és real-time RT-PCR vizsgálatok jelentős TIP39 expresszió fokozódást találtak a subparafascicularis area lateralis részében (SPFp-PIL) azokban az anyákban, amelyeket a kölykökkel hagytak, azokhoz az anyákhoz képest, akiktől szülés után elkülönítették az újszülötteket. Az expresszióval párhuzamosan fokozott immunpozitivitás, és c-fos aktiváció is jelentkezett a PIL területén. A laterális, anyai viselkedés során aktiválódott SPFp-PIL terület roncsolása után a mediális praeopticus areában, a hypothalamus periventricularis, paraventricularis és dorsomedialis magjaiban, és az ipsilaterális amygdalában csökkent jelentősen a TIP39 immunpozitivitás (Cservenák M., 2009a; Cservenák M., 2009b). PTH2 receptor antagonistá infúziója gátolta a szopási inger által kiváltott szérumban prolaktin szint emelkedést (Cservenák és mtsai 2010). Mindez arra utal, hogy a SPF-PIL TIP39

neuronjai szerepet játszanak az anyai viselkedés élettani szabályozásában, különösen a laktáció időszakában (Arbogast, 2010; Dobolyi, 2011).

3. Célkitűzések

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

Korábban rágszálókban vizsgálták a TIP39 immunpozitív neuronok fejlődését a postnatalis élet során (Dobolyi és mtsai 2006b). Mint a bevezetőben már 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 is jelen vannak, majd a TIP39 expresszió a születés utáni 14. napig (PND-14) fokozódik, majd a 33. naptól (PND-33), fokozatosan csökken, és 125. napon (PND-125) már csak alig kimutatható (Dobolyi és mtsai 2006b). A nemi éréssel párhuzamosan elkezdődő csökkenés a hímekben kifejezettebb, így idősebb állatok esetén a nőstényekben valamelyest több TIP39-et találunk, mint a hímekben. 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?

3.2. 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.

A célból, hogy későbbiekben a TIP39 esetleges humán fiziológiai vagy patofiziológiai jelentőségét megérthessük, fontosnak tartottuk a TIP39-PTH2 receptor rendszer feltérképezését főemlős (majom és humán) 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 immunoreaktív rostok glutamáterg transzmissziója főemlősökben is?
- 5) Kimutatható-e emberben közvetlen anatómiai kapcsolat a TIP39-PTH2R rendszer és a hypothalamo-hypophysis tengely között, elsősorban CRH és somatostatin termelés szabályozásában?
- 6) Korábbi irodalmi és saját adatok alapján mi lehet a TIP39-PTH2R rendszer potenciális élettani szerepe?

4. Anyagok és módszer

4.1. Kísérleti állatok

4.1.1. Patkány

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. A patkány kísérletek a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében történtek. A vizsgálatokat 4 hím (300-350g testsúlyú) és 12 nőstény (250-290g testsúlyú) kifejlett Wistar patkányon (*Rattus norvegicus*), és kölykeiken végeztük. A patkányokat műanyag dobozokban tartottuk 12 órás megvilágított, 12 órás sötét ciklusokban, 22°C hőmérsékleten. Az állatok ad libidum jutottak táplálékhoz és folyadékhoz. Minden beavatkozásnál figyelmet fordítottunk az állatok komfortjának biztosítására.

A hím patkányokat a vizsgálat kezdetén 18 órakor 3 nőstény patkánnyal közös dobozba helyeztük, másnap reggel 8 órakor hüvelykenetet vettünk. A nőstényeket, amelyek kenetében spermiumok voltak kimutathatók, elkülönítettük, mindezt addig folytattuk, míg az összes nőstény teherbe nem esett. A terhességet a pozitív kenet napján hajnali 1 órától számítottuk.

A vemhes patkányokat 0,3 ml/testsúly 300g kevert (ketamin 60mg/ml, xylazin 8mg/ml) anesztetikummal túlaltattuk a vemhesség 14., 16., 18., vagy 20. napján. Az embriókat császármetszéssel eltávolítottuk, minden életkorban két egyedet, majd 3 napig 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk, majd az agyakat eltávolítottuk. Újszülött patkányokat, 5 nőstényt és 5 hímet, az 1. és 5. postnatalis napon hasonlóan az előbbiekhöz túlaltattunk, majd az agyakat eltávolítottuk és 4% paraformaldehidben fixáltuk.

4.1.2. Majom szövetek

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 majom szöveteket Dr. Ted Usdin munkacsoprtja biztosította (NIH).

In situ hibridizációs vizsgálatokhoz egy 3 napos Rhesus majom kölyköt (*Macacus mulatta*) ketamin szedálást követően i.v. pentobarbitallal túllaltattunk, majd az agy eltávolítása után az agytörzset -80°C hőmérsékletre fagyasztottuk. A heréket hibridizációs próba készítéséhez eltávolítottuk és lefagyasztottuk.

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat egy másik, kísérleti célból túllaltatott 9 éves hím Rhesus majom perfundált agyán végeztük. Az in situ és immun vizsgálatok így két különböző korú állaton történtek, ezzel a felhasznált főemlősök számát akartuk minimalizálni.

4.2. Humán agyszövet

A humán agymintákat (2. táblázat) az emberi szövetek orvosi kutatásokhoz való felhasználását szabályozó etikai kódexének (HM 34/1999) és a Helsink 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.

Az agyakat a halál beállta után 2-6 órával távolították el a koponyából. Mikrodisszekcióhoz egy 89 éves elhunyt nő és egy 56 éves elhunyt férfiból származó

agyakat használtuk fel. Az agyakat öt nagyobb darabra vágtuk (jobb és bal hemisphaerium, diencephalon, agytörzs és cerebellum), és azokat azonnal -80°C hőmérsékletre fagyasztottuk. Mikrodisszekció előtt a nagyobb darabokat -5 és -10°C közötti hőmérsékleten $1,0-1,5$ mm vastag coronalis síkú szeletekre vágtuk, majd a szeletekből anatómia atlaszok (Mai és mtsai 1997; Paxinos and Huang, 1995) szerint kiválasztott területeknek megfelelően, sztereomikroszkóp vagy lupé segítségével, $1,0-3,5$ mm átmérőjű punch tűkkel, szövethengereket nyertünk (Palkovits, 1973). A szövetminta vétel alatt a hőmérsékletet szárazjéggel biztosítottuk. A szövethengereket további felhasználásig -80°C -on, légmentesen lezárt Eppendorf csövekben tároltuk. Immunocitokémiai vizsgálatokhoz az agyakat $5-10$ mm vastag szeletekre metsztük, majd 4% -os paraformaldehidet tartalmazó $0,1\%$ -os foszfát pufferben fixáltuk $6-10$ napig. Ezután a szeleteket posztfixáltuk ugyanebben az oldatban, amihez még 15% -os telített pikrinsav oldatot adtunk.

agy	nem	életkor (év)	klinikai diagnózis	szövetminta típusa	vizsgálati módszer
1	nő	89	Alzheimer-kór	friss fagyasztott micropunch minta	RT-PCR
2	férfi	56	szívelégtelenség	friss fagyasztott micropunch minta	RT-PCR
3	nő	8	leukémia	immerziós fixálás hypothalamus	immunfestés
4	férfi	10	leukémia	immerziós fixálás diencephalon, agytörzs	immunfestés
5	férfi	62	ismeretlen	immerziós fixálás nyúlt- és gerincvelő (C1-2)	immunfestés

2. táblázat

Vizsgálatainkban használt humán agyminták. Az elhunytak neme, életkora, a minta típusa (friss vagy fixált agy), valamint a vizsgálati módszer.

4.3. Immuncitokémia

4.3.1. TIP39 immunfestés patkány agyon

A kivett patkányagyakat nátrium-azidos foszfát pufferrel készített 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk 3 napon keresztül 4°C-on, majd metszés előtt 2 nappal 30% szacharóz tartalmú foszfát puffer oldatba helyeztük. Az agyakat kriosztáton (Leica CM3050S) 20µm vastag coronalis szeletekbe metszettük -15-17°C-on, majd a metszeteket pozitív felszíni töltésű tárgylemezekre vittük fel (Superfrost Plus, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), és felhasználásig 4°C-on tároltuk. Az immunfestést patkány TIP39 ellenes nyúl poliklonális antitesttel végeztük korábban kidolgozott metodika szerint (Dobolyi és mtsai 2003a; Dobolyi és mtsai 2002). A metszeteket 0,5% Triton X-100 és 3% bovine szérum albumin oldatba helyeztük 1 órára. Ezután 3%-os bovine szérum albumint és a primer anti-TIP39 antitestet 1:3000 hígításban tartalmazó foszfát pufferben inkubáltuk, 48 órán keresztül szobahőmérsékleten. Ezután vittük fel 1 órára a szekunder antitestet, ami biotinizált, számból származó anti-nyúl IgG volt, 1:600 hígításban (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). Ezután 2 órán keresztül inkubáltuk a metszeteket 1:500 hígítású avidin-biotin-tormaperoxidáz komplexben (ABC, Vectastatin ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). A hívást 0,02% 3,3-diaminobenzidint (DAB, Sigma), 0,08% nikkell(II)-szulfátot és 0,0012% hidrogén-peroxidot tartalmazó Tris pufferben (0,1 M, pH 8,0), 10 perces inkubációval végeztük. A metszetek egy részét nuclear red-del háttérfestettük (Vector Laboratories, USA), majd a metszeteket megszáritottuk és Cytooseal 60-al (Stephens Scientific, Riverdale, NJ, USA) lefedtük.

A metszetek egy részén fluoreszcein-izotiocianát (FITC)-tiramid amplifikációs immunfluoreszcens festést használtunk DAB helyett. Ezekben az esetekben az ABC oldatban történt inkubációt követően a metszeteket 1:10.000 szerez hígítású FITC-tiramidot és 0,001% hidrogén-peroxidot tartalmazó Tris pufferbe (0,1 M, pH 8,0) helyeztük 6 percre. Mosást követően a szeleteket a fluoreszcencia halványodását gátló

médiummal (Prolong Antifade Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) fedtük le és sötét helyen tároltuk.

4.3.2. TIP39 és CGRP kettős immunfestés patkány agyban

Az előbb részletezett módon fluoreszcein-izotiocianát (FITC)-tiramid amplifikációs immunfluoreszcens festést alkalmaztunk a mintákon, majd a metszeteket kecskéből származó primer patkány CGRP ellenes antitestekkel inkubáltuk 2 napig szobahőmérsékleten, majd Alexa Fluor 594-el jelzett, szárból származó szekunder (anti-goat) antitestekkel 2 órán át. Mosást követően a metszeteket a fluoreszcencia halványodását gátló médiummal (Prolong Antifade Kit, Molecular Probes) fedtük le és sötét helyen tároltuk.

4.3.3. PTH2 receptor immunfestés majom agyban

A 9 éves majom kivett agyát coronalis síkban 40 µm vastag szeletekbe metsztük mikrotómmal, majd -20°C-on tároltuk 30% etilén-glikolt és 20% glicerint tartalmazó 0,05 M foszfát pufferben. Felengedés és mosás után a metszeteket 0,5% Triton X-100 és 3% bovine szérum albumin oldatba helyeztük 30 percre. Ezután a mintákat anti-PTH2R primer antiszérumba (nyúl) helyeztük (1:20.000), 48 órára, szobahőmérsékleten. A használt antiszérumot korábbi vizsgálatokban már tesztelték és használták (Usdin és mtsai 1999a) (Wang és mtsai 2000). Anti-PTH2R antiszérummal történt inkubáció után, a metszeteket biotinilált (szárból származó) anti-nyúl másodlagos antitestet tartalmazó oldatba (1:600 hígítás, Vector Laboratories) helyeztük 2 órára, ezt követően újabb két órára avidin-biotin-tormaperoxidáz komplexbe (1:300 hígítás, ABC, Vector Laboratories). Az ABC oldatban történt inkubációt követően a metszeteket 1:10.000 szerez hígítású FITC-tiramidot és 0,001% hidrogén-peroxidot tartalmazó Tris pufferbe (0,1 M, pH 8,0) helyeztük 6 percre. A metszeteket tárgylemezre vittük, megszáritottuk, majd a metszeteket a fluoreszcencia halványodását gátló médiummal (Prolong Antifade Kit, Molecular Probes) fedtük le és sötét helyen tároltuk.

4.3.4. PTH2 receptor és VGLUT2 kettős immunfestés majom agyban

Dupla immunfestés esetén a PTH2 receptor FITC-tiramid festés után a mintákat 10 mM citromsavas pufferbe (pH 6,0) helyezük 30 percre szobahőmérsékleten, majd 25 percre 90°C-on. Ezután a metszeteket anti-VGLUT2 primer antiszérumban (1:10.000 hígítás, Dr. Robert Edwards adomány, UCSF, CA, USA) inkubáltuk 48 órán keresztül 4°C-on. Ezt az antiszérumot korábbiakban széles körben már alkalmazták a VGLUT2 azonosítására (Fremeau és mtsai 2001; Hartig és mtsai 2003). Anti-VGLUT2 primer antiszérumban történt inkubálás után, a metszeteket karbocianin(Cy)-5-konjugált anti-nyúl szekunder antitestet tartalmazó (1:300 hígítás, Vector Laboratories) diamidin-fenilindol (DAPI) oldatba helyeztük 5 percre. A metszeteket tárgylemezre vittük, megszáritottuk, majd a metszeteket a fluoreszcencia halványodását gátló, polivinilalkohol(PVA)-2,4-diazabiciklo-2,2,2-oktán médiummal fedtük le és sötét helyen tároltuk. Kontrollként olyan metszetek szolgáltak, ahol a VGLUT2 antiszérummal történő inkubációt elhagytuk.

4.3.5. PTH2 receptor immunfestés humán agyban

Emberi agyból származó, fixált, 1x1x2 cm-es blokkokat használtunk fel a PTH2 receptor immuncitokémiai vizsgálatához. A blokkok 3 különböző agyból származtak és a következő területeket tartalmazták: insularis kéreg, hypothalamus, diencephalon, mesencephalon, pons, medulla oblongata, medullospinalis átmenet, nyaki gerincvelő.

Metszés előtt két nappal a blokkokat foszfát puffer oldatba helyeztük két napra, hogy a felesleges paraformaldehidet kimossuk, ezután a blokkot 2 napra 20% szacharóz oldatba tettük krioprotekció céljából. Ezt követően a blokkokat lefagyasztottuk, majd 50 µm vastag coronalis szeletekbe metszettük mikrotómon. Az immunfestést minden tizedik metszeten végeztük el. A metszeteket 30 percig, szobahőmérsékleten 3% bovine szérum albumint és 0.5% Triton X-100-at tartalmazó foszfát pufferben inkubáltuk. A mintákat ezután anti-PTH2 receptor primer antiszérumba helyeztük (1:20.000 hígítás) 48 órára, szobahőmérsékleten. A primer antitestet korábbi vizsgálatokban már eredményesen használták (Dobolyi és mtsai 2006a; Usdin és mtsai 1999a; Wang és mtsai 2000). Anti-

PTH2 receptor antiszérummal történt inkubáció után, a metszeteket biotinilált (szamárból származó) anti-nyúl másodlagos antitestet tartalmazó oldatba (1:600 hígítás, Vector Laboratories) helyeztük 2 órára, ezt követően újabb két órára avidin-biotin-tormaperoxidáz komplexbe (1:300 hígítás, ABC, Vector Laboratories). Az ABC oldatban történt inkubációt követően a metszeteket 1:8.000-szeres hígítású FITC-tiramidot és 0,003% hidrogén-peroxidot tartalmazó Tris pufferbe (0,05 M, pH 8,0) helyeztük 6 percre. A metszeteket tárgylemezre vittük, megszáritottuk, majd a metszeteket a fluoreszcencia halványodását gátló médiummal (Prolong Antifade Kit, Molecular Probes) fedtük le és sötét helyen tároltuk.

4.3.6. PTH2 receptor és CRH vagy somatostatin kettős immunfestés humán agyban

A hypothalamusból származó metszetek másik részét kettős immunfestéses vizsgálatokhoz használtuk fel. Első lépésként, az előbbieken leírt módon PTH2 receptor immunfestést végeztünk azzal a különbséggel, hogy korábbi ajánlásoknak megfelelően (Hunyady és mtsai 1996) a primer antitestet nagyobb hígításban alkalmaztuk (1:40.000). Ezt követően a metszeteket nyúl anti-CRH antitesttel (Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, CA, USA) vagy nyúl anti-somatostatin antitesttel inkubáltuk (Peninsula Laboratories Inc.). A primer antitestekkel való inkubálást követően a metszeteket Alexa Fluor 594 anti-nyúl másodlagos antitesttel kezeltük (Molecular Probes, 1:500 hígítás) 2 óráig. A metszeteket tárgylemezre vittük, megszáritottuk, majd a fluoreszcencia halványodását gátló médiummal (Prolong Antifade Kit, Molecular Probes) fedtük le és sötét helyen tároltuk.

Mivel mindkét antitest nyúlból származott a keresztfestődést a következő módon előztük meg: Mivel FITC tiramid erősítést alkalmaztunk az elsődleges PTH2R immunfestés kapcsán, itt a a PTH2R primer, nyúlból származó antitestet, a korábbi közleményekben is ajánlott nagy (1:40.000) hígításban alkalmaztuk, mely még elegendő volt a FITC tiramid amplifikálással való vizualizációhoz, de az Alexa Fluor 594-el jelölt, piros, anti-nyúl másodlagos antitest már nem ismerte fel. A CRH és somatostatin ellenes primereket, melyek szintén nyúlból származnak, az amplifikáció után vittük csak fel olyan magas koncentrációban (1:500x), hogy azt az Alexa 594-el jelölt, piros anti-nyúl másodlagos antitest felismerje. Kontrollként olyan festést is készítettünk, amihez

nem adtunk második primer antitestet. Ekkor a másodjára alkalmazott Alexa 594-el jelölt, piros anti-nyúl másodlagos antitest jelenléte ellenére sem kaptunk piros jelet, azaz ez az antitest nem ismerte fel az első primert, az anti-PTH2 receptor antitestet.

4.4. RT-PCR vizsgálatok emberi agyon

Az RNS izolálást Trizol reagenssel végeztük 50-100 mg súlyú agyszövet darabokból. Az RNS bomlás megítéléséhez a tisztított RNS mintákat denaturáló formaldehid gélen futtattuk. PCR vizsgálathoz azokat a mintákat használtuk fel, ahol a 28S rRNS mennyisége meghaladta a 18S rRNS-ét. A teljes RNS-t tartalmazó mintát 2 mg/μl-re hígítottuk, majd az RNS mintákat DN-ázzal kezeltük (Amplification Grade Dnase, Invitrogen), majd Superscript II reverz transzkriptáz kittel (Invitrogen) a recept szerint cDNS-t készítettünk. Az RT-PCR során alkalmazott primer pár egy 440 bp hosszúságú terméket eredményezett, ami megfelel a humán PTH2 receptor 2162 és 2601 bázispárok közé eső szakaszának, ezt szekvenálással is igazoltuk. A PCR technikai kontrolljaként a glicerin-aldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) mRNS kimutatását is elvégeztük (ún. housekeeping gene). A GAPDH RT-PCR során alkalmazott primer pár, egy 423 bázispárból álló terméket eredményezett, mely megfelel a humán GAPDH 650-1072 bázispár közé eső szakaszának. A PCR reakciókat iTaq DNS polimerázzal (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) végeztük 12,5 μl-es végtérfogatban, a primereket 300 nM koncentrációban alkalmaztuk. 95°C 3 perc indítás után a ciklusok a következők voltak: 95°C 0,5 percig, majd 60°C 0,5 percig és 72°C 1 percig. GAPDH jelenlétét 33 ciklus, PTH2R jelenlétét 38 ciklus elteltével vizsgáltuk. 10 μl mennyiségű PCR terméket futattunk meg gélen, majd UV megvilágításban digitális fényképet készítettünk a gélről.

