

Új beidegzési útvonalak leírása a bazális előagyi neuronok szabályozásában

Doktori tézisek

Bardóczy Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kalló Imre, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Ábrahám István, Habil, egyetemi tanár, tudományos tanácsadó

Dr. Várnainé Tóth Zsuzsanna, Ph.D.,
tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Csillag András, D.Sc.,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Dénes Ádám, Ph.D.,
tudományos főmunkatárs
Dr. Dobolyi Árpád, Habil,
tudományos tanácsadó

Budapest
2018

1. Bevezetés

A bazális előagyi területek (a mediális szeptum (MS), a ventrális pallidum (VP), Broca-féle diagonális köteg (DBN), substantia innominata (Si)/extended amygdala (EA), Meynert-féle nucleus basalis mag (NBM) és peripallidális régiók) heterogén sejtek sokaságából állnak: neuropeptid tartalmú sejtekből, úgy mint a gonadotropin-releasing hormon (GnRH)-t termelő idegsejtekből, a kolinerg, GABAerg és glutamaterg vetítő idegsejtek és különböző interneuronok heterogén csoportjából.

Értekezésem első felében összefoglalom kísérleteink azon részét, mellyel megvizsgáltuk a GnRH és kolinerg sejtek lehetséges glicinerg beidegzését és amely kolinerg idegsejtek és a bazális előagyi, illetve agytörzsi glicin transzporter pozitív sejtek morfológiai és funkcionális kapcsolatának felfedezéséhez vezetett.

Mesulam és kollégái szerint négy fő alcsoportra oszthatjuk a kolinerg sejteket a bazális előagyban. A MS-ban (Ch1) és a Broca-féle diagonális köteg vertikális ágában (VDB) lévő kolinerg sejtek (Ch2) főként a hippokampuszba vetítenek. A mediális szeptális kolinerg sejtek emellett az entorinális kéregt is beidegzik. A Broca-féle diagonális köteg horizontális ágában (HDB) és a magnocelluláris preoptikus mag (MCPO) területén elhelyezkedő kolinerg sejtek (Ch3) fő célterülete az olfaktorikus gumó, ahol a különböző sejtek aktivitását és szinapszisait szabályozzák. A Ch3 kolinerg idegsejtek axonokat küldenek a piriform és entorinális kéreg felé is. A VP, NBM, Si/EA, globus pallidus és internal capsule területén található kolinerg sejtek (Ch4) a bazolaterális amigdalába vetítenek és az egész neocortexet beidegzik. Továbbá az NBM és DBN kolinerg sejtjei axonokat küldenek a prefrontális kéreg (PFC) felé. A bazális előagyi kolinerg sejtek összességében tehát részt vesznek a figyelem, ébrenlét, alvás-ébrenlét ciklus, tanulás, memória, és szagló-funkciókban.

A GnRH neuronok elszórtan helyezkednek el a MS, rostrális preoptikus terület (rPOA), ventrális elülső hipotalamikus terület (AHA) és a mediobazális hipotalamusz területén. A legtöbb GnRH nyúlvány az eminentia mediana külső zónájában végződik, ahol a GnRH peptid a hipotalamo-hipofizális portális véráramba kerül és onnan szállítódik az elülső hipofízis gonadotrop sejtjeihez. GnRH kontroll alatt, a luteinizáló hormon (LH) és a folliculus stimuláló hormon (FSH) pulzatilis módon ürül a gonadotrop sejtekből és a gonádokon hatva elősegítik a gametogenezist és a gonadális szteroidok szekrécióját. A gonadális szteroidok negatív (nőstényekben és hímeekben) és pozitív (csak nőstényekben) feedback hatásokat fejtenek ki a hipotalamo-hipofízis rendszerre. Nőstényekben, az ösztroz ciklus nagy részében, az ösztrogén gátol, a gonadotropin szekréció negatív feedback hatás alatt áll. Azonban, ez a negatív feedback hatás pozitív feedbackbe csap át

és az LH szekréción mintázat átfordul nem pulzatilis surgebe. Az ösztrogén feedback hatásait főként az ösztrogén receptor α ($ER\alpha$) közvetíti, azonban ez a típusú receptor hiányzik a GnRH neuronokból. Így az ösztrogén feedback az $ER\alpha$ -t tartalmazó afferenseken keresztül valósul meg, mint például a Kisspeptin (KP) sejteken keresztül. A hipotalamikusan KP rendszer a GnRH pulzatilis és surge szekréción mintázatának kialakításában egyaránt részt vesz. Két különböző sejtpopulációt alkotnak: az egyik a harmadik agykamra rostrális periventrikuláris területén (RP3V) található (amely magába foglalja az anteroventrális periventrikuláris (AVPV) és a periventrikuláris preoptikus magot (Pe)), a másik pedig az arcuatus magban (Arc). Mindkét KP sejtpopuláció expresszálja az $ER\alpha$ -t és beidegzik a GnRH neuronokat, így a kritikusan fontos ösztrogénfüggő szignálok közvetítésére képesek a GnRH neuronok felé.

A klasszikus elképzelés szerint a komplex felszálló aktiváló rendszer fő ága, a rostrális hídi régióból és kaudális középagyból eredve éri el a hipotalamuszt és a bazális előagyat és aktiválja ezen agyterületek funkcióit. Előzetes tanulmányainkban kimutattuk az egyes típusú glicin transzporter (GLYT1) és a kettes típusú glicin transzporter (GLYT2) immunreaktív (IR) sejtek jelenlétét a bazális előagyban, továbbá a glicin receptor (GlyR) alpha 1 alegységét a GnRH neuronokban. Ezen előzetes eredményeink alapján feltételeztük, hogy van felszálló gátló rendszer is a bazális előagy felé, illetve lokális glicin hatások érvényesülnek a bazális előagyi GnRH és kolinerg idegsejteken. Tehát a PhD munkám egyik fő célja annak felderítése volt, hogy vajon a glicin szignalizáció célpontjai-e a GnRH és a kolinerg sejtek a bazális előagyban.

Az értekezésem második felében, bemutatom azokat a vizsgálatokat, melyeket annak érdekében végeztünk, hogy feltárjuk a reprodukciót szabályozó hipotalamikusan idegsejt hálózatokat, különösképpen a GnRH neuronok hipotalamikusan célsejtekre irányuló projekcióit. Így, ultrastrukturális szinten megvizsgáltam a GnRH neuronok nyúlványait és lehetséges szinaptikus kapcsolatait az RP3V és/vagy az Arc területén, mely területek alapvető szerepet töltenek be a GnRH szekréción szabályozásában. Továbbá megvizsgáltam ezen neuronális kapcsolatok lehetséges változásait, melyet különböző hormonális hatások (úgy mint laktáció) és a különböző cirkadián viszonyok válthatnak ki. Végül nem csak egérben, hanem emberi mintákon is kimutattam a KP-KP idegsejtek interakcióját.

A GnRH sejteknek hosszú (több mint 1000 μm) nyúlványaik vannak, melyek főként az eminentia medianában végződnek. Ezek a nyúlványok axon- és dendrit-szerű tulajdonságokkal rendelkeznek így manapság Herde és munkatársai után dendronnak nevezik el őket. Előzetes anatómiai tanulmányok bizonyítékot szolgáltatottak arra, hogy a GnRH neuronok axon-szerű nyúlványokat is küldenek az RP3V és Arc területére és

szinaptikus kapcsolatokat hoznak létre neurotranszmitter/neuromodulátor-tartalomra azonosítatlan sejt populációkon. Így kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon az egyik célsejt populáció a KP idegsejtek csoportja lehet-e, amelyek mindkét régióból (RP3V és Arc) a GnRH neuronok fő afferentációját képezik. A második lehetséges célsejt populáció a hipotalamikus dopamin (tirozin-hidroxiláz (TH) szintetizáló) sejtek voltak, amelyek szintén megtalálhatók az RP3V és Arc régiókban. A dopaminerg idegsejtek gátló hatást tartanak fent a hipofízis prolaktin-szekretáló sejtjein; ez a tónikus hatás jelentős szerepet játszik a GnRH idegsejtek pulztilis szekréciójában, így a csökkenő dopamin szekréció szoptatás alatt, fokozott prolaktin szintet eredményez, ami következésképpen felfüggeszti a GnRH pulztilis szekrécióját. A különböző hormonális állapotok, úgymint az ösztrogén szintjének változásai, a különböző cirkadián időpontok, laktáció, befolyásolják a GnRH működését. Így a GnRH axonok és KP- és/vagy TH -IR sejtek lehetséges kapcsolatát megvizsgáltam, továbbá az azonosított GnRH appozíciókat analizáltam a KP és/vagy TH-IR idegsejteken, különböző hormonális állapotokban.

Az arcuatus magban lévő KP idegsejtek jelentős szerepet játszanak a GnRH neuronok pulztilis szekréciójában. Ezen KP sejtek a Neurokinin B (NKB)-t és a Dynorfint (Dyn) koexpresszálják, így KNDy neuronoknak is hívják őket. Számos rágcsáló tanulmány szerint ezek a sejtek egymással is kapcsolatot létesítenek és szinkron működésre képesek, így szabályozva a GnRH neuronok pulztilis működését. Összehasonlító ultrastrukturális vizsgálatokat végeztem, hogy ezen kapcsolatok analógiáját feltárjam az emberi infundibuláris magban is.