4.5. In situ hibridizáció

4.5.1. TIP39 in situ hibridizációs hisztokémia patkány agyon

2 hím és 2 nőstény patkány agyat a kivétel után azonnal -80°C -ra fagyasztottunk. Az agyat kriosztáton (Leica CM3050S) $20\ \mu\text{m}$ vastag coronalis szeletekbe metszettük -15 - 17°C -on, majd a metszeteket pozitív felszíni töltésű tárgylemezre vittük fel (Superfrost Plus, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), megszártottuk, majd további felhasználásig -80°C -on tároltuk. Az in situ hibridizációs vizsgálatokat korábban használt és részletesen leírt NIH protokoll szerint végeztük (<http://intramural.nimh.nih.gov/lcmr/snge/Protocols/ISHH/ISHH.html>). (^{35}S)-UTP jelölt riboprobe-ot MAXIscript transzkripció kittel (Ambion, Austin, TX) állítottunk elő PCR-rel amplifikált TIP39 cDNSből, melyet pBluescript vektorba vittünk (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Az antisense és sense (kontroll) riboprobe-ok T7 vagy T3 RNS polimeráz segítségével készültek a TIP39 cDNS egy olyan 18 aminosavat kódoló szakaszára, melynek első aminosava a végleges TIP39 molekula első aminosavának felel meg. Hibridizáció és mosás után a metszeteket NTB nuclear track emulzióban (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) tároltuk 4°C -on 3 hétig. Ezután a metszeteket Kodak előhívóval majd fixálóval kezeltük, Giemzával háttérfestettük, majd Cytoseal 60-al fedtük le.

4.5.2. TIP39 és PTH2 receptor in situ hibridizációs hisztokémia majom agyon

$12\ \mu\text{m}$ vastag metszeteket készítettünk kriosztáton a diencephalon rostralis részétől (a commissura anterior síkjá előtt 1mm -re) indulva a pontobulbaris átmenetig ($17\ \text{mm}$ -re caudalisan a commissura anterior síkjától), majd a metszeteket pozitív felszíni töltésű tárgylemezre vittük fel, megszártottuk, majd további felhasználásig -80°C -on tároltuk. A vizsgálatokra minden 10. metszetet használtuk fel, így a térképezés során használt „felbontás” $240\ \mu\text{m}$ volt.

Az (^{35}S)-UTP jelölt probák készítéséhez cDNS template-et majom hereszövetből nyertünk RT-PCR technikával, humán TIP39 specifikus ($5'$ -

GGGGACTGTGCGGGAAGC-3' és 5'-GCATGTACGAGTTCAGCCAGTGG-3') és PTH2 receptor specifikus (5'-TGTGGGCTTCATCTTGATAGG-3' és 5'-ATGGCGGTGTCCTTTCCAGTC-3') primerpárokkal. A termékeket plazmid vektorba ültettük, szekvenálással azonosítottuk. A további PCR reakcióhoz egy-egy plazmid szolgált template-ként, mely során olyan antisense primereket használtunk, melyek az 5' terminálison T7 RNS polimeráz szignálszekvenciát tartalmaztak (5'-GCGCGTAATACGA-CTCACTATAGGG-3') (MAXIscript transscription kit, Ambion). A TIP39 proba 372 bázis hosszúságú és 16 bázisban (elszórva) különbözött a humán génbank szerint jószolt szekvenciától, valamint a könyvtár szerinti indító szekvencia két aminosavát kódoló kodon is hiányzott. A PTH2 receptor próba 14 bázisban tért el a humán szekvenciától, valamint tartalmazott a 49 bázis hosszúságú intronnak megfelelő szekvenciát. Ezek a kis eltérések vagy PCR hibának és műterméknek, vagy pedig diszkrét fajok közötti genetikai különbségnek felelnek meg.

Az antisense jelölt riboprobe-ok MAXIscript transzkripcióval kittel, T7 RNS RNS polimeráz segítségével készültek. Hibridizáció és mosás után a metszeteket NTB nuclear track emulzióban (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) tároltuk 4°C-on 3 hétig. Ezután a metszeteket Kodak előhívóval majd fixálóval kezeltük, Giemsa-val háttérfestettük, majd Cytoseal 60-al fedtük le.

Az in situ hibridizációs vizsgálatokat, csakúgy, mint a patkány mintákon, a korábban használt és részletesen leírt NIH protokoll szerint végeztük.

4.6. Mikroszkópos vizsgálatok és képrögzítés

Az in situ hibridizációval jelölt metszeteket Zeiss Axioplan 2 és Olympus IX70 mikroszkópokkal vizsgáltuk. A fotókat 1300x1300 pixeles felbontásban a mikroszkóphoz csatlakoztatott AxioCam HR és CoolSnap FX digitális fényképezőkkel készítettük. A montázsok Zeiss AxioVison szoftverrel készültek.

További metszeteket Olympus BX60 fluoreszcens megvilágításra is alkalmas mikroszkóppal vizsgáltunk. A fotók 2048x2048 pixel felbontásban SPOT Xplorer

digitális kamerával készültek (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA). A sötétlátóteres képek 4x objektívvel, a világos látóterűek 20x és 40x objektívekkel.

A konfokális képek Nikon Eclipse E800 konfokális mikroszkóppal készültek, Bio-Rad Radiance (2100) Laser Scanning System segítségével 60x objektívvel, 2 µm-es optikai vastagsággal. Az élesség és a kontraszt beállítása Adobe Photoshop CS 8.0 szoftver „level” és „sharpness” paraméterek változtatásával történt. A posztexpozíciós munkák során a nagy felbontást mindaddig megőriztük, amíg a képekből a közlésre szánt területeket ki nem emeltük. A kivágott képrészletek felbontását ezután egységesen 300 dpi-re állítottuk be. A rajzokat anatómiai atlaszok alapján készítettük (Martin and Bowden, 1996; Paxinos és mtsai 1991; Paxinos and Watson, 2007).

5. Eredmények

5.1. Patkány agyon végzett vizsgálatok

5.1.1. TIP39 expresszió az embrionális és korai posztnatális patkány agyban

Immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk különböző életkorú patkány embriók és újszülött patkányok agyán, a célból hogy megismerjük a TIP39 pozitív neuronok fejlődését az ontogenezis korai szakaszában. Első lépésként kifejllett patkányokban a TIP39 immunreaktív neuronokat tartalmazó két különálló terület, a subparafascicularis area (SPF) és a medialis paralemniscalis mag (MPL) vizsgálatát végeztük el.

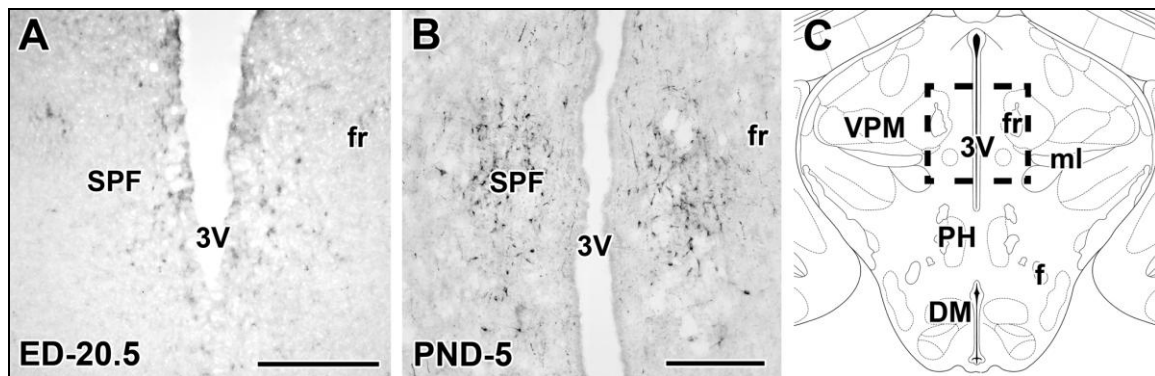
5.1.1.1. TIP39 az SPF területén

A kifejllett egyedekben az SPF két anatómiailag is elkülöníthető területén, a rostromedialis SPF-PVG-nek illetve a caudolaterális SPFP-PIL különálló nagyobb területén találtak korábban TIP39 sejteket.

Immunhisztokémiai vizsgálattal a korai embrionális életben a subparafascicularis area rostromedialis részén (SPF-PVG), a III. kamra és a fasciculus retroflexus között elhelyezkedő területen nem találtunk számottevő TIP39 immunreaktivitást. A 20,5. embrionális napon csak kevés, halványan festődő TIP39 pozitív sejt látható itt. A sejtek száma és festődésének intenzitása az 5. posztnatális napig kifejezett növekedést mutat, és ezután már megegyezik a kifejllett patkányokban látott képpel. A TIP39 immunreaktív sejtek eloszlása mindkét nembben azonos volt (4. ábra).

Az SPF-PVG-ben látottakkal ellentétben a TIP39 pozitív sejtek az SPFP-PIL területén már a 14,5. embrionális napon megjelennek. A 16,5. napig ez a sejtpopuláció kifejezett növekedést mutat, ekkor a TIP39 pozitív neuronok a thalamus PIL területének jelentős részét elfoglalják. A 16,5. naptól kezdve a sejtpopuláció fokozatos csökkenése észlelhető az 5. postnatalis napig. Bár mind az első, sőt még az 5. postnatalis napon is látunk TIP39 immunreaktivitást, de a festés intenzitása messze alatta marad az embrionális élet 14,5. vagy 16,5. napján tapasztaltakkal. Azt hogy ez a festés valóban

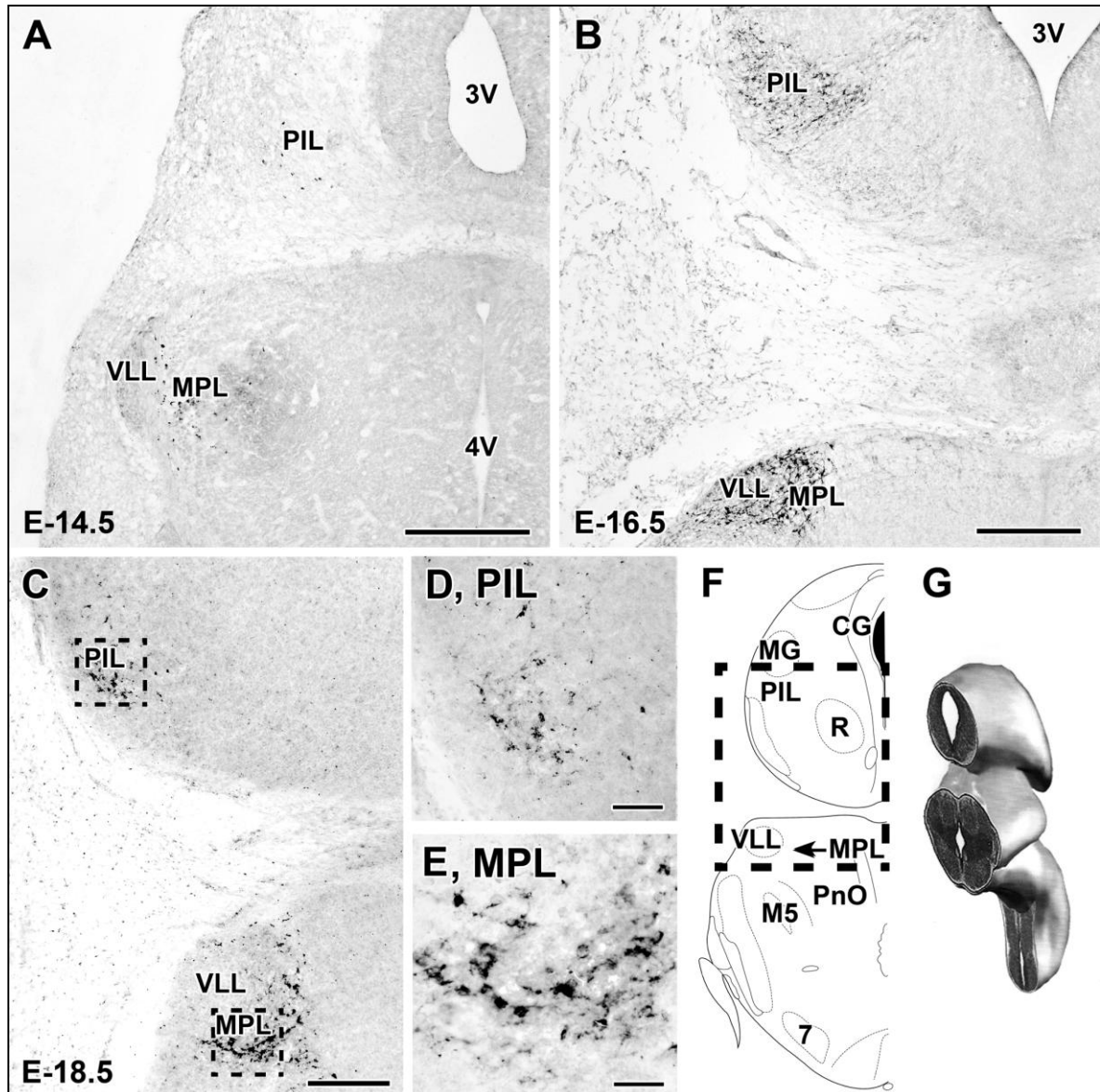
TIP39 sejttesteket jelöl, in situ hibridizációval is ellenőriztük, mely az immunfestéssel azonos eredményt mutatott (5. és 6. ábra). A kettős immunfestés szerint a TIP39 sejtek a PIL-ben már korábban leírt calcitonin gene related peptidet (CGRP) termelő neuronokhoz (D'Hanis és mtsai 2007) képest mediálisan helyezkednek el, kolokalizációt az utóbbiakkal nem mutatnak (D'Hanis és mtsai 2007).



4. ábra

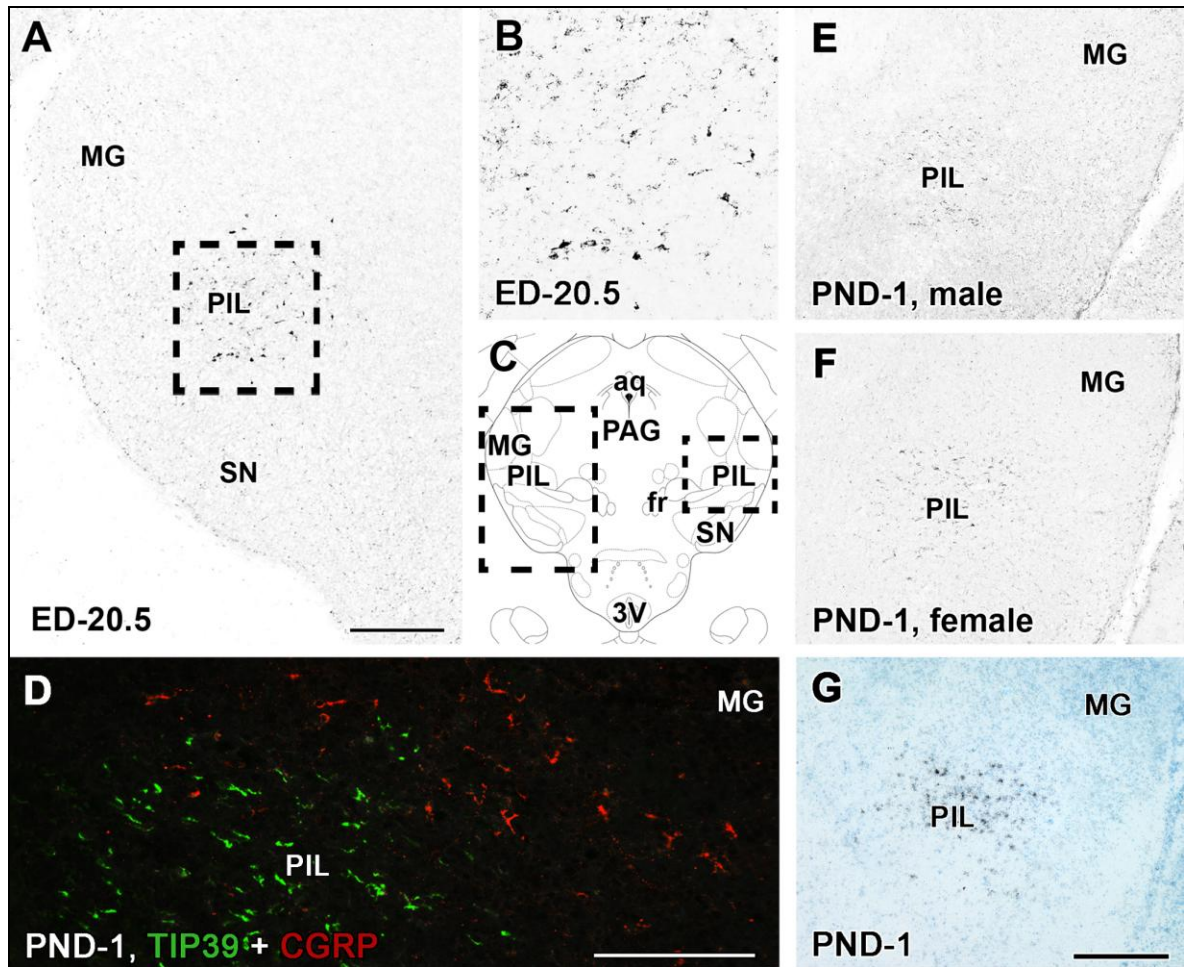
A TIP39-et kifejező neuronok a subparafascicularis területen (SPF-PVG). (A) A 20,5 embrionális napon csak kevés halványan festődő TIP39 neuron látható a III. kamra (3V) és a fasciculus retroflexus (fr) között. (B) Az 5. posztnatális napon jelentős számú, erős immunfestődést mutató TIP39 neuronok láthatóak ugyanezen a területen. (C) A subparafascicularis terület elhelyezkedése coronalis síkú metszeten atlasz alapján (Paxinos és mtsai 1991). A lépték az A ábrán 250 μ -t, a B ábrán 300 μ m-t jelez.

Az immunhisztokémiai vizsgálatokkal nem csak magukat a TIP39 pozitív sejttesteket, hanem az SPF-PIL TIP39 sejtekből származó TIP39 pozitív rostokat is sikerült azonosítanunk. A rostok a 16,5. embrionális naptól láthatóak. Festődésük a 18,5. embrionális napig fokozódik, majd a 20,5. embrionális napig ismét csökken, végül születés után teljesen eltűnik. A rostokat coronalis síkú metszeteken követhetjük, amint a PIL területéből a zona incertan keresztül rostralisan haladnak, majd ventralis irányba fordulva csatlakoznak a supraopticus decussatio rostjaihoz. Itt a rostokon helyenként varicositások is megjelennek. Néhány rost dorsalis irányban folytatódva a lateralis hypothalamusban végződik. Néhány a középvonalat keresztező TIP39 rost is megfigyelhető a chiasma felett. Ezekon a rostokon kívül a embrionális fejlődés során egyéb TIP39 pozitív rostot nem sikerült azonosítani (7.ábra).



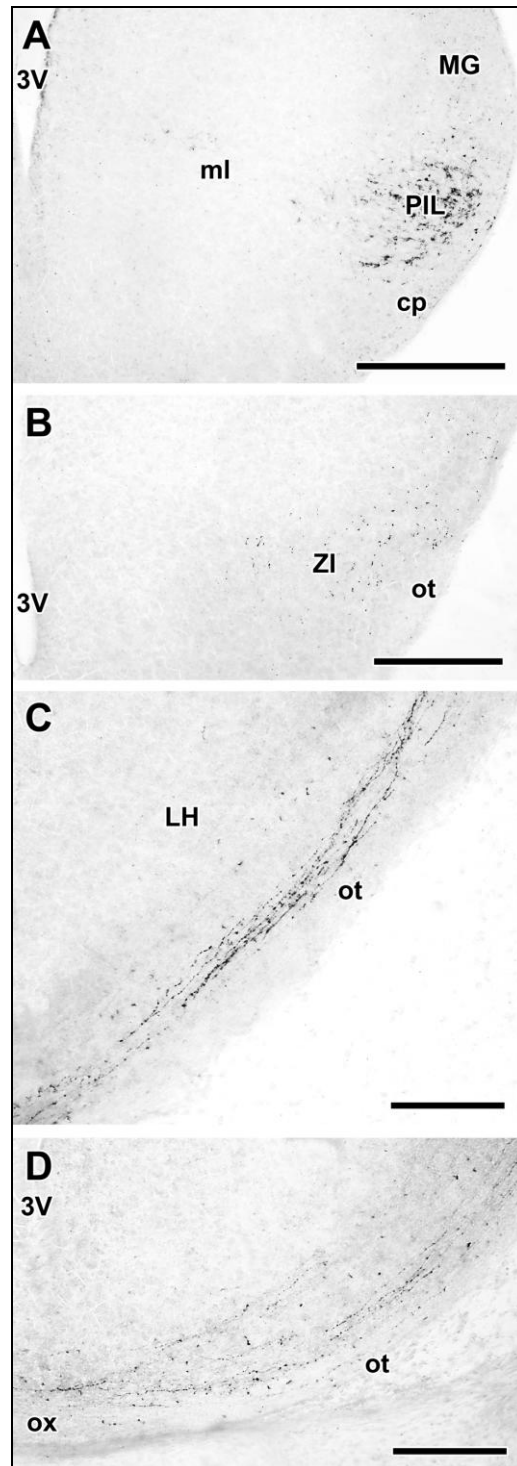
5. ábra

A TIP39-et expresszáló neuronok a subparafascicularis terület caudolateralis részében (SPF-PIL) és a ponsban, a medialis paralemniscalis mag területén (MPL). (A) A 14,5. embrionális napon készített metszeten TIP39 immunreaktív neuronok láthatóak a PIL és az MPL területén. (B) Mindkét területen jelentősen emelkedik a festődő sejtek száma a 16,5. napra. (C) A 18,5. napon a PIL-ben lévő TIP sejtek száma valamelyest csökkent, míg az MPL-ben változatlan marad. (D) Nagy nagyítású kép a PIL TIP39 sejtjeiről. (E) Nagy nagyítású kép az MPL TIP39 sejtjeiről. (F) Coronalis metszet a hátsó thalamus és a rostralis pons magasságában embrionális agyban atlasz alapján (Paxinos és mtsai 1991) (G) Az embrionális agy sajátos morfológiája miatt egy metszetben látható hátsó thalamus és a rostralis pons. (Altman and Bayer, 1995) A lépték az A, B és C ábrán 300 μ -t, a D és E ábrán 50 μ m-t jelez.



6. ábra

A TIP39-et expresszáló neuronok a subparafascicularis terület caudolateralis részében (SPF-PIL). (A) Az 5. ábrához képest a 20,5. embrionális napra a PIL TIP39 sejtek mind számban, mind a festődés intenzitásában csökkentek. (B) Nagy nagyítású képeken láthatóak a PIL TIP39 immunreaktív sejtjei. (C) Atlaszból vett coronalis metszeten láthatóak az A (bal oldali keret) és B ábrán (jobb oldali keret) a vizsgált területek (Paxinos és mtsai 1991). (D) Kettős fluoreszcens immunestéssel látható, hogy a TIP39 immunreaktív sejtek (zöld) a PIL CGRP immunreaktív sejtjeitől medialisán helyezkednek el. (E) A PIL TIP39 sejtjei hím patkányban az 1. postnatalis napon. (F) A PIL TIP39 sejtjei nőstény patkányban az 1. postnatalis napon. A sejtek száma és festődése is azonos mindkét nemből. (G) A PIL-ben TIP39 reaktív sejtek in situ hibridizációval azonos eloszlást mutatnak az immuncitokémiai vizsgálatnál tapasztaltal. A lépték az A és G ábrákon 30 μ m-t, a D ábrán 200 μ m-t jelöl.

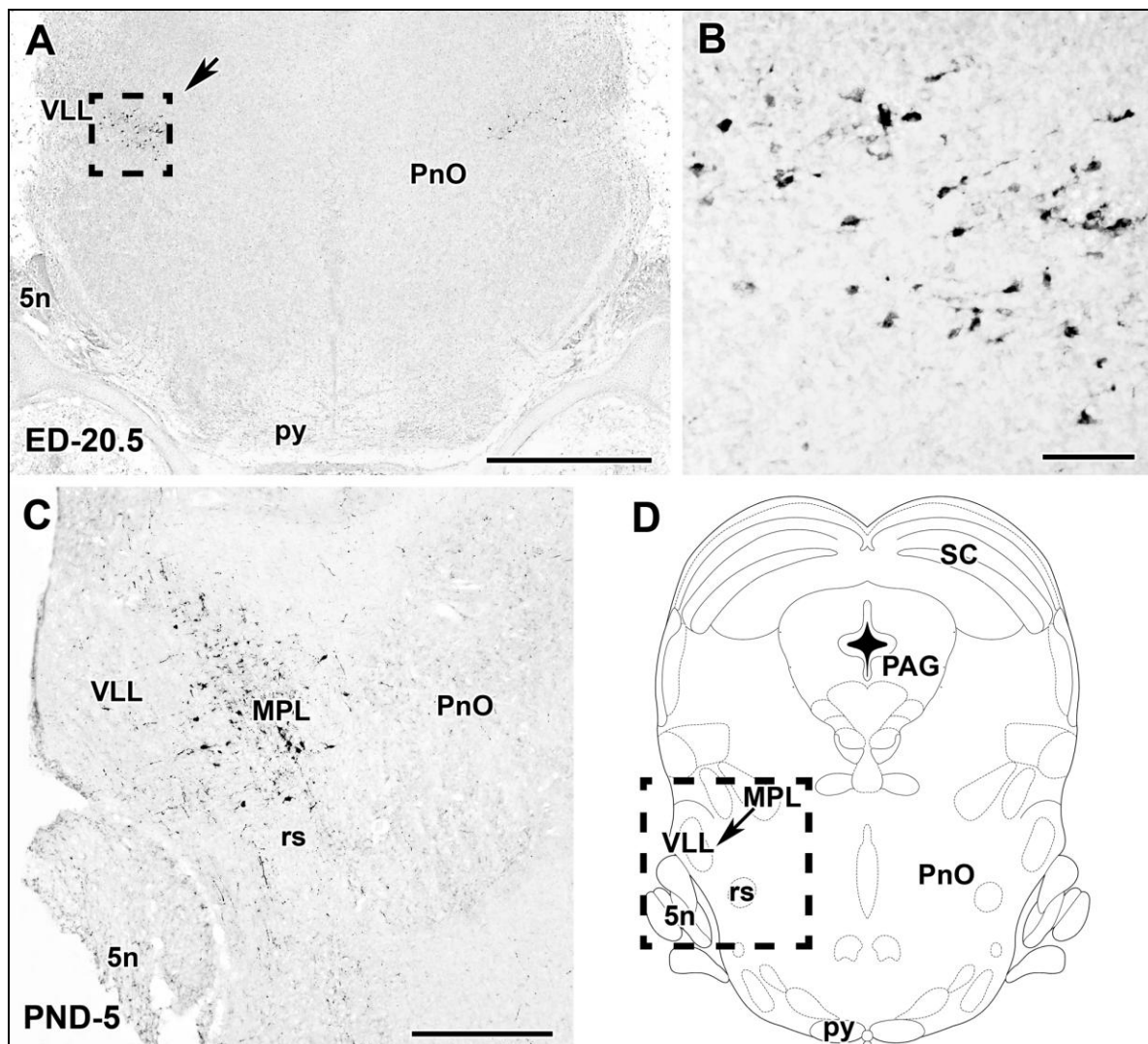


7. ábra

300-400 μm távolsággal metszett coronalis metszeteken a TIP39 immunreaktív rostok követhetőek a PIL régióból a hypothalamus irányában 18,5. napos patkány embrióban. (A) TIP39 sejtek a PIL-ben. (B) Rostralisabban TIP39 pozitív rostok keresztmetszete látható a zona incerta területén. (C) TIP39 immunreaktív varicositasok és axon terminálisok láthatóak a hypothalamusban a supraopticus decussatio területében. (D) A rostok rostromedialis irányban a chiasmáig követhetőek. A lépték az A ábrán 500 μm -t, a B ábrán 400 μm -t, a C és D ábrákon 200 μm -t jelöl.

5.1.1.2. TIP39 az MPL területén

A medialis paralemniscalis magban, a lemniscus lateralis ventralis magjától medialisán, a rubrospinalis pályától dorsalisán elhelyezkedő területen a TIP39 immunreaktív sejtek a 14,5. embrionális napon jelennek meg. Ezután a sejtek száma, és az immunfestődés intenzitása is fokozódik, míg az 1. postnatalis napra eléri a maximális szintet. A TIP39 sejtek eloszlása mindkét nemben azonos. Az 5. postnatalis napon a magból kiinduló, dorsalis és ventralis irányba tartó TIP39 pozitív rostok is láthatóakká válnak (8. ábra).

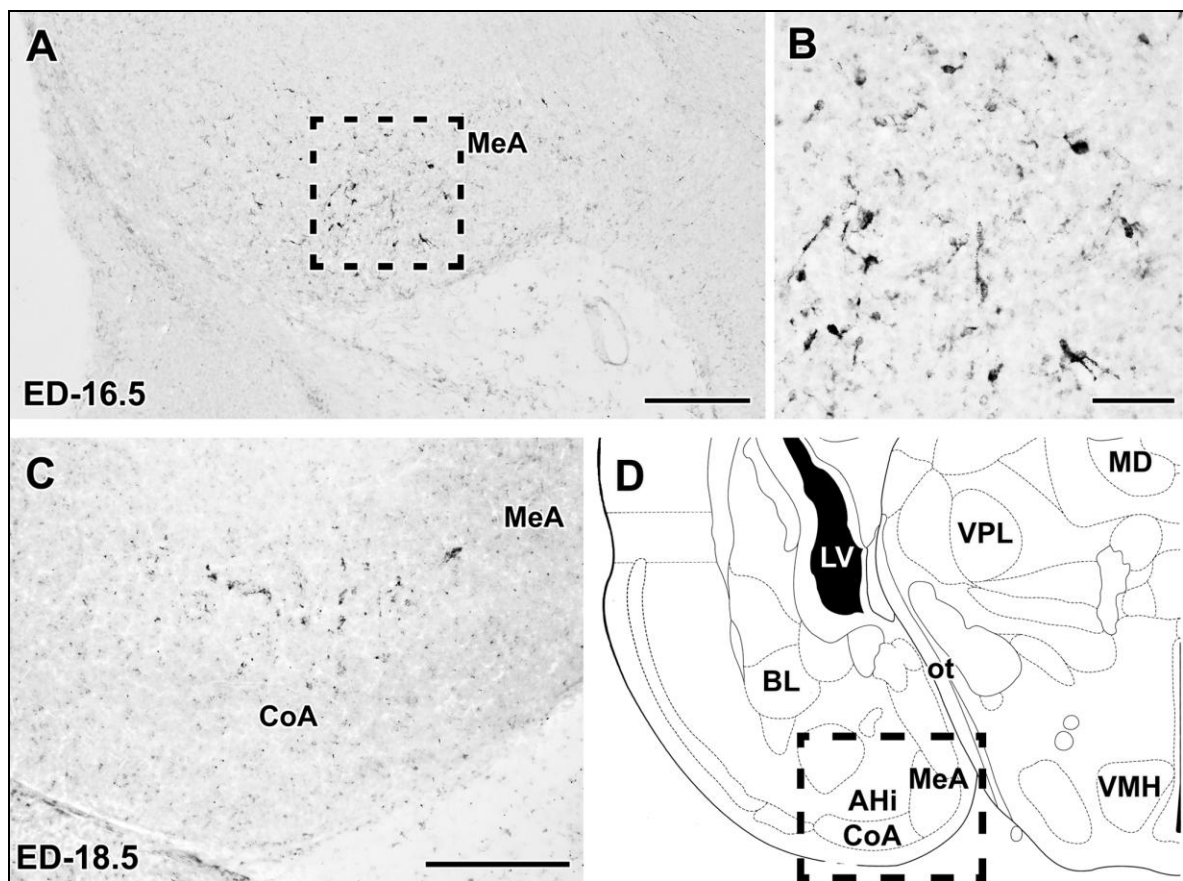


8. ábra

TIP39 immunreaktív neuronok az MPL területében a 20,5. embrionális és az 5. postnatalis napon. (A) TIP39 neuronok a 20,5. embrionális napon az MPL területén. (B) Ugyanezen sejtek nagy nagyítással. (C) Az MPL TIP39 neuronjai az 5. postnatalis napon. (D) Az MPL elhelyezkedése atlasz alapján, a keretben látható terület megfelel az A és C vizsgált területnek (Paxinos és mtsai 1991). A lépték az A ábrán 1mm-t, a B ábrán 100 μm -t, a C ábrán 500 μm -t jelöl.

5.1.1.3. TIP39 immunreaktivitás egyéb területen

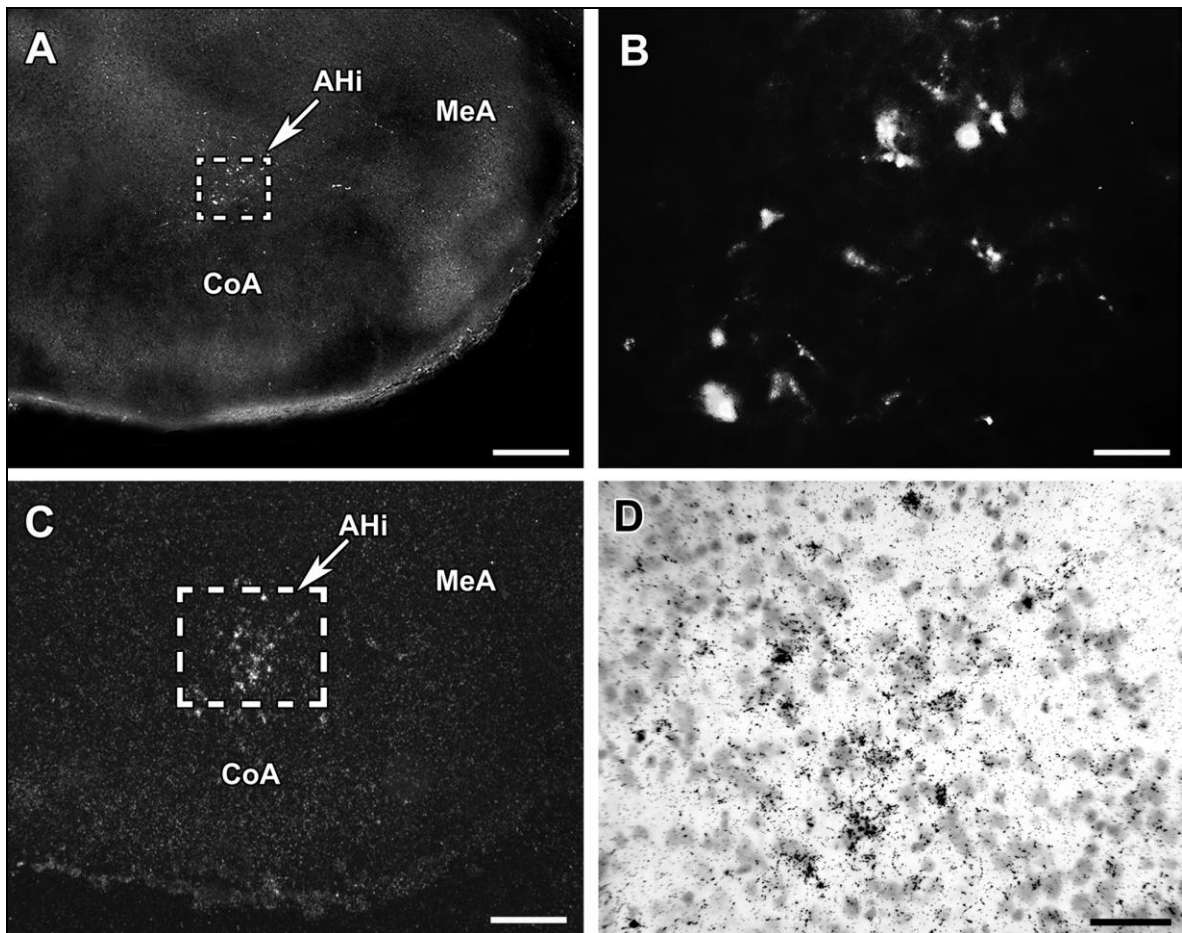
A 16,5. embrionális napon vizsgált embriókban TIP39 pozitív neuronok megjelenését észleltük az amygdala-hippocampus átmeneti zóna területén. A sejtek az átmeneti zóna anterolateralis területén, a nucleus amygdaloideus corticalis hátsó részétől dorsalisán, a nucleus amygdaloideus medialis hátsó részétől medialisán helyezkednek el, néhány sejt pedig nucleus amygdaloideus basomedialis hátsó terület mellett foglal helyet. A 16,5. nap után a sejtek immunreaktivitása fokozatosan csökken. Az 1. postnatalis napon vizsgált agyakban már csak nagyon halványan festődő sejtek láthatóak, kifejlett állatokban pedig nem kimutathatóak (9. ábra).



9. ábra

TIP39 immunreaktív neuronok az amygdalo-hippocampalis transitionális zónában a 16,5. és 18,5. embrionális napon. (A) TIP39 neuronok a 16,5. embrionális napon az amygdalo-hippocampalis átmenetben. (B) Ugyanez a terület nagy nagyítással. (C) Halványabban festődő, kevesebb TIP39 neuron a 18,5. embrionális napon az amygdalo-hippocampalis átmenetben. (D) Az amygdalo-hippocampalis transitionális zóna elhelyezkedése atlasz alapján, a keretben látható terület megfelel az A és C ábrán vizsgált területnek. (Paxinos és mtsai 1991) A lépték az A ábrán 200 μm -t, a B ábrán 50 μm -t, a C ábrán 200 μm -t jelöl.