2. Célkitűzések

2.1. Megvizsgáltam a glicin lehetséges célsejtjeit a bazális előagyban:

2.1.1. a GlyR jelenlétét a GnRH és kolinerg idegsejtekben

2.1.2. a GnRH és kolinerg idegsejtek lehetséges GLYT2-IR afferentációját

2.1.3. a bazális előagyi glicinerg rostok eredetét

2.1.4. a GLYT1-pozitív asztroglia nyúlványok jelenlétét a GnRH és kolinerg sejtek közelében

2.1.5. GnRH és kolinerg sejtek membrán potenciál tulajdonságait glicin jelenlétében

2.2. Jellemeztem a GnRH efferenseket és célsejtjeiket egérben és emberben:

2.2.1. a GnRH nyúlványok ultrastrukturális jegyeit egérben

2.2.2. a KP-KP kapcsolatot egérben és emberben

2.2.3. cirkadián és laktáció okozta változások GnRH neuronok és KP- és/vagy TH-IR neuronok kapcsolatára

3. Anyag és módszerek

3.1. Egér minták

3.1.1. Immunhisztikémiára gyűjtött agyszövetek

A kísérleteinket vad-típusú (CD1, Charles River) és transzgen egereken végeztük (1-3 hónapos, 25-30 g súlyú), melyeket kontrollált fény (12 órás fény ill. sötét szakasz) és hőmérséklet ($22\pm 2^\circ\text{C}$) viszonyok közt tartottunk szabad víz és táplálék hozzáférés mellett.

A különböző kísérletekben felhasznált állatokat az I. táblázat foglalja össze.

Az állatok egy részét ovariektomizáltuk (OVX, 0. nap), majd a műtét utáni 7. napon szilikon kapszulákat ültettünk a bőr alá (ID 1.57 mm, OD 3.18). Az ösztrogén-kezelt csoport (OVX+E2) kapszulájában $0.625\ \mu\text{g}$ 17β -estradiol volt, $20\ \mu\text{l}$ napraforgó olajban, míg a kontrol csoport (OVX) kapszulájában napraforgó olaj. Az állatokat 3 nappal később (a 10. napon) kolhicinnel kezeltük (intracerebrálisan beadtunk $40\ \mu\text{g}$ kolhicint $4\ \mu\text{l}$ $0.9\ \%$ -os sóoldatban oldva) és 24 órával később (a 11. napon) transzkardiálisan perfundáltuk zeitgeber time (ZT) 4-5 vagy ZT11-12 szerint. A műtéteket a kísérleti állatokon mély altatásban végeztük, intraperitoneálisan adagolt ketamin, xilazin és pipolphen ($25, 5,$ illetve $2.5\ \text{mg/kg}$ testtömeg) keverékkel. Minden kísérlet a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet (No. 2285/003), a Debreceni Egyetem (No. 6/2011/DE MÁB és 5/2015/DEMÁB) és az Eötvös Lóránd Tudományegyetem (PEI/001/37-4/2015) Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának engedélyével történt. A kísérletek az Európai Közösség Tudományos Tanácsának előírásai szerint (86/609/EEC) zajlottak le.

I. táblázat: A különböző kísérletekben használt egér modellek.

Egértörzs és genotípus/Nem	Kor	Felhasznált állatszám	Műtét/Kezelés	Kísérlet
CD1 WT/♂♀	1-3 hónapos	69	∅	(4.1.2.); (4.1.4.); (4.2.6.)
CD1 WT ♀	1-3 hónapos	10	OVX + olaj	(4.2.1); (4.2.4.); (4.2.6.)
CD1 WT ♀	1-3 hónapos	10	OVX + E2/EB	(4.2.1.); (4.2.2.); (4.2.4.); (4.2.5.); (4.2.6.)
C57BL/6J GnRH-GFP ♀	1-3 hónapos	3	∅	(4.1.1.)
C57BL/6J ChAT-GFP ♂	1-3 hónapos	3	∅	(4.1.1.)
C57BL/6J GLYT2-GFP ♂	1-3 hónapos	12	CTB vagy Fluoro- gold beadás	(4.1.3.)

II. táblázat Elektrofiziológiai vizsgálatokra szánt akut szeletek.

<i>Egértörzs és genotípus/Nem</i>	<i>Kor</i>	<i>Felhasznált állatszám</i>	<i>Műtét/Kezelés</i>	<i>Kísérlet</i>
C57BL/6J GnRH-GFP proestrus ♀	1-3 hónapos	3	∅	(4.1.5.)
C57BL/6J ChAT-GFP ♂	1-3 hónapos	26	∅	(4.1.5.)