Ezt az amygdalában ideiglenesen megjelenő TIP39 immunreaktív sejtcsoportot korábbi vizsgálatok nem írták le, így felmerült specifikus immunfestődés lehetősége is. Az immunfestés specificitását a TIP39 mRNS jelenlétének in situ hibridizációval történő kimutatásával és fluoreszcens amplifikált immunhisztokémiával kívántuk igazolni. Az amygdalát az 1. postnatalis napon vizsgáltuk – a halvány DAB festés helyett – FITC-tiramid fluoreszcens immuncitokémiával és radiotív in situ hibridizációval. Az immunfestés és az in situ hibridizáció eredményei tökéletesen megegyeztek, így igazoltuk, hogy az amygdalában leírt TIP39 immunreaktivitás valóban TIP39 expresszió következménye (10. ábra).



10. ábra

TIP39 immunreaktív és TIP39 mRNS expressziót mutató sejtek az 1. postnatalis napon az amygdalo-hippocampalis transitionális zónában. (A) TIP39 immunreaktív neuronok amplifikált fluoreszcens immunfestéssel. (B) A kerettel jelzett terület nagy nagyítással, jól láthatóak a TIP39 reaktív sejttestek. (C) Sötét látómezős in situ hibridizációs felvételen látható az A ábrának megfelelő területen a TIP39 mRNS expresszió. (D) Világos látóterű, nagy nagyítású felvétel az amygdalo-hippocampalis transitionális zónáról, a sejttestek felett jól láthatóak a TIP39 mRNS expressziót jelző autoradiographiás szemcsék. A lépték az A ábrán és C ábrán 300 μm -t, a B ábrán 30 μm -t, a D ábrán 50 μm -t jelöl.

5.2. Majom agyszöveten végzett vizsgálatok

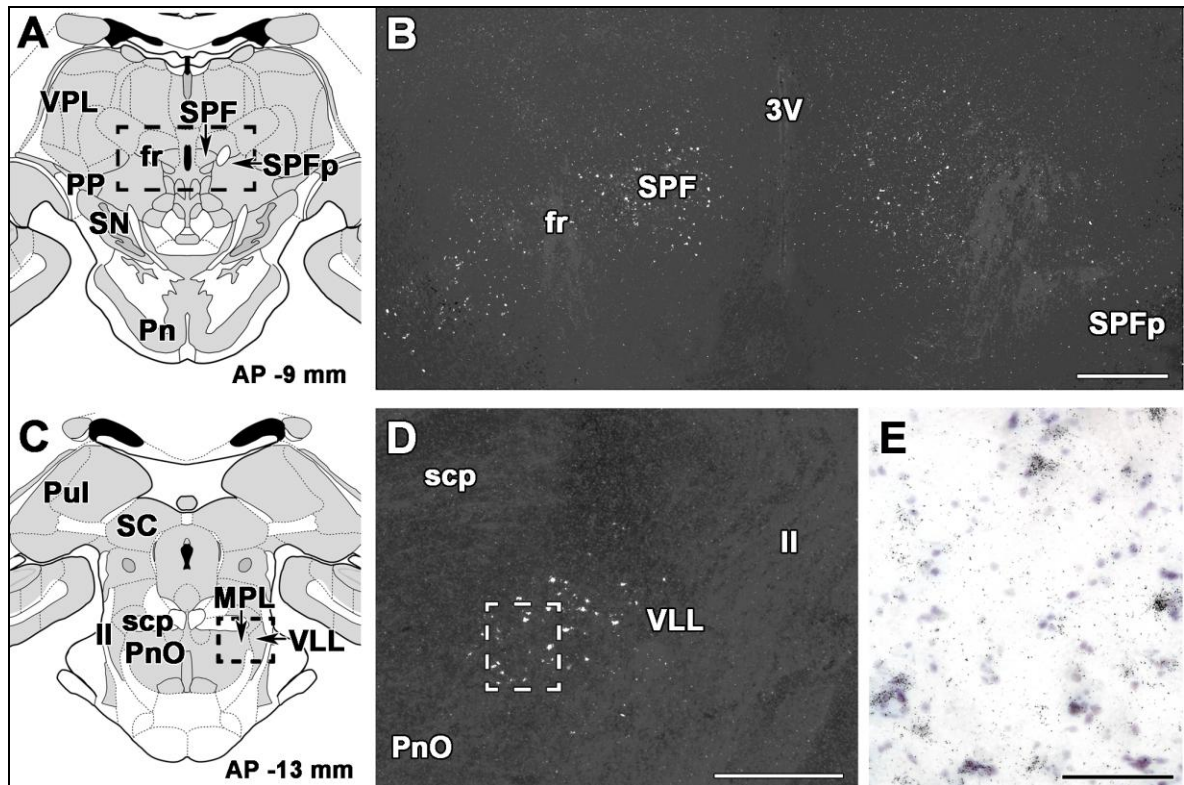
Rágcsálókon végzett korábbi vizsgálatok szerint a TIP39 expressziója csökken a születés után (Dobolyi és mtsai 2006b), ezért a TIP39 in situ hibridizációs vizsgálatokhoz egy 3 napos Rhesus majom agyát használtuk fel. Mivel a PTH2 receptor mRNA expressziója az élet folyamán nem változik (Dobolyi és mtsai 2006b), ugyanebből az agyból származó mintákon végeztük el a PTH2 receptor mRNA in situ hibridizációs hisztokémiai vizsgálatokat is.

5.2.1. TIP39 mRNA eloszlásának kimutatása majom agyban in situ hibridizációs hisztokémiával

A korábban patkány agyon végzett immuncitokémiai vizsgálatainkhoz hasonló eloszlásban, a majomagy két körülírt területén találtunk TIP39 mRNA expressziót: a hátsó thalamusban a subparafascicularis areaban (SPF) valamint a rostralis ponsban.

A TIP39 neuronok a hátsó thalamusban itt is két nagyobb csoportban jelentek meg, a fasciculus retroflexustól a medialisán, a III. kamra felé, amely megfelel patkány agyban is leírt SPF-PVG területnek, illetve a fasciculustól lateralisán és caudalisán, mely megfelel a korábban leírt parvicellularis SPF (SPFp) posterior intralaminar komplexként (PIL) leírt területének (SPFp-PIL) (11. ábra).

A TP39 neuronok másik csoportja a pontomesencephalicus átmenetben lemniscus lateralis ventralis magjától medialisán jelent meg, ez a terület megfelel a korábban leírt medialis paralemniscalis magnak (MPL) (11. ábra).



11. ábra

TIP39 mRNS expressziót mutató sejtek majom agyban. A TIP39 mRNS kimutatását coronalis síkú metszeteken végeztük in situ hibridizációval. A sötét látóterű fotókon fehér pöttyök jelzik a TIP39 mRNS jelenlétét bizonyító pozitív autoradiográfiás jelet. (A) A rajz a diencephalon-mesencephalon átmenetet mutatja coronalis síkú metszeten, majom agyban. A bekeretezett régió felel meg a B ábrán vizsgálat területnek. (B) Sötét látóterű felvétel, melyen láthatók a medialis, a III. kamra és a fasciculus retroflexus között elhelyezkedő, a subparafascicularis magnak megfelelő TIP39 expresszáló sejtek. (C) A rajz a pontomesencephalis átmenetet mutatja coronalis síkú metszetet ábrázolja. A bekeretezett régió felel meg a D ábrán vizsgálat területnek. (D) Sötét látóterű felvétel, melyen láthatók a medialis paralemniscalis magnak (MPL) megfelelő TIP39 expresszáló sejtcsoport, mely a lemniscus lateralis ventralis magjától (VLL) mediálisan helyezkedik (E) A D ábrán bekeretezett terület nagy nagyítású, világos látóterű képe, melyen jól láthatók az autoradiográfiás szemcsék a TIP39 expresszáló sejtestek felett. A lépték az B és D ábrán 1 mm-t, az E ábrán 200 μ m-t jelöl. A sémás rajzok atlaszból származó képek módosításával készültek (Atlas of the macaque brain, Martin and Bowden 1996), az AP (anterior-posterior) koordináták az atlasznak megfelelőek, ahol a zero koordináta a commissura anterior síkjának felel meg.

5.2.2. PTH2 receptor mRNS kimutatása majom agyban in situ hibridizációs hisztokémiával

Basalis ganglionok és a temporomedialis struktúrák

A legrostralisabb coronalis metszeteken lehetőségünk nyílt az amygdala, a hippocampus, valamint a törzsdúcok egy részének vizsgálatára. Míg a hippocampusban csak szórványosan látható néhány PTH2 receptort expresszáló neuron, addig az amygdala, mind a centrális, mind a mediális mag területe bőségesen tartalmaz PTH2

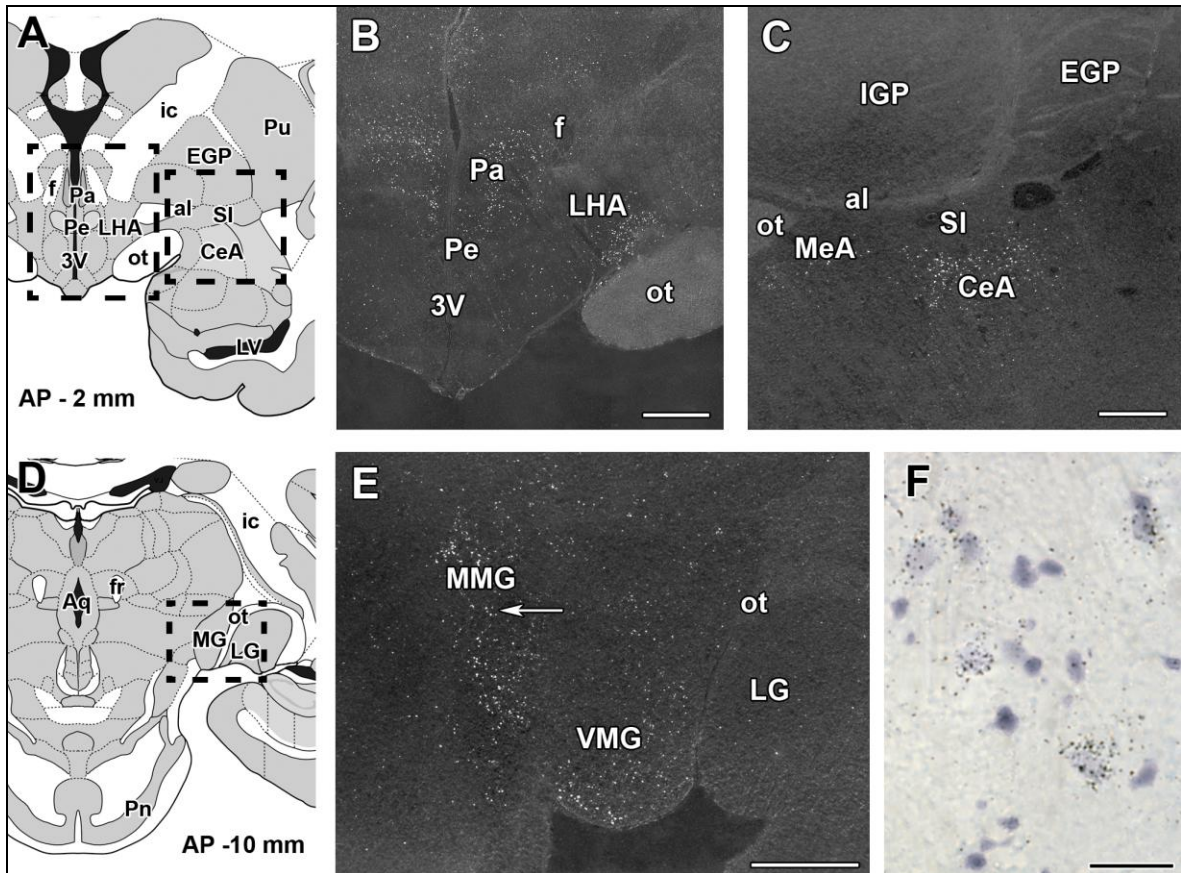
receptort expresszáló sejteket. Az amygdala egyéb területein sokkal kisebb mértékű PTH2 receptor expressziót látunk. Hasonló gyenge PTH2 receptor expressziót találtunk a nucleus caudatusban, a substantia innominata területén. A putamen, valamint a globus pallidus területén PTH2 receptor expresszió nem volt igazolható (12. ábra).

Thalamus

Összességében a corpus geniculatum mediale területét kivéve alig láttunk PTH2 receptor expressziót a thalamusban. A corpus geniculatum medialen belül a legkifejezettebb expressziót a mediális magban, valamivel csekélyebbet a ventralis magban találtunk. A dorsalis mag és a szomszédos nucleus suprageniculatus thalami nem mutatott PTH2 receptor expressziót. Kevés PTH2 receptor expressziót mutató neuront találtunk még a középvonali thalamus magokban, elsősorban a paraventricularis magban, a habenula lateralis magjában, a peripeduncularis areaban és a corpus geniculatum lateraleban. A thalamus elülső, lateralis, ventralis, hátulsó magcsoportjai vizsgálatainkban nem expresszáltak PTH2 receptor mRNS-t.

Hypothalamus

A hypothalamus rendkívül gazdag PTH2 receptort expresszáló neuronokban. A legkifejezettebb expressziót mutató terület a medialis preopticus mag, míg a preopticus area egyéb területei gyengébb PTH2 receptor expressziót mutatnak. A hypothalamus paraventricularis magja, különösen a mag parvicellularis része nagyon intenzív PTH2 receptor expressziót mutatott. A PTH2 receptort -expresszáló neuronok, bár kisebb számban, a periventricularis magban is megtalálhatóak voltak. Intenzív PTH2 receptor expresszáló sejtek csoportját találtuk még a lateralis hypothalamicus area (LHA) ventralis részében. A hypothalamus egyéb részeiben (nucleus supraopticus, anterior hypothalamic nucleus, nucleus infundibularis, ventromedial hypothalamic nucleus, dorsomedial hypothalamic nucleus, perifornical hypothalamic nucleus, posterior hypothalamic nucleus, tuberomamillary nucleus, premamillary nucleus) csak kis számban találtunk PTH2 receptort kifejező sejteket. Kevés PTH2 receptor expresszáló sejt volt látható a corpus mamillareban (superior mamillary nucleus) és a nucleus subthalamicusban.

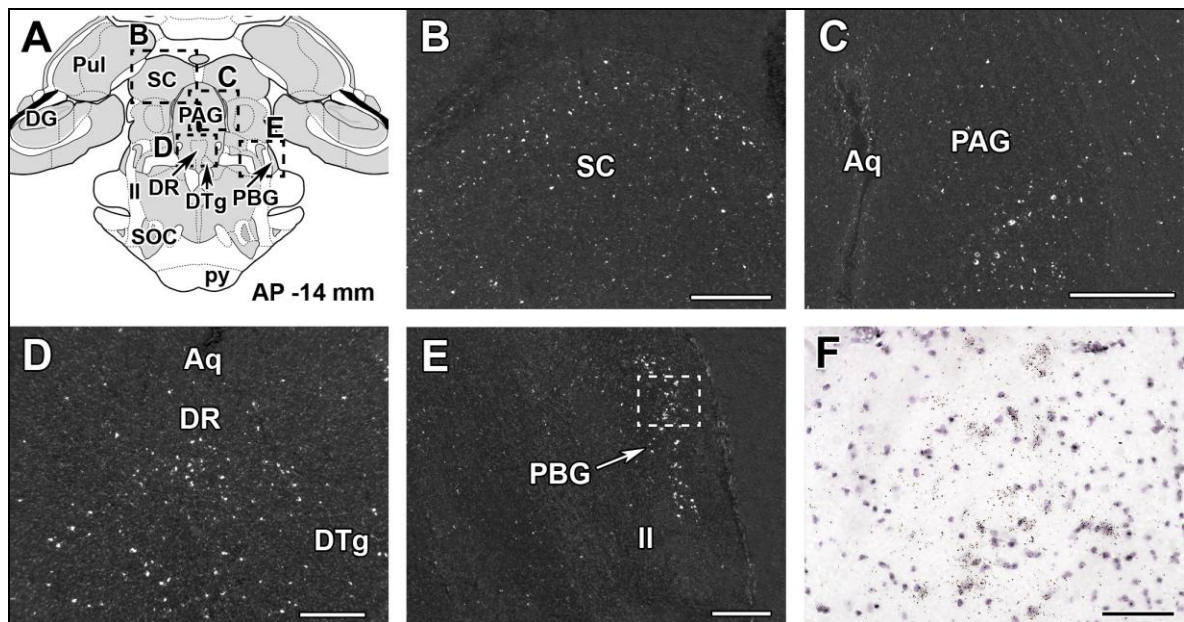


12. ábra

PTH2 receptor expressziót mutató sejtek majomban a diencephalon és az amygdala területén. A PTH2 receptor mRNS kimutatását coronalis síkú metszeteken végeztük in situ hibridizációval. A sötét látóterű fotókon fehér pöttyök jelzik a PTH2 receptor mRNS jelenlétét bizonyító pozitív autoradiográfias jelet. (A) A rajz a hypothalamus síkjában készített coronalis síkú metszet, melyen medialisan a hypothalamus, lateralisan a temporomedialis struktúrák és törzsdúcok láthatóak. A bekeretezett régiók a B és C képeken vizsgált területeknek felelnek meg. (B) Sötét látóterű felvétel, melyen nagyszámú PTH2 receptort expresszáló neuron látható a hypothalamus paraventricularis magjában (Pa) valamint a lateralis hypothalamicus area (LHA) ventralis részében. Szintén láthatók a III. kamra és a fasciculus retroflexus között elhelyezkedő, a subparafascicularis magnak megfelelő TIP39 expresszáló sejtek. (C) Sötét látóterű felvétel nagyobb számú PTH2 receptort expresszáló neuron látható az amygdala centralis (CeA) magjában, míg hasonló sejtek láthatók, csak kisebb számban a medialis magban (MeA). (D) A rajz a metathalamus magasságában készült coronalis síkú metszetet ábrázolja a két corpus geniculatummal. A bekeretezett régió felel meg az E ábrán vizsgált területnek. (E) Sötét látóterű felvétel, melyen nagyszámú PTH2 receptort expresszáló neuron látható a corpus geniculatum mediale medialis (MMG) és ventralis (VMG) magjában, míg a corpus geniculatum laterale (LG) területén alig látunk PTH2 receptort expressziót. (F) Nagy nagyítású, világos látóterű felvétel, melyen jól láthatók az autoradiográfias szemcsék a PTH2 receptort expresszáló sejtek felett a corpus geniculatum mediale területén. A lépték a B, C és E ábrán 1 mm-t, az F ábrán 200 μ m-t jelöl. A sémás rajzok atlaszból származó képek módosításával készültek (Atlas of the macaque brain, Martin and Bowden 1996), az AP (anterio-posterior) koordináták az atlasznak megfelelőek, ahol a zéró koordináta a commissura anterior síkjának felel meg.

Mesencephalon

A mesencephalon több részében is találunk bőséges PTH2 receptor mRNS expressziót. A colliculus superior felszínes rétegeiben kifejezett, míg mélyebb rétegeiben gyengébb PTH2 receptor expressziót láttunk. A periaquaeductalis szürkeállományban, elsősorban a lateralis területeken találtunk több PTH2 receptort kifejező sejtet, míg az egyéb területeken kevesebbet. Erős expressziót láttunk a dorsalis raphe magban és a parabigeminalis nucleus területén is. A középagy egyéb területei diszkrétebb PTH2R kifejeződést mutattak, ide tartozik a zona incerta, a ventralis tegmentalis area, a subbrachialis mag és colliculus inferior. Nem találtunk expressziót a substantia nigra, a nucleus ruber és az oculomotorius magok területén (13. ábra).