3.2. Emberi minták

A humán hipotalamikus szöveteket a Semmelweis Egyetem, I. sz Patológiai és Rákkutató Intézetétől, illetve a tatabányai Saint Borbála kórház Patológiai Intézetétől kaptuk. Három-négy órával a halál után az agy eltávolításra került a koponyából a 77 éves (SKO5) és 71 éves (SKO8) nő és az 55 éves (SKO7) férfi esetén a Magyar Egészségügyi tanács /ETT TUKEB 33268-1/2015/ EKU (0248/15) és 31443/2011/EKU (518/PI/11)/ és a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (SE-TUKEB 251/2016) által leírt protokollnak megfelelően, melyet a magyar törvények engedélyeznek (1997 CLIV and 18/1998/XII.27. EÜM Decree/).

3.3. Egér és emberi agyszövetek előkészítése fénymikroszkópos vizsgálatokra

Az egereket transzkardiálisan perfundáltuk, először foszfát pufferes sóoldattal (10 ml 0,1 M-os phosphate buffered saline, PBS, pH 7,4), majd 4% paraformaldehidet tartalmazó PBS-sel (100 ml 4% PFA 0.1M-os PBS-ben). Az agyak 2 %-os PFA/PBS oldatban, 24 órát, 4 °C-on krioprotektív 25 %-os cukoroldatban posztfixálódtak. Ezután, Leica SM 2000R típusú fagyasztó mikrotómmal 30 µm vastag metszeteket készítettünk. A humán hipotalamikus blokkok a három posztmenopauzás nő esetében (53-88 korú) 24 órával a halál után kerültek kimetszésre. A metszeteket gyorsan és óvatosan lemostuk vízben, majd immerziósan fixáltuk 4 %-os PFA/PBS oldatban 10 napig. A szövetblokkokat átittattuk 20 %-os cukoroldattal, majd 30 és 100 µm vastag metszeteket készítettünk fagyasztó mikrotómmal. A 0.5%-os H₂O₂-dal (10 percig) kioltottuk az endogén peroxidáz aktivitást, majd a szöveteket 0,5% Triton X-100 oldattal tártuk fel. Végül 2%-os lószérumot alkalmaztunk (20 percig) a nem-specifikus antitest kötődés megelőzésére. Az egymást követő kezeléseket és a PBS mosásokat (3x 5 perc) szobahőmérsékleten végeztük, míg az elsődleges, másodlagos (biotinilált és fluorokróm konjugált) antitestekben való inkubációt 4°C-on végeztük.

3.4. Egér és emberi agyszövetek előkészítése elektronmikroszkópos vizsgálatokra

Az egereket először PBS-sel (10 ml, 0,1 M-os; ph=7.4), majd 2%-os PFA és 4%-os acrolein keverékével perfundáltuk. Az agyak 2 %-os PFA/PBS oldatban posztfixálódtak 24

órán keresztül, 4°C-on. A 30 µm vastag metszeteket a Leica VTS-1000 típusú vibratóm segítségével készítettük el, majd 1 %-os Na-borohidriddel kezeltük (30 percig), a fixáló kimosása végett és 0.5%-os H₂O₂-dal (15 percig). A metszeteket ezután cukoroldatban krioprotektáltuk, majd folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd felolvasztottuk 3 alkalommal az antitest penetrációját elősegítve. A humán mintákat olyan idős egyénekből használtuk fel, amelyek korábbi kísérleteink alkalmával magas KP immunreaktivitást mutattak. Az nyaki verőér és az agyai artéria kannülálásával először fiziológias sóoldattal (mely 5 mL Na-heparint tartalmazott, 5000 U/mL) mosták át az érrendszert (1.5 L, 30 percig). Ezt követően fixáló oldattal (3-4 L, 2- 2.5 órán keresztül), amely 4 % PFA-t, 0,05 % glutáraldehidet és 0.2 % pikrin savat tartalmazott 0.1 M-os foszfát pufferben. A hipotalamusz kimetszésre került és 4% PFA-ban posztfixálódott egész éjszaka, glutáraldehid nélkül. Az 50 µm vastag hipotalamikus, koronális metszeteket vibratómmal készítettük el. Majd 2%-os lószérumot alkalmaztunk (20 percig) a nem-specifikus antitest kötődés megelőzésére. Az egymást követő kezeléseket és a PBS mosásokat (3x 5 perc) szobahőmérsékleten végeztük, kivéve az elsődleges és másodlagos (biotinilált és fluorokróm konjugált) antitestekben való inkubációt, amelyet 4°C-on végeztük. A szöveti antigének immunhisztokémiai detektációja után, az immunjelölt egér és humán metszeteket 1 % ozmiummal (1 órán keresztül) és 1%-os uranil-acetáttal (70%-os alkoholban oldva; 40 percig) kezeltük, majd felszálló alkoholsorban és acetonnitrilben dehidráltuk. A metszeteket ezután TAAB 812 epoxi gyantába ágyaztuk tárgylemez és fedőlemez közé, melyeket a könnyebb szétszedhetőség érdekében Hobbytime-mal előkezeltünk.

3.5. Egyes és többes immunfluoreszcens jelölés konfokális mikroszkópos elemzésekhez

Az egér és humán metszeteket 72 órán keresztül inkubáltuk elsődleges antitestekben (egy, két vagy három elsődleges antitest keverékében: KP, GlyR, GFP, CTB, GnRH, TH). Az antigén-antitest komplexet ezután a megfelelő FITC-, CY3-, vagy CY5-konjugált másodlagos antitestben (12 órán át) inkubáltuk. A GlyR esetében a jelet biotinilált tiramiddal (BT) erősítettük, majd Alexa Fluor 594 konjugált streptavidinnel tettük láthatóvá. A humán infundibuláris KP kapcsolatok elemzéséhez FITC-tiramidot alkalmaztunk a jel erősítésére. Az immunfluoreszcensen jelölt metszeteket 0.1 M-os Tris-HCl (pH 7.6) pufferből húztuk fel tárgylemezre és Mowiolal fedtük le.

III. táblázat Immunfluoreszcens jelölés technikai részletei.

<i>Kísérlet</i>	<i>Elsődleges antitestek</i>	<i>Másodlagos antitestek</i>	<i>Jel erősítés</i>
(4.2.2.)	KP elleni birka antiszérum (GQ2, Waljit S. Dhilló-tól, 1:20,000)	Biotinilált szamár anti-birka IgG (Jackson, 1:1,000)	ABC/FITC-tiramid
(4.1.1.)	GlyR elleni tengeri malac antiszérum (#105-136aa Masahiko Watanabe-tól, 1mg/ml) és GFP elleni nyúl antiszérum (#AB10145, 1:2,500)	Biotinilált szamár anti-tengeri malac IgG (Jackson, 1:1,000) és Biotinilált szamár anti-nyúl IgG (Jackson, 1:1,000)	ABC/BT/STA-Alexa Fluor 594
(4.1.3.)	CTB elleni kecske antiszérum (#103, List Biological Laboratories, 1:2,000) és GFP elleni nyúl antiszérum (#AB10145, Millipore, 1:2,500)	CY3 konjugált szamár anti-kecske IgG (Jackson, 1:2,000) és FITC-konjugált szamár anti-nyúl IgG (Jackson, 1:1,000)	∅
(4.2.6.)	GnRH elleni tengeri malac antiszérum (#1018, Hrabovszky Eriktől, 1:600,000), KP elleni nyúl antiszérum (#566, Alan Caraty-tól, 1:50,000) és TH elleni csirke antiszérum (#TYH, Aves Laboratories Inc., 1:1,000)	FITC-konjugált szamár anti-tengeri malac IgG (Jackson, 1:1,000), CY3-konjugált szamár anti-nyúl IgG (Jackson, 1, 2000) és CY5-konjugált szamár anti-csirke IgG (Jackson, 1:1,000)	∅

3.6. Egyes és kettős immunjelölések fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz

Az egér és humán metszetek egyes vagy kettős immunhisztokémiának vetettük alá. A metszeteket 72 órán keresztül inkubáltuk egyidejűleg, az elsődleges antitestekben. Ezt követte a KP-, GlyR-, GnRH-, GLYT2-, GLYT1-IR struktúrák láthatóvá tétele, a megfelelő másodlagos antitestben (12 óra) majd Vectastain ABC Elite oldatban (1: 1,000, 1.5 óra) való inkubáció során. Az immunreakciót nickel-diaminobenzidin (NiDAB), és 0.006% H₂O₂ tartalmú hívóoldattal tettük láthatóvá. Ezüst-arany (SGI-NiDAB) intenzifikálást követően a metszeteket a második primer szérumot felismerő biotinilált másodlagos IgG-ben, majd Vectastain ABC Elite (1: 1,000, 1.5 óra) oldatban inkubáltuk. Ezt követően a második jelet diaminobenzidin (DAB) és 0.006% H₂O₂ tartalmú hívóoldatban jelenítettük meg. A fénymikroszkópiára szánt metszeteket tárgylemezre

húztuk fel, majd DPX-szel lefedtük őket. Az elektronmikroszkópiára szánt metszeteket dehidráltuk és epoxy műgyantába ágyasztuk a fentebb már említett módon.