13. ábra

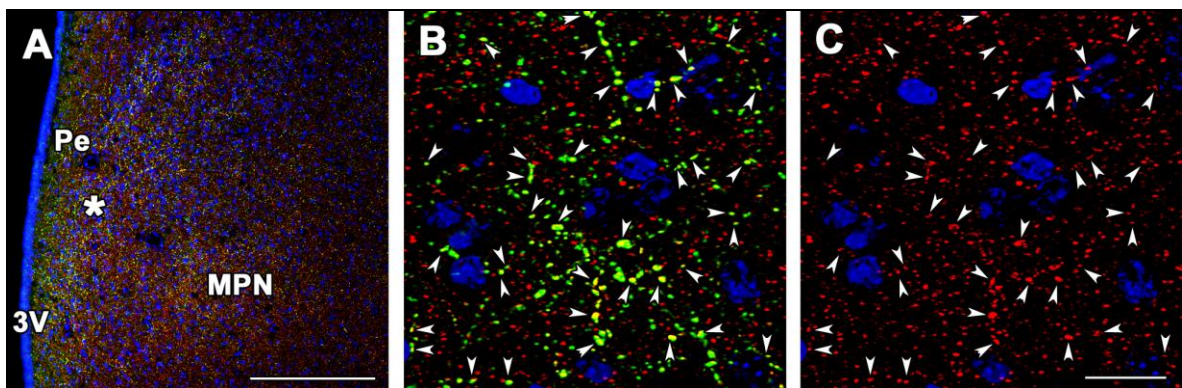
PTH2 receptor expressziót mutató sejtek majom mesencephalonban. A PTH2 receptor mRNS kimutatását coronalis síkú metszeteken végeztük in situ hibridizációs hisztokémiával. A sötét látóterű fotókon fehér pöttyök jelzik a PTH2 receptor mRNS jelenlétét bizonyító pozitív autoradiográfias jelet. (A) A rajz a mesencephalon síkjában készített coronalis síkú metszet. A bekeretezett régiók a B (colliculus superior), C (periaqueductal gray), D (dorsal raphe nucleus) és E (parabigeminal nucleus) képeken vizsgált területeknek felelnek meg. (B) Sötét látóterű felvétel, melyen számos PTH2 receptor expresszáló neuron látható colliculus superior (SC) külső rétegében. (C) Sötét látóterű felvétel PTH2 receptor expresszáló neuronok láthatóak a periaquaeductalis szürkeállomány ventrolateralis részén. (D) Sötét látóterű felvétel, melyen PTH2 receptort kifejező neuronok láthatóak a dorsalis raphe magban (DR) (E) Sötét látóterű felvétel, melyen PTH2 receptor expresszáló neuronok láthatóak a parabigeminalis magban (PBG) a lemniscus lateralistól (II) lateralisan. (F) Nagy nagyítású, világos látóterű felvétel, mely az E ábrán bekeretezett területnek felel meg. Jól láthatók az autoradiográfias szemcsék a PTH2 receptor mRNS-t kifejező sejttestek felett a parabigeminalis mag területén. A lépték az B és C ábrán 1mm-t, a D és E ábrán 500 μ m-t, az F ábrán pedig 100 μ m-t jelöl. A sémás rajzok atlaszból származó képek módosításával készültek (Atlas of the macaque brain, Martin and Bowden 1996), az AP (anterior-posterior) koordináták az atlasznak megfelelőek, ahol a zéró koordináta a commissura anterior síkjának felel meg.

Pons

A ponsban a nucleus tegmentalis dorsalis (ahol intenzív mRNS in situ hibridizációs jelet láttunk) kivételével csak kevés, szétszórt PTH2 receptort kifejező neuront találtunk a tegmentum, a parabrachialis magok, trigeminus érzőmagja és a formatio reticularis területén.

5.2.3. Vesicularis glutamát transzporter (VGLUT2) kimutatása PTH2 receptor immunreaktív terminálisokon

A vizsgálatokhoz a majom agy commissura anteriortól a diencephalon végéig terjedő szeleteit használtuk fel. Kiterjedt PTH2 receptor immunreaktív rosthálózatot találtunk a lateralis septumban, a thalamusban és hypothalamusban, és néhány pozitív rostot a kérgi területekben. A lateralis septumban és praeopticus areában kettős immunfestéssel gyakorlatilag az összes PTH2 receptor immunreaktív rost tartalmazott VGLUT2 immunreaktivitást (14. ábra).



14. ábra

PTH2 receptor és VGLUT2 immunreaktivitás egymáshoz viszonyított elhelyezkedése majomagy praeopticus area magasságában készített coronalis síkú metszetein kettős immunfestéssel. (A) A kis nagyítású fluomikroszkópos felvételen látható, hogy a hypothalamus periventricularis magjában (Pe), a medialis praeopticus nucleusban (PMN) mind PTH2 receptor (zöld), mind VGLUT2 (piros) immunreaktív rostok és terminálisok megtalálhatóak. A PTH2 receptor rostok FITC-tiramid, a VGLUT2 rostok karbo-cianid festést, míg sejtmagok DAPI (kék) háttérfestést kaptak. A * a B és C képeken a vizsgált területet jelzi. (B) Nagy nagyítású konfokális mikroszkópos képen látható, hogy a PTH2 receptor -immunoreaktív terminálisok jelentős része VGLUT2 kolokalizációt mutat, melyek sárga színnel láthatóak fotón (zöld+piros=sárga). Számos ilyen terminálist fehér nyíllal jelöltünk meg. Látható hogy számos egyéb rost is jelen van, melyek csak VGLUT2-re festődnek, ezek továbbra is piros színnel ábrázolódnak. (C) A zöld kikapcsolása után ugyanebben a látótérben láthatóak az előző képen is nyíllal jelölt PTH2 receptor -VGLUT2 kolokalizációt mutató rostok és terminálisok. A lépték az A ábrán 300µm-t, a B és C ábrán pedig 30µm-t jelöl.

5.3. Humán agyszöveten végzett vizsgálatok

5.3.1. PTH2 receptor immunreaktivitás eloszlása a humán agyszövetben

Immuncitokémiai vizsgálatokkal humán agyszövet különböző területein találtunk PTH2 receptor immunreaktivitást, melyet az alábbiakban anatómia szerint részletezünk és később táblázatban is összefoglalunk.

Cortex

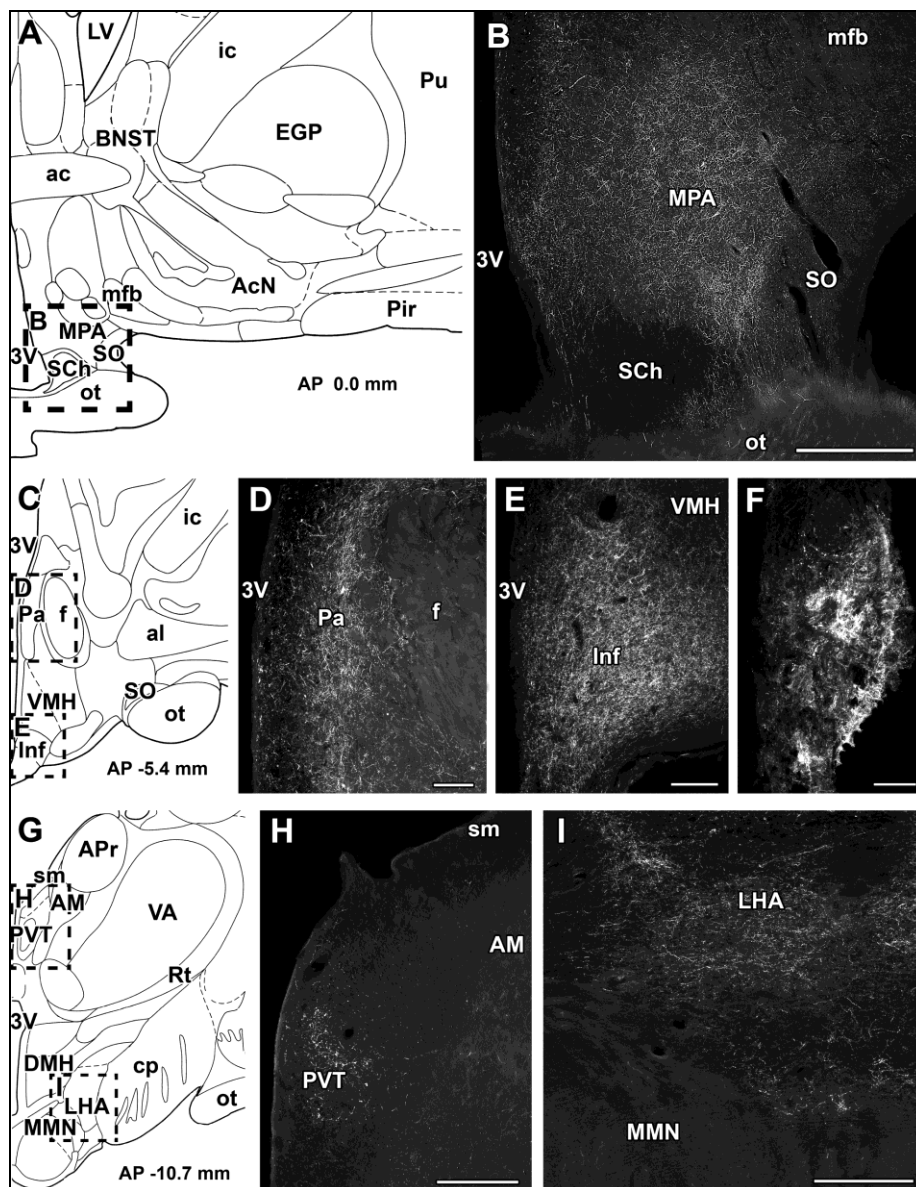
Az insularis cortex vizsgálatára nyílt lehetőségünk, itt csak néhány elszórt PTH2R pozitív rostot sikerült kimutatnunk.

Thalamus

A thalamusban viszonylag kevés PTH2 receptor pozitívitas található. Jelentősebb számú PTH2 receptor pozitív rostot csak a paraventricularis magban találunk. Kevés további PTH2 receptor reaktív rost látható még az anteromedialis, lateralis hátsó és suprageniculatus magokban, továbbá a habenulában, a peripeduncularis areaban és a corpus geniculatum lateraleban (15. ábra).

Hypothalamus

A hypothalamus az agy PTH2 receptor rostokkal és terminálisokkal legjobban átszőtt területe. Különösen sűrű immunfestést mutat a medialis praeopticus area, míg a lateralis praeopticus area festődése csekély. Hasonlóan intenzív PTH2 receptor immunreaktivitás észlelhető a paraventricularis és infundibularis magokban, ezek az immunreaktív rostok az eminentia mediana felé vetülnek, ahol szintén erős immunfestést találunk, különösen a külső rétegben. Számos immunpozitív rost található az egész lateralis hypothalamicus areaban, a nucleus supraopticusban, a dorsomedialis és hátsó hypothalamicus és a tuberomamillaris valamint praemamillaris magokban. Mérsékelt erős immunfestés látható az elülső, ventromedialis, perifornicalis és subthalamicus magokban, a corpus mamillareban, míg a nucleus suprachiasmaticusban csak néhány elszórt immunpozitív rost látható (15. ábra).



15. ábra

Humán diencephalon PTH2 receptor immunreaktivitás vizsgálata FITC-tiramid fluoreszcens amplifikációs immuncitokémiával coronalis metszeteken. (A) A rajz a commissura anterior síkjában készített coronalis metszetet ábrázolja. A keretezett régió, a B képen vizsgálat terület, a praeopticus area. (B) Sűrű PTH2 receptor pozitív rosthálózat látható a medialis praeopticus area (MPA) területén, míg csekély vagy hiányzik az immunreaktivitás a supraopticus (SO) és a suprachiasmaticus magok (Sch) területén. (C) A rajz a hypothalamus paraventricularis magjának síkjában készült coronalis metszetet ábrázolja, a keretezett területek a D és E ábrán vizsgáltaknak felelnek meg. (D) Sűrű PTH2 receptor pozitív rosthálózat látható a paraventricularis magban (Pa). (E) Hasonló kép látható a nucleus infundibularisban (F) Markáns PTH2 receptor festődés látható az eminentia medianat elérő terminálisok területén. (G) A rajz a corpora mamillaria síkjában készült coronalis metszetet ábrázolja, a keretezett területek a H és I ábrán vizsgáltaknak felelnek meg. (H) Bő PTH2 receptor pozitív rosthálózat látható a thalamus paraventricularis magjában (PVT), míg a szomszédos anteromedialis magban (AM) nem látunk érdemi immunfestést. (I) Sok PTH2 receptor reaktív rost látható a lateralis hypothalamicus areaban (LHA), míg a nucleus mamillaris medialis (MMN) nem festődik. A sémás rajzok atlaszból származó képek módosításával készültek (Atlas of the human brain, Mai et al, 1997), az AP (anterior-posterior) koordináták az atlasznak megfelelőek, ahol a zéró koordináta a commissura anterior síkjának felel meg. A lépték az B, H és I ábrán 1mm-t, a D, E és F ábrán 500 μ m-t jelöl.

Mesencephalon

A középagyban a legnagyobb immunpozitív rostsűrűség a periaquaeductalis szürkeállományban (PAG) található. A PTH2 receptor immunreaktív rostok hálózatot képeztek a PAG dorsomedialis és lateralis részében, míg a rostsűrűség alacsonyabb volt a dorsolateralis és ventralis területekben. A mesencephalon következő területei is relatíve magas számban tartalmazznak PTH2 receptor immunreaktív rostokat: zona incerta, subbrachial nucleus, pretectal area, colliculus superior, colliculus inferior és a ventral tegmental area. Még alacsonyabb immunreaktivitást találtunk dorsalis raphe magban, viszont egyáltalán nem találtunk PTH2 receptor festődést a substantia nigrában, a nucleus ruberben és az oculomotorius magok területében (16. ábra).

Pons

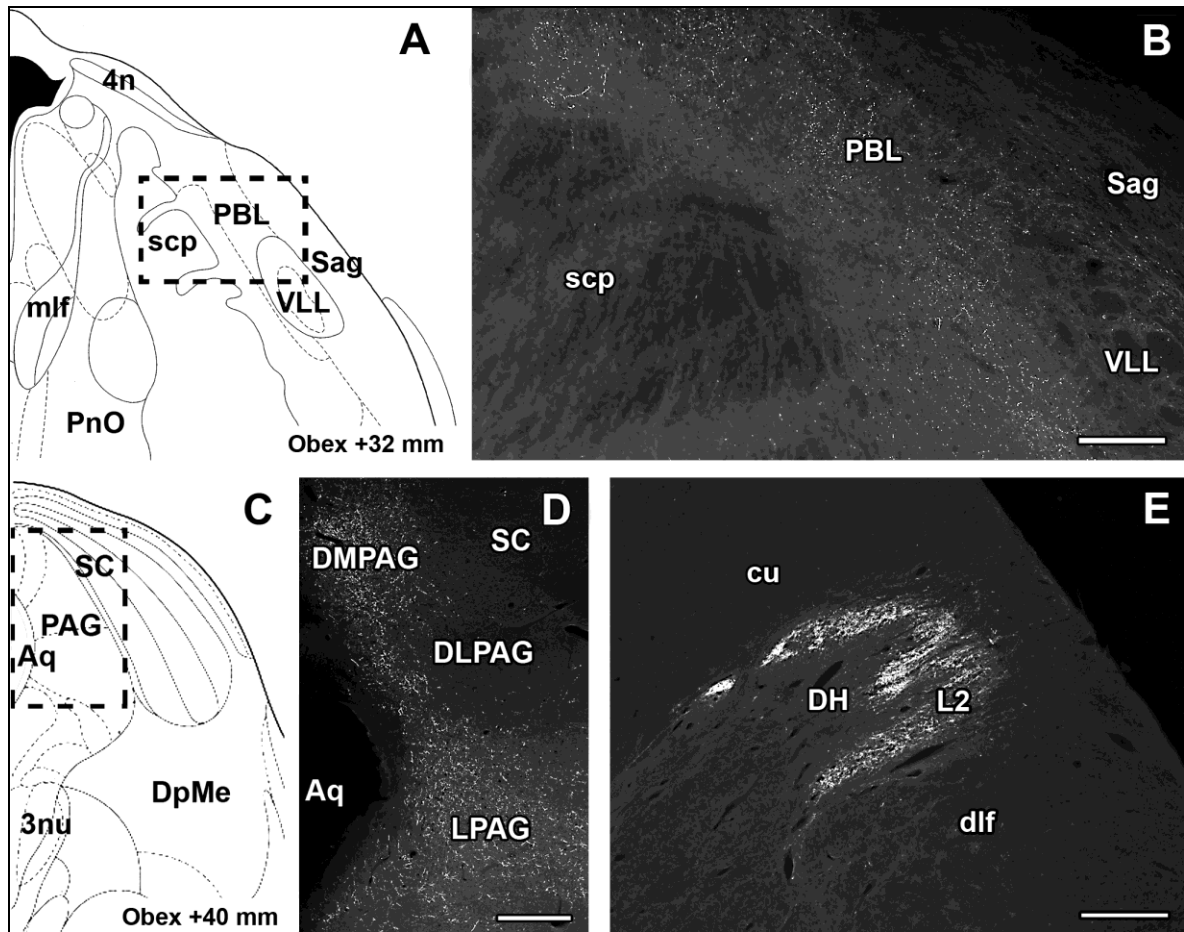
Sűrű PTH2 receptor immunpozitív rosthálózat található a lateralis parabrachialis magban. Jóval alacsonyabb rostdenzitást láttunk a tegmentumban és a trigeminus sensoros magjában. Elszórva egy-egy PTH2 receptor reaktív rostfestődést találtunk a formatio reticularisban, a pontin raphe nucleusban, az oliva superior magjában és a vestibularis magokban (16. ábra).

Medulla oblongata

Kifejezett PTH2 receptor immunpozitivitást találtunk a nucleus spinalis nervi trigeminiben, hasonló festődés volt látható a nucleus tractus solitarii area postrema mellett elhelyezkedő részében, valamint a nucleus dorsalis reticularisban. PTH2 receptor pozitív rostok találhatóak még az aera postremában és a formatio reticularis nyúltveői szakaszán is.

Medulla spinalis

A gerincevelő haránt metszetein varicositásokban gazdag PTH2 receptor immunpozitív rostokat találunk jelentős számban a szürkeállomány hátsó szarvában, a Rexed I-II zónában. Néhány gyengébben festődő rost látható a intermediomedialis magban és a Rexed X. zónában. Néhány elszórt PTH2 receptor immunreaktív rost látható még a hátsó szarv mélyebb zónáiban illetve a ventralis szarvban.



16. ábra

PTH2 receptor immunoreaktivitás vizsgálata humán mesencephalon, a pons és a medulla oblongata területén FITC-tiramid fluoreszcens amplifikációs immuncitokémiával coronalis metszeteken. (A) A rajz a rostralis pons síkjában készített coronalis metszetet ábrázolja. A keretezett régió, a B képen vizsgálat területnek felel meg. (B) Sűrű PTH2 receptor pozitív rosthálózat látható a parabrachialis nucleusban (PBL) míg a lemniscus lateralis szomszédos ventralis magjában nem látunk festődést. (C) A rajz a rostralis mesencephalon síkjában készült coronalis metszetet ábrázolja, a keretezett területek a D ábrán vizsgált területek felel meg. (D) Sűrű PTH2 receptor pozitív rosthálózat látható a periaquaeductalis (PAG) dorsomedialis (DMPAG) és lateralis területében (LPAG). (E) Kifejezett PTH2 receptor immunreaktivitást mutató, gazdag rosthálózat látható a C2 magasságában készített gerincvelői metszeten a Rexed II. zónában (L2) a hátsó szarv (DH) területén. A szomszédos fasciculus cuneatus, a fasciculus dorsolateralis és a hátsó szarv mélyebb zónái is csak elvétve tartalmaznak egy-egy immunpozitív rostot. A sémás rajzok atlaszból származó képek módosításával készültek (Atlas of the human brainstem, Paxinos and Huang, 1995), az AP (anterior-posterior) koordináták az atlasznak megfelelőek, ahol a zéró koordináta az obex síkjának felel meg. A lépték a B, D és E ábrán 500 μm -t jelöl.

5.3.2. PTH2 receptor expresszió eloszlása humán agyszövetben RT-PCR vizsgálatokkal

A humán mintákból 2-10 μg RNS-t nyertünk. Formaldehid gélen való futtatás során a 28S rRNS legalább egyforma intenzitást mutatott a 18S csíkkal, így megfelelő RNS minőségre következtettünk az összes mintában. PTH2 receptor specifikus primerpárral

végzett reverz transzkripciót követően különböző intenzitású, de a várt 440bp hosszúságnak megfelelő csíkot kaptunk a gélen, mely megfelelt a használt primer párral nyerhető PTH2 receptor specifikus PCR terméknek. A terméket szekvenálással is igazoltuk. A gélen kapott csík intenzitásából következtettünk az adott mintában lévő terület PTH2R expressziójára.

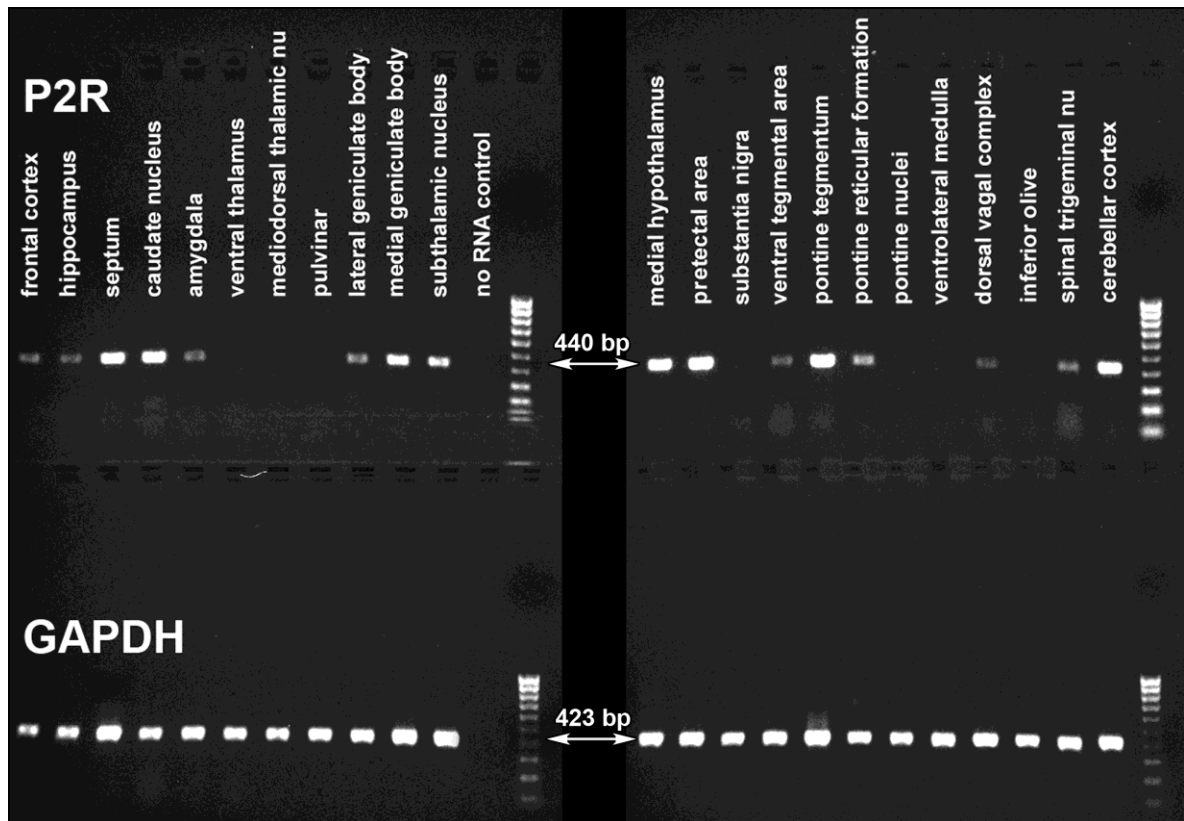
Magas intenzitású PCR csíkot kaptunk a septumból, a nucleus caudatusból, a corpus geniculatum medialeből, a praetectalis területből, a pons tegmentumából és a cerebellaris cortexből származó mintákból.

Alacsonyabb PTH2 receptor kifejeződésre utaló eredményt kaptunk a frontalis cortexből, az amygdalából, a corpus geniculatum lateraleből, a nucleus subthalamicusból, a ventralis tegmentalis areából, a dorsal vagal complexből és a nucleus spinalis trigeminiből származó mintákból.

Nem kaptunk PTH2 receptor specifikus PCR terméket az alábbi területekből származó mintákból: ventralis thalamus, mediodorsal thalamic nucleus, pulvinar, substantia nigra, nuclei pontis, oliva inferior és medulla oblongata ventrolateralis része.

Kilenc egyéb területről két különböző agyból is kaptunk mintákat. Mindkét agyból egyforma, közepesen intenzív jelet kaptunk a hippocampusból, a nucleus subthalamicusból és a pons formatio reticularisából származó mintákban. Egyik agyban sem kaptunk PCR terméket a következő területekről: ventralis thalamus, mediodorsal thalamic nucleus, nuclei pontis. A két agy között különbséget láttunk a praetectalis areából, a tegmentum pontisból és a cerebellaris cortexből kapott mintákban. Itt mindkét agy esetén pozitív eredményt kaptunk, de a második agyból származó mintákban a PCR csík intenzitása alacsonyabb volt.

A PCR reakció kontrolljaként GAPDH specifikus primerekkel minden RNSt tartalmazó mintában a várt 423bp hosszúságú PCR terméket kaptuk, míg az RNSt nem tartalmazó minta negatív kontrollként szolgált (17. ábra).

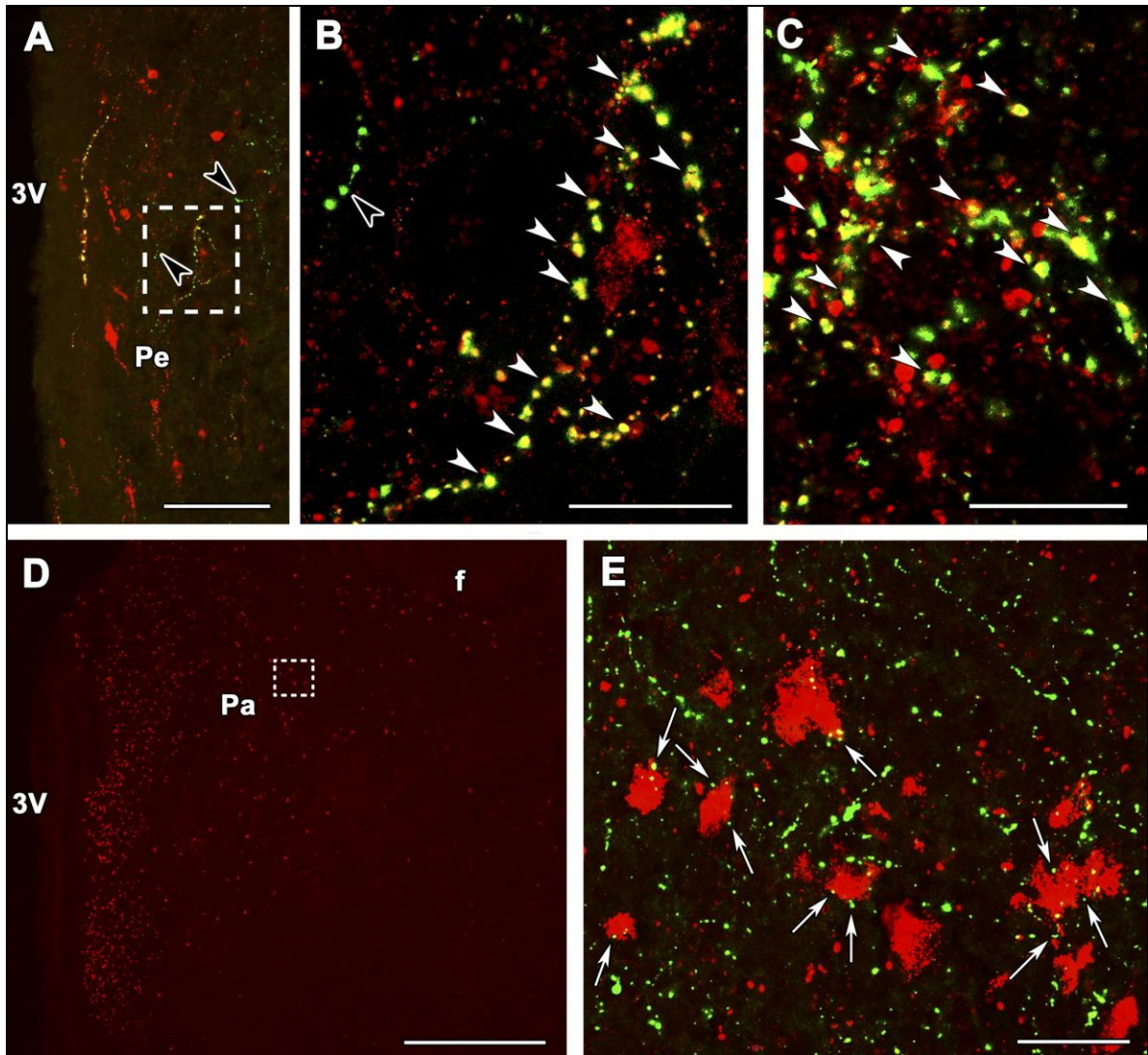


17. ábra

PTH2 receptor expresszió kimutatása humán agy különböző területeiből származó mintákból reverz transzkripció PCR technikával. A szövetmintákból származó cDNS mintákkal és a PTH2 receptor specifikus primer párral végzett PCR reakció termékeit futtattuk gélen. A felső sorban a PTH2 receptor specifikus 440bp hosszúságú PCR termék csíkjai láthatóak – különböző intenzitással, melyből a különböző területek eltérő PTH2 receptor expressziós aktivitására következtethetünk. Az alsó sorban a PCR reakció pozitív kontrolljaként alkalmazott GAPDH gén jelenlétére utaló 423 bp hosszúságú PCR termék csíkjai láthatóak minden RNS-t tartalmazó mintában, egyforma intenzitással.

5.3.3. PTH2 receptor immunreaktív rostok viszonya emberi hypothalamus somatostatin és CRH termelő neuronjaihoz.

A hypothalamus periventricularis magjában a somatostatin-immunreaktív neuronokat és az eminentia mediana valamint hypothalamus mediobasalis részei felé vetülő somatostatin-immunreaktív rosthálózatot találunk. Kettős immunfestéssel igazoltuk, hogy ezen somatostatinerg rostok egy része PTH2 receptor immunfestődést is mutat, míg más rostok vagy csak PTH2 receptor vagy somatostatin specifikus festődést mutatnak.



18. ábra

PTH2R immunreaktív rostok viszonya somatostatin és CRH immunreaktív rostokhoz és sejtekhez humán hypothalamus paraventricularis, periventricularis magjaiban és az eminentia medianában. Kettős immunfestéssel készült felvételek coronalis síkú metszetekről. Az A, B és C képeken PTH2R és somatostatin, a D és E képeken PTH2R és CRH immunfestést alkalmaztunk. (A) Somatostatin pozitív rostok és sejtek (piros), valamint fekete nyíllal jelölt PTH2R pozitív rostok (zöld) a periventricularis magban (Pe). A keretezett régió, a B képen vizsgált területnek felel meg. (B) Nagy nagyítással készült konfokális képen látható a PTH2R és somatostatin kolokalizáció (sárga), melyet fehér nyíllal jelöltünk. A kolokalizáció arra enged következtetni, hogy a somatostatin rostok egy része PTH2 receptort tartalmaz. (C) Az eminentia medianaról készült nagy nagyítású konfokális képen láthatóak a fehér nyíllal jelölt kettős, PTH2R és somatostatin festődést mutató sárga színű terminálisok. (D) CRH immunreaktív sejtek és rostok a paraventricularis magban (Pa). A keretezett régió, az E képen vizsgált területnek felel meg. (E) Nagy nagyítású konfokális képen CRH pozitív sejtestek és rostok (piros), valamint PTH2R pozitív rostok (zöld) láthatóak. Nem látjuk a kolokalizációra utaló sárga festődést, de megfigyelhető, hogy a varicosus rost terminálisok nagyon megközelítik a CRH pozitív sejtesteket, ahogy ezeket fehér nyíllal meg is jelöltük. A lépték az A ábrán 200 μm -t, a B és E ábrán 50 μm -t, a C ábrán 30 μm -t, a D ábrán 1 mm-t jelöl.

Az eminentia mediana területén nagyon nagy számban találunk PTH2 receptor és somatostatin immunpozitív rostokat. Nagy nagyítással látható, hogy magában az eminentia medianában lévő PTH2 receptor terminálisok döntő többsége somatostatin festődést mutat. Ezzel szemben a somatostatin terminálisoknak csak egy része kolokalizál a PTH2 receptor immunreaktivitással.

A hypothalamus paraventricularis magjában jelentős számban találunk CRH immunreaktív rostokat és neuronokat. Kettős immunfestéssel viszont azt láttuk, hogy a CRH pozitív rostok nem mutattak kettős festődést az itt található PTH2 receptor pozitív rostokkal, bár a PTH2 receptor terminálisok nagyon megközelítették a CRH pozitív sejttesteket (18. ábra).

5.4. A PTH2 receptor térképezés összefoglaló eredményei főemlős és rágcsáló agyon.

Irodalmi adatok szerint a PTH2 receptor legjobb anatómiai feltérképezése eddig egér agyban történt meg. A humán agymintákon reverz-transzkripció PCR technikával (RT-PCR), immuncitokémiával (ICCH), valamint a majom agyszövetben in situ hibridizációs (ISHH) technikával nyert lokalizációs adatainkat a korábbi irodalmi (egér) adatokkal való összehasonlításban a 3. táblázatban tüntettük fel. Az RT-PCR, valamint in situ hibridizációs hisztokémia szolgáltatott adatok alapján elsősorban a PTH2 receptor mRNS szintézisének helyét, a perikaryonokat térképeztük fel, míg immuncitokémiával (a humán mintákban a sejttestek nem igazán festődnek) a PTH2 receptor immunreaktív rosthálózat anatómiai elhelyezkedését ismerhettük meg. A táblázatban színekkel használtunk a PTH2 receptor, vagy PTH2 receptor mRNS jelenlétének szemikvantitatív megjelenítésére.

A vizsgált szeletben talált jelölt sejtek száma:

nincs jelölt sejt:	fehér mező (N)	N
1-10 jelölt sejt:	világoskék mező (+)	
11-20 jelölt sejt:	középkék mező (++)	
20-nál több jelölt sejt:	sötétkék mező (+++)	

Hasonlóan ehhez, rostok esetében:

nincs jelölt rost:	fehér mező (N)	N
kevés jelölt rost:	halványpiros mező (+)	
számos jelölt rost:	piros mező (++)	
sok jelölt rost:	bordó mező (+++)	

3. táblázat

	PTH2R mRNS - sejttestek			PTH2R immunreaktív rostok	
	humán RT-PCR	majom ISHH	egér ISHH	humán ICCH	egér ICCH
Hemisphaeriumok					
Cortex					
Frontális kéreg					N
Insularis kéreg					
Hippocampus					
					N
Septum pellucidum					
Medial septal nucleus			N		N
Lateral septal nucleus					
Amygdala					
Central nucleus					
Basal nuclei					N
Lateral nucleus					N
Medial nucleus					
Cortical nucleus					
Törzsdúcok					
Nucleus caudatus					N
Putamen nuclei lentiformis		N			
Globus pallidus		N			N
Clastrum					
Nucleus accumbens					
Substantia innominata					
Diencephalon					
Thalamus					
Anterior thalamic nuclei		N	N		N
Midline thalamic nuclei					
Lateral thalamic nuclei		N	N		
Ventral thalamic nuclei	N	N	N	N	N
Reticular nucleus		N	N	N	N
Mediodorsal thalamic nucleus	N	N	N	N	N
Habenular nuclei					
Posterior thalamic nuclei		N	N		
Peripeduncular area					
Suprageniculate thalamic nucl.					
Corpus geniculatum mediale					
Dorsal nucleus		N	N	N	N
Ventral nucleus					
Medial nucleus					
Corpus geniculatum laterale					
Pulvinar thalami	N	N			
Hypothalamus					
Medial preoptic area					
Lateral preoptic area					
Nucleus supraopticus					
Supraoptic decussations					
Suprachiasmatic nucleus		N	N	N	N
Anterior hypothalamic nucleus					
Nucleus paraventricularis					
Nucleus periventricularis					
Nucleus arcuatus					
Eminentia mediana					
Ventromedial nucleus					

3. táblázat (folytatás)

	PTH2R mRNS - sejttestek			PTH2R immunreaktív rostok	
	humán RT-PCR	majom ISHH	egér ISHH	humán ICCH	egér ICCH
Dorsomedial nucleus					
Lateral hypothalamic area					
Perifornical nucleus					
Posterior hypothalamic nucleus					
Tuboromamillary nucleus					
Premamillary nucleus					
Corpus mamillare					
Superior mamillary nucleus					
Medial mamillary nucleus				N	N
Lateral mamillary nucleus					
Nucleus subthalamicus					
Mesencephalon					
Zona incerta					
Substantia nigra	N	N	N	N	N
Nucleus ruber		N	N	N	N
Subbrachial nucleus					
Pretectal area		N			
Colliculus superior					
Colliculus inferior					
Parabigeminal nucleus					
Periaqueductal gray					
Dorsal raphe nucleus					
Ventral tegmental area					
Nuclei nervi oculomotorii		N	N	N	N
Pons					
Nuclei lemnisci lateralis		N	N	N	N
Medial paralemniscal nuclei		N	N		
Tegmentum pontis					
Medial parabrachial nuclei					
Lateral parabrachial nuclei					
Nuclei pontis	N	N	N	N	N
Oliva superior		N	N		
Pontine reticular formation			N		
Nucleus principalis nervi trigemini					
Nucleus motorius n. trigemini		N	N	N	N
Pontine raphe nucleus		N	N		
Nuclei vestibulares		N	N		
Medulla oblongata					
Nuclei cochleares				N	N
Nucleus spinalis nervi trigemini					
Prepositus hypoglossal nucleus			N	N	N
Medullary reticular formation	N		N		
Oliva inferior	N		N	N	N
Dorsal vagal complex					
Nucleus tractus solitarii					
Dorsal motor vagal nucleus			N	N	N
Area postrema			N	N	N
Nucleus motorius nervi hypoglossi			N	N	N
Nucleus ambiguus			N	N	N
Medullary raphe nuclei			N	N	N
Cerebellum					
Kéreg					
Cerebellaris magok				N	N

6. Megbeszélés

A TIP39-PTH2 receptor rendszer alacsonyabb rendű emlősökön korábban részletes leírásra került. A receptor-ligand páros anatómiai eloszlása, megjelenése, valamint számos funkcionális vizsgálat arra enged következtetni, hogy a TIP39-PTH2 receptor rendszer az emlős agy endokrin, viscerosensoros és auditoros működésében játszik szerepet. Korábbi vizsgálatokból ismert volt, hogy TIP39 expressziója a posztnatális korban jelentősen változik, ezért megvizsgáltuk a TIP39 expresszióját a praenatalis és korai postanatalis szakban is. Abból a célból, hogy a rágcsálókban nyert funkcionális eredményeket a humán idegrendszerre is extrapolálni tudjuk, először az anatómiai megjelenés azonosságait és esetleges különbözőségeit kellett megvizsgálnunk. Neurokémiai módszerekkel feltérképeztük a TIP39-PTH2 receptor rendszer megjelenését majom és ember központi idegrendszerében és azokat a rágcsálókban szerzett korábbi adatokkal hasonlítottuk össze, majd megvizsgáltuk, hogy a PTH2 receptort legnagyobb sűrűségben kifejező hypothalamusban a TIP39 mi módon fejtheti ki hatását a hypothalamo-hypophysis rendszeren.