IV. táblázat Fény- és elektronmikroszkópos immunjelölések technikai részletei.

<i>Kísérlet</i>	<i>Elsődleges antitestek</i>	<i>Másodlagos antitestek</i>	<i>Antigén-antitest complex vizualizációja</i>
(4.2.2.)	KP elleni birka antiszérum (GQ2, Waljit S. Dhilló-tól, 1: 20,000)	Biotinilált számár anti-birka IgG (Jackson, 1:1,000)	SGI-NiDAB
(4.1.1.)	GlyR elleni tengeri malac antiszérum (#105-136aa, Masahiko Watanabe-től, 1 mg/ml)	Biotinilált számár anti-tengeri malac IgG (Jackson, 1:1,000)	SGI-NiDAB
(4.2.5.)	GnRH elleni tengeri malac antiszérum (#1018, Hrabovszky Eriktől, 1:600,000) és KP elleni nyúl antiszérum (#566, Alan Caraty-től, 1:100,000)	Biotinilált számár anti-tengeri malac IgG (Jackson, 1:1,000) és Biotinilált számár anti-nyúl IgG (Jackson, 1:1,000)	SGI-NiDAB és DAB
(4.2.5.)	GnRH elleni tengeri malac antiszérum (#1018, Hrabovszky Eriktől, 1:600,000) és TH elleni csirke antiszérum (#TYH, Aves Lab Inc., 1:1,000)	Biotinilált számár anti-tengeri malac IgG (Jackson, 1:1,000) és Biotinilált számár anti-csirke IgG (Jackson, 1:1,000)	SGI-NiDAB és DAB
(4.1.2.)	GLYT2 elleni nyúl antiszérum (#N30aa, Masahiko Watanabe-től, 1 mg/ml) és GnRH elleni tengeri malac antiszérum (#1018, Hrabovszky Eriktől, 1:600,000)	Biotinilált számár anti-nyúl IgG (Jackson, 1:1,000) és Biotinilált számár anti-tengeri malac IgG (Jackson, 1:1,000)	SGI-NiDAB és DAB
(4.1.2.)	GLYT2 elleni nyúl antiszérum (#N30aa, Masahiko Watanabe-től, 1 mg/ml) és ChAT elleni kecske antiszérum (#AB144P, Millipore, 1:1,1500)	Biotinilált számár anti-nyúl IgG (Jackson, 1:1,000) és Biotinilált számár anti-birka IgG (Jackson, 1:1,000)	SGI-NiDAB és DAB
(4.1.4.)	GLYT1 elleni kecske antiszérum (#AB1770, Millipore, 1:10,000) és GnRH elleni tengeri malac antiszérum (#1018, Hrabovszky Eriktől, 1:600,000)	Biotinilált számár anti-birka IgG (Jackson, 1:1,000) és Biotinilált számár anti-tengeri malac IgG (Jackson, 1:1,000)	SGI-NiDAB és DAB
(4.1.4.)	GLYT1 elleni kecske antiszérum (#AB1770, Millipore, 1:10,000) és ChAT elleni kecske antiszérum (#AB144P, Millipore, 1:1,1500)	Biotinilált számár anti-birka IgG (Jackson, 1:1,000) és Biotinilált számár anti-tengeri malac IgG (Jackson, 1:1,000)	SGI-NiDAB és DAB

3.7. Pályajelöléses technika a bazális előági glicinerg afferensek sejttestjének azonosítására

V. táblázat A pályajelölés technikai részletei.

<i>Használt tracer</i>	<i>Beadási paraméterek</i>	<i>Antigén-antitest complex vizualizációja</i>
Kolera toxin B (CTB) (0,5% oldata) Fluoro-Gold (2.5–5.0% oldata)	A következő beadási paraméterekt használtuk, a Bregmához (B) viszonyítva: a MS: anteroposterior, +0.61 mm; mediolateral, +0.0 mm; dorsoventral, -4 mm; HDB: anteroposterior, +0.37 or +0.02 mm; mediolateral, +0.80 or +1.40 mm; dorsoventral, -4.90 or -5.00 mm (Paxinos, 2013); és a VP/SI: anteroposterior, +0.13 mm; mediolateral, +1.20 mm; dorsoventral, -4.25 mm. A CTB és a Fluoro-Gold egyoldalra, ionoforezissel (5 μ A, 7 s on-off) lett beadva a bazális előági régiókba, 20 percen keresztül.	A CTB esetében: FITC-konjugált szamar anti nyúl IgG (Jackson, 1:1,1000). A Fluro-Gold-ot nem kell vizualizálni.