A megbeszélésben először nagy vonalakban összegezzük a TIP39-PTH2R rendszer központi idegrendszerei anatómiájáról eddig tudottakat. Saját vizsgálatainkban a TIP39 és PTH2 receptor lokalizációjának anatómiai feltérképezéséhez több különböző metodikát is alkalmaztunk, melyek egy része szándékos, egy része kényszerű választás volt, melyet itt részletezünk. Leírjuk a TIP39 sejtek korai életszakban észlelt megjelenését, majd a humán és majom agyszövetben végzett térképezés eredményeit hasonlítjuk össze a korábbi, rágcsálókból nyert adatokkal. Utolsóként a hypothalamusban végzett vizsgálataink alapján diszkutáljuk a TIP39-PTH2 rendszernek a szinaptikus működés modulációjában feltételezett hatásmechanizmusát.

6.1. Anatómiai leírás

A PTH receptorral rokon szekvenciájú PTH2 receptor a központi idegrendszer számos területén, legkifejezettebben a diencephalonban és az agytörzsben expresszálódik. Korábbi, alacsonyabb rendű emlősökön végzett vizsgálatok szerint a receptor fiziológiás

liganduma egy közelmúltban leírt, 39 aminosavból álló neuropeptid, a tuberoinfundibularis peptid 39 (TIP39). Rágcsálókban szerzett adatok szerint, míg a PTH2 receptor a subcorticalis állományban széles körben megtalálható, addig a TIP39 expresszáló neuronok csak a thalamusban illetve a ponsban, egy-egy körülírt területen csoportosulnak.

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 találhatóak (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 (SPFp-PIL) inkább a hypothalamus felé vetül.

A másik TIP39 magcsoport a pontomesencephalis átmenetben, a lemniscus lateralistól medialisan helyezkedik el, itt egy morfológiailag is jól definiálható magot, a medialis paralemniscalis magot alkotja (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 kapcsolatban állnak.

A TIP39 sejtekkel ellentétben a PTH2 receptor széleskörű és kiterjedt subcorticalis expressziót mutat rágcsálókban, amint azt reverz-transzkriptáz PCR-ral (RT-PCR), in situ hibridizációval, immunhisztokémiával és transzgén egértörzs felhasználásával végzett vizsgálatokban igazolták (Faber és mtsai 2007). A PTH2 receptor a bevezetésben részletezettek szerint nagy mennyiségben expresszálódik a limbikus rendszerben, a hypothalamusban, a thalamus egyes területein, az agytörzsben és a gerincvelőben is. Patkányban a PTH2 receptort kifejező sejtek immunhisztokémiailag jól festhetőek és megfelelnek az in situ hibridizációval talált lokalizációknak (Wang és mtsai 2000). 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 (Faber és mtsai 2007). A PTH2 receptor gén első exonja helyett β -galaktozidázt expresszáló egértörzsben (knockin mice) hisztokémiai úton végzett vizsgálatok is jól korreláltak az RT-PCR és *in situ* eredményekkel (Faber és mtsai 2007). Hasonló jelenséget tapasztaltunk főemlősökön végzett vizsgálatainkban (Bagó és mtsai 2009). 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.

6.2. Metodikai megfontolások

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. A munka másik vonala a PTH2R 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 (4. táblázat).

4. táblázat

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

Mint korábban leírtuk, ellentétben a patkánnyal, sem humán sem egér 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 (Faber és mtsai 2007). Éppen e homológia miatt választottuk a mapping során összehasonlításként az egeret és nem a patkányt. A rostok kimutatását immunhisztokémiai módszerekkel végeztük, míg a sejtesteket 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-ral, 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, ismervé 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 rágcsálókban 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 situ hibridizációs hisztokémiával történő kimutatásához is. A PTH2 receptor immunhisztokémiai kimutatásához egy 9 éves, más kísérletes célból túllaltatott majom agyát használtuk, de rágcsálókön 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 szépen egybevetethetőek voltak az egér PTH2 receptor immunfestés adataival.

6.3. A TIP39 expresszió megjelenése a korai életszakaszban patkányban

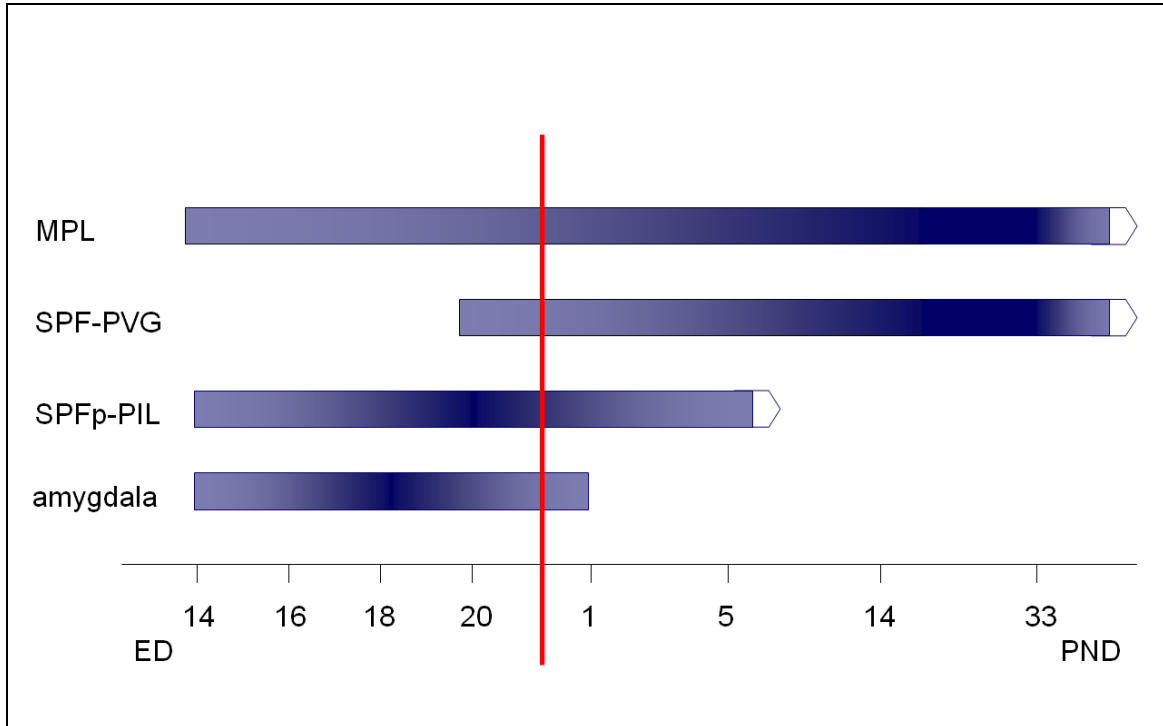
Korábbi vizsgálatok szerint (Dobolyi és mtsai 2006b) a TIP39 neuronok mind a két ismert lokalizációban, a subparafascicularis areaban (SPF) és a mediális paralemniscalis magban (MPL) már az újszülöttekben is jelen vannak, majd a TIP39 expresszió a születés utáni 14. napig fokozódik, majd a 33. naptól, fokozatosan csökken, és 125. napon már csak alig kimutatható (Dobolyi és mtsai 2006b). 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 szakban 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 medialis részén (SPF-PVG) csak a 20,5. embrionális napon találtunk csak TIP39 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 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 életben eltűnnek, kifejlett állatokban nem kimutathatóak.

**19. ábra**

TIP39 expressziójának időbeni megjelenése. ED embrionális életkor (nap), PND postnatalis életkor (nap). MPL: medialis paralemniscalis mag. SPF-PVF: subparafascicularis area medialis paraventricularis része. pSPF-PIL: subparafascicularis area caudolateralis kiterjedése a posterior intralaminaris complexben. Amygdala: amygdalo-hippocampalis átmeneti zóna. Piros vonal: születés.

Az embrionális és korai postnatalis vizsgálatok során talált legfontosabb tény a TIP39 expresszió tranziens megjelenése. 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 születéssel 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 medial felé, az SPF-PVG területbe), vagy csak TIP39 expresszió szűnik meg átmenetileg. 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.

6.4. A TIP39 és a PTH2 receptor expressziója főemlős agyban

6.4.1. TIP39-et expresszáló sejtek

A TIP39-et expresszáló sejtek kimutatását *in situ* hibridizációval végeztük el 3 napos majom agyon. Majomban a TIP39 a rágszálókban leírt 3 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 TIP39 mRNS-t nem tudtunk kimutatni, ennek hátterében 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 (Cservenák és mtsai 2010), aktiválódik újra. Az mRNS vizsgálatokhoz rendelkezésre álló humán minták idős agyaktól származtak. 2. A mikrodisszekcióval nyert minták között nem volt, 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 rágszálók és a humán illetve nem-humán főemlősök agyában, feltételezzük, hogy a TIP39 eloszlása emberben is megegyező a majomban vagy rágszálókban találtakkal.

6.4.2. 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 térképezés részletes eredményeit a 3. táblázatban foglaltuk össze, a kifejeződésmértékét szemikvantitatív színskálával jelölve. 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 areaban és a híd formatio reticularisában, míg a substantia nigra, vagy a nucleus ruber területében a középgyban 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 agykból származtak a minták, de a kifejezett homológia ellenére létezhetnek főemlős fajok közötti különbségek, mint azt más neuropeptideknél is leírták, például a substance P prekursoránál, a preprotachykinin-A-nál (Hurd és mtsai 1999).

6.4.3. PTH2 receptor mRNS eloszlás – homológia és különbözőség rágcsáló és főemlős agyban

A RT-PCR technikával szerzett eredményeink szerint a PTH2 receptor expressziója nagy hasonlóságot mutat az egérben leírtakkal (Faber és mtsai 2007). 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 reticularisában, 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 parabigeminalis találtunk különbséget. Ezekben a régiókban majomban jól definiált, PTH2 receptort kifejező sejtcsoportot találtunk, míg egérben csak egy-egy elszórt sejt található, ez megfelelhet fajok közötti expressziós különbségnek.

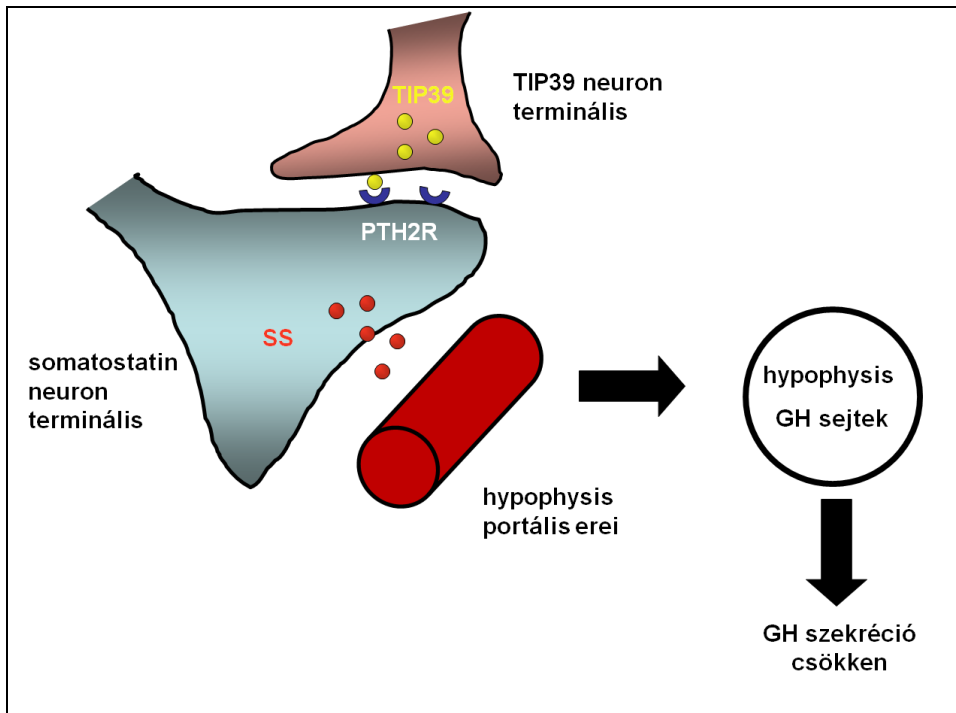
6.4.4. PTH2 receptor immunreaktivitás – rostok és terminálisok a főemlős agyban

Eredményeink szerint az emberben a sejttetek 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 (lateral septal nucleus), 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.

6.5. A TIP39 feltételezett hatásmechanizmusa a hypothalamus-hypophysis rendszeren

Patkányban korábban leírták a PTH2 receptor rostok glutaminerg természetét (Dobolyi és mtsai 2006a). 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.

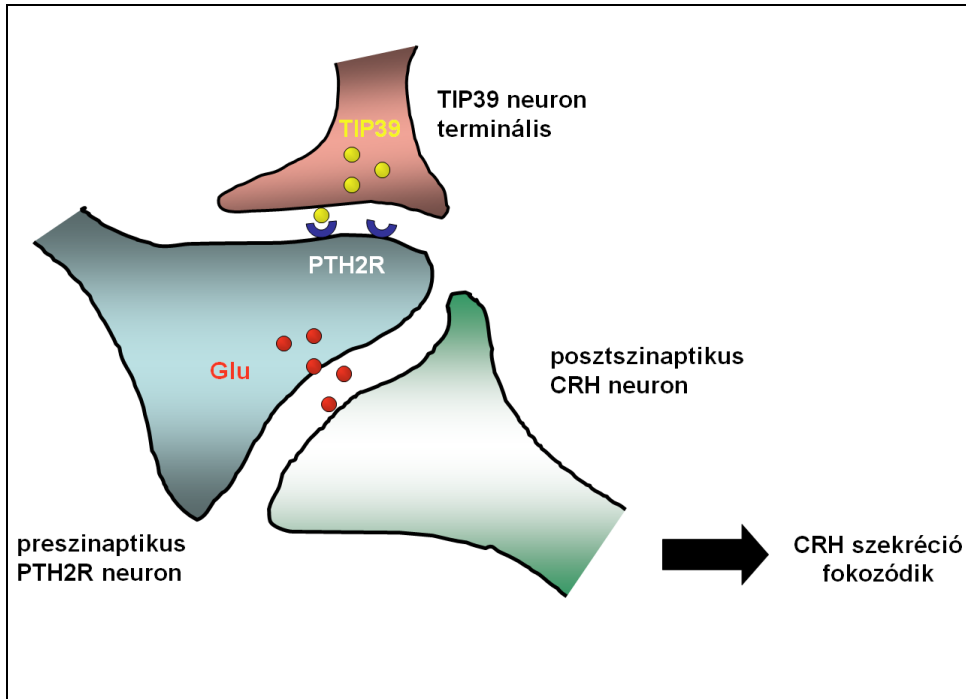
Humán hypothalamusban kettős immunfestést végeztünk PTH2 receptor receptor és somatostatin vagy corticotropin releasing hormone (CRH) ellenes antitestekkel. A somatostatint termelő sejtek a nucleus periventricularisban foglalnak helyet, innen vetülnek az eminentia mediana felé, ahol a somatostatin felszabadul, 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 (Bluet-Pajot és mtsai 1998). A feltételezett hatásmechanizmust a 20. ábrán foglaltuk össze.



20. ábra

Az eminentia medianában található somatostatint tartalmazó terminálisok egy része PTH2 receptort is expresszál. A TIP39 sejtek feltehetően ezeken a PTH2 receptorokon keresztül Ca^{2+} és cAMP szint emelése keresztül serkenti a somatostatin felszabadulást, mely a hypophysis portális keringésén át a hypophysis GH termelő sejtjeit gátolva csökkenti a GH szekréciót.

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 sejttestek nem tartalmazzák a PTH2 receptort, viszont számos serkentő glutamáterg szinapszis vesz részt ezen neuronok szabályozásában, és ezen szinapszisok egy része PTH2 receptor pozitívítás mutat, így azt feltételezzük, hogy a TIP39 ezeken a szinapszisosokon keresztül serkenti a CRH szekréciót, amint az korábban hypothalamus szöveten in vitro igazolták (Ward és mtsai 2001). A feltételezett hatásmechanizmust a 21. ábrán foglaltuk össze.



21. ábra

A hypothalamus paraventricularis magjában (Pa) található CRH neuronok nem tartalmaznak PTH2 receptorokat, viszont a neuronokat beidegző glutamaterg neuronok egy része PTH2 receptort expresszál, így a TIP39 ezeken a PTH2R pozitív terminálisokon preszinaptikusan, a glutamaterg transzmisszió és ezáltal a CRH sejtek serkentésével vezethet a CRH szekréciójának emeléséhez.

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 sejtest 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 nagyon sok egyezést mutat (Dobolyi és mtsai 2006a; Faber és mtsai 2007).

6.6. 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.

7. 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 areában 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 adatai 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 szomatosztatin termelő sejtjein végzett vizsgálataink alapján feltételezzük, hogy a TIP39 neuropeptidként a PTH2 receptoron keresztül preszinaptikus moduláció formájában módosítja a CRH és somatostatin szekréció mértékét, ez képezheti a korábban már elírt, a TIP39 hatására bekövetkező hormonális válaszok morfológiai alapját.

8. Összefoglalás

A parathormon 2 receptor (PTH2 receptor) és liganduma a tuberoinfundibularis peptid 39 (TIP39) egy új neuromodulátor rendszert alkot, ami rágsálókon végzett vizsgálatok alapján az endokrin, nociceptív funkciók szabályozásában vesz részt. TIP39 sejtek az agyban csak két helyen találhatóak: a thalamus subparafascicularis területén (SPF), valamint a ponsban, ahol a TIP39 sejtek egy jól körülírt magcsoportot formálnak, melyet medialis paralemniscalis magnak (PML) nevezünk. A TIP39 sejtekkel ellentétben a PTH2 receptort expresszáló sejtek bőségesen előfordulnak az agy különböző struktúráiban, de különösen a hypothalamus, a limbikus rendszer, a sensoros és auditoros területékben. Bár a TIP39-PTH2 receptor rendszert rágsálókban már részletesen leírták, a TIP39 korai egyedfejlődés során való megjelenéséről nem állnak rendelkezésre eredmények, és a TIP39-PTH2R rendszer kefejeződését sem vizsgálták még főemlős, ezen belül humán agyban. Munkánk célja kettős volt: 1. Megvizsgálni patkány agyban a TIP39 sejtcsoportok megjelenését és aktivitását az embrionális élet során. 2. Kimutatni és feltérképezni a TIP39 és PTH2 receptor expresszióját majom és humán agyban. Patkány embriók agyszövetében kimutattuk olyan új TIP39 sejtcsoport jelenlétét az amygdalában, ami korábban nem volt ismert, továbbá igazoltuk, hogy a thalamusban a TIP39 sejtek két csoportja külön időben jelenik meg az embrionális életben és ez a térbeli és időbeli elkülönülés is indokoltá teszi a két magcsoport anatómiai szétválasztását. Humán és majom agyon végzett vizsgálatokainkban kimutattuk a TIP39 és PTH2 receptor expresszióját. Többféle metodikát alkalmazva részletesen feltérképeztük a PTH2 receptort kifejező sejtek és rostok elhelyezkedését. Igazoltuk a PTH2 receptor rostok glutamáterg természetét, valamint humán hypothalamuson végzett vizsgálataink alapján a preszinaptikus moduláció kétféle anatómiai modelljét is leírtuk, mely megmagyarázhatja a TIP39 hypothalamus-hypophysis rendszerre, elsősorban a corticotropin releasing hormone (CRH) és a növekedési hormon (GH) szekrécióra gyakorolt hatását.

9. Summary

Parathyroid hormone receptor 2 (PTH2 receptor) and its ligand, tuberinfudibular peptide of 39 residues (TIP39) constitute a neuromodulator system affecting the central endocrine and nociceptive regulation based on rodent studies. TIP39 cells are located in only two regions of the brain: in the thalamic subparafascicular area (SPF), and in rostral pons, where the TIP39 cells form the medial paralemniscal nucleus (PML). In contrast, PTH2 receptor expressing cells show a widespread distribution through the brain, especially in hypothalamic, limbic, sensory and auditory regions. Although the TIP39-PTH2 receptor system was described in details in rodents, there were no data published on the TIP39 expression in the embryonic life, and only very limited TIP39-PTH2 receptor data in the primate brain. Our aims were: 1. To investigate the TIP39 cells in the embryonic brain in rats. 2. To describe the presence and expression pattern of TIP39 and PTH2 receptor in the brain of primates, including macaque and human. In rat embryos we described the existence of a previously not known, new TIP39 expressing cell group in the amygdala. Furthermore we found that the two different TIP39 cell in the SPF showed up at different time points of the prenatal life. This spatial and temporal separation of the SPFp-PIL and SPF-PVG TIP39 neurons is consistent with the suggested anatomical and functional discrimination of the two groups. In primate studies we verified the expression of TIP39 and PTH2 receptor in human and macaque brain. Using different methods we described the detailed topography of PTH2 receptor expressing cell bodies and fibers in the primate brain. We confirmed the glutamergic nature of PTH2 receptor terminals, and based on our double labeled immunochemistry studies in human hypothalamus we described two different anatomical models of presynaptic modulation, which can explain the way of action of TIP39 via PTH2 receptors on the secretion of corticotropine releasing (CRH) and growth hormones (GH) in the hypothalamo-hypophysis axis.

10. Irodalomjegyzék

1. Altman J, Bayer SA. Atlas of prenatal rat brain development. London: CRC Press, 1995.
2. Arbogast LA. Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39): a new player in the translation of sensory input to prolactin release during lactation. *Endocrinology* 2010; 151: 5568-9.
3. Bagó AG, Dimitrov E, Saunders R, Seress L, Palkovits M, Usdin TB, et al. 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* 2009; 162: 128-47.
4. Beitz AJ. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience* 1982; 7: 133-59.
5. Bluet-Pajot MT, Epelbaum J, Gourdji D, Hammond C, Kordon C. Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18: 101-23.
6. Coolen LM, Veening JG, Wells AB, Shipley MT. Afferent connections of the parvocellular subparafascicular thalamic nucleus in the rat: evidence for functional subdivisions. *J Comp Neurol* 2003; 463: 132-56.
7. Coutellier L, Usdin TB. Enhanced long-term fear memory and increased anxiety and depression-like behavior after exposure to an aversive event in mice lacking TIP39 signaling. *Behav Brain Res* 2010; 222: 265-9.
8. Cservenak M, Bodnar I, Usdin TB, Palkovits M, Nagy GM, Dobolyi A. Tuberoinfundibular peptide of 39 residues is activated during lactation and participates in the suckling-induced prolactin release in rat. *Endocrinology* 2010; 151: 5830-40.
9. Cservenák M. PM, Usdin T.B., Dobolyi A. Activation of posterior thalamic TIP39 neurons in mother rats. Neuropeptide Festival, Meeting of the European

- Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference, Salzburg, Austria. 2009a.
10. Cservenák M, UTB, Palkovits M., Dobolyi A. Activation of TIP39 neurons in the lateral subparafascicular area of mother rats. 12th Conf. Hung. Neurosci. Soc. (MITT), Budapest. *Frontiers in Systems Neuroscience. Conference Abstract: 12th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society.* doi: 10.3389/conf.neuro.01.2009.04.007. 2009b.
 11. D'Hanis W, Linke R, Yilmazer-Hanke DM. Topography of thalamic and parabrachial calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactive neurons projecting to subnuclei of the amygdala and extended amygdala. *J Comp Neurol* 2007; 505: 268-91.
 12. Della Penna K, Kinose F, Sun H, Koblan KS, Wang H. Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39): molecular structure and activity for parathyroid hormone 2 receptor. *Neuropharmacology* 2003; 44: 141-53.
 13. Dimitrov EL, Petrus E, Usdin TB. Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39) signaling modulates acute and tonic nociception. *Exp Neurol* 2010; 226: 68-83.
 14. Dobolyi A: Novel potential regulators of maternal adaptations during lactation: tuberoinfundibular peptide 39 and amylin. *J Neuroendocrinol.* 2011 Nov;23(11):1002-8. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02127.x. Review.
 15. Dobolyi A, Irwin S, Wang J, Usdin TB. The distribution and neurochemistry of the parathyroid hormone 2 receptor in the rat hypothalamus. *Neurochem Res* 2006a; 31: 227-36.
 16. Dobolyi A, Palkovits M, Bodnar I, Usdin TB. Neurons containing tuberoinfundibular peptide of 39 residues project to limbic, endocrine, auditory and spinal areas in rat. *Neuroscience* 2003a; 122: 1093-105.

17. Dobolyi A, Palkovits M, Usdin TB. Expression and distribution of tuberoinfundibular peptide of 39 residues in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 2003b; 455: 547-66.
18. Dobolyi A, Ueda H, Uchida H, Palkovits M, Usdin TB. Anatomical and physiological evidence for involvement of tuberoinfundibular peptide of 39 residues in nociception. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 1651-6.
19. Dobolyi A, Wang J, Irwin S, Usdin TB. Postnatal development and gender-dependent expression of TIP39 in the rat brain. *J Comp Neurol* 2006b; 498: 375-89.
20. Eichinger A, Fiaschi-Taesch N, Massfelder T, Fritsch S, Barthelmebs M, Helwig JJ. Transcript expression of the tuberoinfundibular peptide (TIP)39/PTH2 receptor system and non-PTH1 receptor-mediated tonic effects of TIP39 and other PTH2 receptor ligands in renal vessels. *Endocrinology* 2002; 143: 3036-43.
21. Faber CA, Dobolyi A, Sleeman M, Usdin TB. Distribution of tuberoinfundibular peptide of 39 residues and its receptor, parathyroid hormone 2 receptor, in the mouse brain. *J Comp Neurol* 2007; 502: 563-83.
22. Fegley DB, Holmes A, Riordan T, Faber CA, Weiss JR, Ma S, et al. Increased fear- and stress-related anxiety-like behavior in mice lacking tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Genes Brain Behav* 2008; 7: 933-42.
23. Fremeau RT, Jr., Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, et al. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 2001; 31: 247-60.
24. Friedman PA, Gesek FA, Morley P, Whitfield JF, Willick GE. Cell-specific signaling and structure-activity relations of parathyroid hormone analogs in mouse kidney cells. *Endocrinology* 1999; 140: 301-9.
25. Gensure R, Juppner H. Parathyroid hormone without parathyroid glands. *Endocrinology* 2005; 146: 544-6.

26. Gensure RC, Gardella TJ, Juppner H. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 666-78.
27. Goold CP, Usdin TB, Hoare SR. Regions in rat and human parathyroid hormone (PTH) 2 receptors controlling receptor interaction with PTH and with antagonist ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 678-90.
28. Hansen IA, Jakob O, Wortmann S, Arzberger T, Allolio B, Blind E. Characterization of the human and mouse genes encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues, a ligand of the parathyroid hormone receptor family. *J Endocrinol* 2002; 174: 95-102.
29. Hartig W, Riedel A, Grosche J, Edwards RH, Fremeau RT, Jr., Harkany T, et al. Complementary distribution of vesicular glutamate transporters 1 and 2 in the nucleus accumbens of rat: Relationship to calretinin-containing extrinsic innervation and calbindin-immunoreactive neurons. *J Comp Neurol* 2003; 465: 1-10.
30. Herbert H, Aschoff A, Ostwald J. Topography of projections from the auditory cortex to the inferior colliculus in the rat. *J Comp Neurol* 1991; 304: 103-22.
31. Hoare SR, de Vries G, Usdin TB. Measurement of agonist and antagonist ligand-binding parameters at the human parathyroid hormone type 1 receptor: evaluation of receptor states and modulation by guanine nucleotide. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289: 1323-33.
32. Hunyady B, Krempels K, Harta G, Mezey E. Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 1353-62.
33. Hurd YL, Keller E, Sotonyi P, Sedvall G. Preprotachykinin-A mRNA expression in the human and monkey brain: An in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 1999; 411: 56-72.

34. Hurwitz S. Homeostatic control of plasma calcium concentration. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1996; 31: 41-100.
35. John MR, Arai M, Rubin DA, Jonsson KB, Juppner H. Identification and characterization of the murine and human gene encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Endocrinology* 2002; 143: 1047-57.
36. Juppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, et al. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 1991; 254: 1024-6.
37. LaBuda CJ, Dobolyi A, Usdin TB. Tuberoinfundibular peptide of 39 residues produces anxiolytic and antidepressant actions. *Neuroreport* 2004; 15: 881-5.
38. LaBuda CJ, Usdin TB. Tuberoinfundibular peptide of 39 residues decreases pain-related affective behavior. *Neuroreport* 2004; 15: 1779-82.
39. Mai JK, Assheuer J, Paxinos G. *Atlas of the human brain*. San Diego: Academic Press, 1997.
40. Martin RF, Bowden DM. A stereotaxic template atlas of the macaque brain for digital imaging and quantitative neuroanatomy. *Neuroimage* 1996; 4: 119-50.
41. Martin TJ, Moseley JM, Williams ED. Parathyroid hormone-related protein: hormone and cytokine. *J Endocrinol* 1997; 154 Suppl: S23-37.
42. Palkovits M. Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res* 1973; 59: 449-50.
43. Palkovits M. Neuropeptides in the brain. *Front Neuroendocrinol* 1988; 10: 1-44.
44. Palkovits M, Dobolyi A, Helfferich F, Usdin TB. Localization and chemical characterization of the audiogenic stress pathway. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1018: 16-24.

45. Palkovits M, Dobolyi A, Helfferich F, Usdin TB. Acute loud noise activates TIP39-immunoreactive neurons in the rat brain. *Brain Structure and Function* 2009; Submitted.
46. Papasani MR, Gensure RC, Yan YL, Gunes Y, Postlethwait JH, Ponugoti B, et al. Identification and characterization of the zebrafish and fugu genes encoding tuberoinfundibular peptide 39. *Endocrinology* 2004; 145: 5294-304.
47. Paxinos G, Huang X. *Atlas of the Human Brainstem*. Sydney: Academic Press, 1995.
48. Paxinos G, Törk I, Tecott LH, Valentino KL. *Atlas of the Developing Rat Brain*. San Diego: Academic Press, 1991.
49. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press, 2007.
50. Rizzoli R, Ferrari SL, Pizurki L, Caverzasio J, Bonjour JP. Actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein. *J Endocrinol Invest* 1992; 15: 51-6.
51. Rubin DA, Hellman P, Zon LI, Lobb CJ, Bergwitz C, Juppner H. A G protein-coupled receptor from zebrafish is activated by human parathyroid hormone and not by human or teleost parathyroid hormone-related peptide. Implications for the evolutionary conservation of calcium-regulating peptide hormones. *J Biol Chem* 1999; 274: 23035-42.
52. Rubin DA, Juppner H. Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH1R) and a novel receptor (PTH3R) that is preferentially activated by mammalian and fugu fish parathyroid hormone-related peptide. *J Biol Chem* 1999; 274: 28185-90.
53. Segre GV, Abou-Samra AB, Juppner H, Schipani E, Force T, Urena P, et al. Characterization of cloned PTH/PTHrP receptors. *J Endocrinol Invest* 1992; 15: 11-7.

54. Shoemaker JM, Riley LG, Hirano T, Grau EG, Rubin DA. Differential expression of tuberoinfundibular peptide 38 and glucose-6-phosphatase in tilapia. *Gen Comp Endocrinol* 2006; 146: 186-94.
55. Sugimura Y, Murase T, Ishizaki S, Tachikawa K, Arima H, Miura Y, et al. Centrally administered tuberoinfundibular peptide of 39 residues inhibits arginine vasopressin release in conscious rats. *Endocrinology* 2003; 144: 2791-6.
56. Tanaka H, Smogorzewski M, Koss M, Massry SG. Pathways involved in PTH-induced rise in cytosolic Ca²⁺ concentration of rat renal proximal tubule. *Am J Physiol* 1995; 268: F330-7.
57. Usdin TB. Evidence for a parathyroid hormone-2 receptor selective ligand in the hypothalamus. *Endocrinology* 1997; 138: 831-4.
58. Usdin TB, Bonner TI, Harta G, Mezey E. Distribution of parathyroid hormone-2 receptor messenger ribonucleic acid in rat. *Endocrinology* 1996; 137: 4285-97.
59. Usdin TB, Bonner TI, Hoare SR. The parathyroid hormone 2 (PTH2) receptor. *Receptors Channels* 2002; 8: 211-8.
60. Usdin TB, Dobolyi A, Ueda H, Palkovits M. Emerging functions for tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14: 14-9.
61. Usdin TB, Gruber C, Bonner TI. Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 15455-8.
62. Usdin TB, Hilton J, Vertesi T, Harta G, Segre G, Mezey E. Distribution of the parathyroid hormone 2 receptor in rat: immunolocalization reveals expression by several endocrine cells. *Endocrinology* 1999a; 140: 3363-71.

63. Usdin TB, Hoare SR, Wang T, Mezey E, Kowalak JA. TIP39: a new neuropeptide and PTH2-receptor agonist from hypothalamus. *Nat Neurosci* 1999b; 2: 941-3.
64. Van de Heijning BJ, Koekkoek-Van den Herik I, Van Wimersma Greidanus TB. The opioid receptor subtypes mu and kappa, but not delta, are involved in the control of the vasopressin and oxytocin release in the rat. *Eur J Pharmacol* 1991; 209: 199-206.
65. Van der Werf YD, Witter MP, Groenewegen HJ. The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Res Brain Res Rev* 2002; 39: 107-40.
66. Varga T, Palkovits M, Usdin TB, Dobolyi A. The medial paralemniscal nucleus and its afferent neuronal connections in rat. *J Comp Neurol* 2008; 511: 221-37.
67. Veening JG, Coolen LM. Neural activation following sexual behavior in the male and female rat brain. *Behav Brain Res* 1998; 92: 181-93.
68. Wang J, Coolen LM, Brown JL, Usdin TB. Neurons containing tuberoinfundibular peptide of 39 residues are activated following male sexual behavior. *Neuropeptides* 2006a; 40: 403-408.
69. Wang J, Palkovits M, Usdin TB, Dobolyi A. Afferent connections of the subparafascicular area in rat. *Neuroscience* 2006b; 138: 197-220.
70. Wang J, Palkovits M, Usdin TB, Dobolyi A. Forebrain projections of tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39)-containing subparafascicular neurons. *Neuroscience* 2006c; 138: 1245-63.
71. Wang T, Palkovits M, Rusnak M, Mezey E, Usdin TB. Distribution of parathyroid hormone-2 receptor-like immunoreactivity and messenger RNA in the rat nervous system. *Neuroscience* 2000; 100: 629-49.

72. Ward HL, Small CJ, Murphy KG, Kennedy AR, Ghatei MA, Bloom SR. The actions of tuberoinfundibular peptide on the hypothalamo-pituitary axes. *Endocrinology* 2001; 142: 3451-6.
73. Winer JA, Larue DT, Diehl JJ, Hefti BJ. Auditory cortical projections to the cat inferior colliculus. *J Comp Neurol* 1998; 400: 147-74.

11. Saját közlemények jegyzéke

11.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

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 *First two authors contributed equally to the manuscript.
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* 30;61(3-4):123-6, 2008

11.2. Az értekezés témájában készített idézhető absztraktok

1. **Bagó A**, Palkovits M, Usdin T, Seress L, Dobolyi Á: Mapping of PTH2 Receptor in human diencephalon and brainstem. *International IBRO Workshop on Complex Neural Networks, Clin. Neurosci.* 61, Suppl. 1, 13., Debrecen, Hungary, 2008

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

11.3. Egyéb közlemények

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. 9;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. 2004 Oct;30(5):456-71 IF: 3,40

6. Veres R, **Bagó A**, Fedorcsák I: Early experiences with image-guided transoral surgery for the pathologies of the upper cervical spine. *Spine*. 2001 Jun 15;26(12):1385-8. 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/Idegy 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: 1009-1012, 1992 IF: 2,22

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Dobolyi Árpádnak azt a sok baráti segítséget és türelmet, amivel egy állandóan rohanásban lévő idegsebészt bevezetett a neuromorfológiai alapkutatás világába, és rendíthetetlenül hitt abban, hogy ez a dolgozat egyszer valóban elkészül. Köszönöm laborvezetőnknek, 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 alapkutatással való első ismerkedésemet köszönhettem.

Baráti köszönettel tartozom Dr. Fedoresák Imrének, főnökömnek, aki mellett a hosszú évek alatt 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 a vascularis idegsebészet alapjaira. Köszönet illeti Dr. Nyáry István professzor urat, aki alatt idegsebészeti tanulmányaimat megkezdhettem. Köszönöttel 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 főnővérnek a több mint egy évtizede tartó közös munkáért. Az ő biztos hátterük nélkül nem nyílt volna lehetőség külső kutatómunkára.

Végül, legfontosabbként, köszönöttel 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 elkészültét.