3.8. Mikroszkópia és adat elemzés

3.8.1. Korrelált fény- és elektronmikroszkópia

A műgyantába ágyazott metszeteket fénymikroszkóppal vizsgáltuk tovább, 60x-os nagyításon. A fénymikroszkópban fekete színt adó ezüstözött NiDAB-os struktúrák könnyen elkülöníthetők voltak a barna színű DAB jelölt struktúráktól, így a lehetséges kapcsolatok kiválasztását könnyítette meg. Az appozíciókat tartalmazó (GLYT1-, GLYT2-, vagy GnRH-IR rostok a ChAT-, GnRH-, KP-, vagy TH-IR idegsejtek szomato-dendritikus régióján) területeket további, elektronmikroszkópos vizsgálatnak vetettük alá. Félvékony (1 μ m) és ultravékony (50-60 nm) metszeteket készítettünk Leica UCT ultramikrotómmal (Leica Microsystems, Bécs, Ausztria). Az ultrametszetekből álló sorozatokat Formvar-hártyával borított egylyukú gridekre gyűjtöttük, 2% ólom citráttal kontrasztoltuk, a felvételeket Jeol-100 C transzmissziós elektron mikroszkóppal készítettük. A kapcsolatokat egymást követő ultravékony metszeteken azonosítottuk.

3.8.2. Konfokális lézer mikroszkópia

A TH- és/vagy KP-IR neuronokat tartalmazó POA periventrikuláris régiókból (3-6 ROI/Bregma szint, mely lefedte az egész területet) és az Arc-ból (3-7 ROI/Bregma szint), végeztük a konfokális elemzést a régiók egyik oldalából (Összes terület: 50589 μ m², z-

mélység átlagosan: 19-20 μm). A TH- és/vagy KP-IR perikarionokon és proximális dendritekenen lévő GnRH appozíciók számát vizsgáltuk. Appozíciók (egy optikai szeleten belül nem volt látható hézag a két egymás melletti profil között) és az immunreaktív sejttestek lettek leszámolva. A sejttesteken és a dendriteken lévő appozíciókat is megszámoltuk; a dendritikus appozíciók abban az esetben lettek beleszámolva, amennyiben vissza lehetett vezetni a sejttesttel való kapcsolatát. Annak érdekében, hogy elkerüljük a sejttestek és appozíciók duplán számolását, az egyedi sejteket beszámoltuk és azonosítottuk az egymást követő optikai metszeteken.

3.8.3. Térképezés és kvantifikáció

A POA területén KP-immunopozitív vagy KP-immunonegatív TH-IR sejtek és immunonegatív KP-IR neuronok voltak elkülöníthetők, melyeket az alábbiak szerint jelöltünk: KP-/TH+, KP+/TH+, KP+/TH-. A korábbi tanulmányoknak megfelelően az Arc-ban lévő TH-IR sejtek immunonegatívak voltak KP-re. A POA-ban, a TH vagy KP vagy mindektőt tartalmazó sejtek százaléka és a GnRH appozíciók százaléka ezen neuronokra lett meghatározva és összehasonlítva, az egyes modellekben, Tukey HSD post hoc teszt után egy utas ANOVA-val. Továbbá, az átlagos appozíció szám is meg lett határozva a különböző sejtípusokon. A preoptikus TH-IR sejtekre érkező átlagos GnRH appozícióit és az Arc TH-IR sejt populációkra érkező átlagos GnRH appozícióit Tukey HSD post hoc teszt után két-utas ANOVA-val hasonlítottuk össze. Statisztikailag szignifikánsnak tekintettük a különbségeket $p < 0.05$ esetében.

A bazális előagyi glicinerg rostok eredtének vizsgálatára, retrográd jelölő anyagot (CTB vagy Fluoro-Gold) injektáltunk GLYT2-GFP transzgen egér MS, HDB, VP és Si területére. Annak ellenére, hogy a retrográdan visszajelölt GFP-s sejtek megoszlása változott a vizsgált állatokban, a beadás helyétől és az injektált terület nagyságától függően, voltak olyan területek, amelyek minden esetben jelölődtek.

4. Eredmények

4.1. A bazális előagyi neuronok glicinerg beidegzésének vizsgálata

4.1.1. A GlyR almag és sejt-specifikus megjelenése a bazális előagyban

Pan α -GlyR antitest alkalmazásával, GlyR-immunreaktív helyeket mutattunk ki a bazális előagy összes almagjában és a septális-preoptikus területen. Annak ellenére, hogy a szeptális-preoptikus terület is immunopozitív volt a GlyR-ra, a kettős jelölés során nem találtunk egyértelmű bizonyítékot arra, hogy a GnRH neuronok is tartalmazzák a GlyR-t.

A GnRH neuronokkal ellentétben, GlyR-immunorektív helyeket azonosítottunk a legtöbb kolinerg sejt esetében, azt sugallva, hogy a glicin direkt módon befolyásolja a kolinerg sejtek működését a bazális előagyban.

4.1.2. A glicinerg (GLYT2-pozitív) afferensek megoszlása a bazális előagyban és appozíciójuk a GnRH és kolinerg idegsejteken

A GLYT2 immunhisztokémiai jelölésével, a glicinerg (GLYT2-IR) axonok nagy sűrűségét detektáltuk az egér bazális előagyában és a szepto-preotikus-hipotalamikus területeken, ahol a GnRH és ChAT-pozitív sejtek is megtalálhatóak. A GLYT2-IR rostok és a GnRH- vagy ChAT-IR idegsejtek fénymikroszkópos elemzésével axo-szomatikus és axo-dendritikus kapcsolatokat mutattunk ki. A GLYT2-IR rostok nagy nagyítású felvételein látszott, hogy gyakran formálnak varikozitásokat, melyek közepe nem-jelölt, arra utalva, hogy a célsejt nyúlványait fogják körbe és axo-spinózus kapcsolatokat létesítenek. Ezek a kapcsolatok további ultrastrukturális vizsgálatoknak lettek alávetve. A GnRH esetében, annak ellenére, hogy fénymikroszkópos szinten gyakran lehetett GLYT2-IR appozíciókat találni, elektronmikroszkópos szinten nem sikerült szinaptikus kapcsolatot kimutatni (n=54) a GLYT2-IR rostok és GnRH neuronok között. A GnRH-val ellentétben, 32 szinapszist sikerült azonosítani ChAT-IR sejteken. A GLYT2-IR axon terminálisok körbeveszik a kis- és nagy átmérőjű ChAT-IR dendriteket és szimmetrikus szinapszisokat képeznek dendritekkel (n=20) és perikarionon (n=1). Továbbá, korrelált fény- és elektronmikroszkópos módszer alkalmazásával és az ultravékony metszetek elemzésével axo-spinózus kapcsolatokat a sejttesten (n=2) és a dendritikus tüskéken (n=9) is sikerült kimutatni.

4.1.3. A bazális előagyba vetítő glicinerg idegsejtek lokalizációja

A bazális előagyi glicinerg bemenet eredetének vizsgálatára, retrográdan terjedő CTB vagy FluroGold jelölő anyagokat injektáltunk a GLYT2-GFP transzgén egerek, MS, HDB, VP, és SI területére. A mediális preoptikus területet nem jelöltük vissza, hiszen nem találtunk meggyőző bizonyítékot arra, hogy a glicinerg rostok direkt kapcsolatban állnak-e a GnRH neuronokkal. A legnagyobb számú kettősen jelölt (CTB-pozitív és GFP pozitív) sejteket a raphe magnus területén azonosítottuk ($25 \pm 7.4\%$ az összes GFP sejtnek, n =6). Retrográdan jelölt sejtek, minden beadás esetén, megjelentek a pontine retikularis mag és a gigantocelluláris retikuláris mag területén. Néhány sejt a periaqueductal gray területén is visszajelölődött.

4.1.4. GLYT1-IR asztroglia nyúlványok a GnRH és kolinerg idegsejtek közelében

A dorzális előagyi régiókkal ellentétben, erős GLYT1-immunreaktivitás figyelhető meg a bazális előagyban, különösképpen azokon a területeken, ahol a GnRH és kolinerg sejtek is megtalálhatók. Fénymikroszkópos szinten is látszik, hogy a GLYT1-immunreaktivitás egybefüggő foltokat alkot és a GnRH neuronok és a kolinerg sejtek egyaránt a GLYT1-immunreaktív mikro környezetbe vannak beágyazva. Ultrastrukturális szinten, a GLYT1-immunreaktivitást vékony, gliális nyúlványokban mutattuk ki, melyek gyakran a GnRH-ra és a kolinerg sejtekre érkező aszimmetrikus és szimmetrikus szinapszisok közelében voltak detektálhatók.

4.1.5. Kollaborációs vizsgálataink: A glicin hatása a GnRH és kolinerg sejtek membrán tulajdonságaira

Elektrofiziológiai méréseket végeztünk a GnRH és a kolinerg idegsejteken a bazális előagyban, annak kiderítése végett, hogy a glicin direktben befolyásolja-e ezen sejtek működését. A GnRH esetében, whole cell mérési körülmények között azt találtuk, hogy a glicinnek (4 μM -os) nincs szignifikáns hatása a GnRH neuronok akciós potenciáljának frekvenciájára, proösztusz fázisban lévő egerekben. A GnRH neuronokkal ellentétben, a kolinerg sejtek elektrofiziológiai mérései, minden bazális előagyi alrégióban, egy alapvető glicinerg input jelenlétét támasztja alá. Körülbelül 80%-a a random módon kiválasztott bazális előagyi kolinerg sejteknek, bicuculline-rezisztens, sztrichnin-érzékeny sponán IPSCs-eket mutatott.

4.2. A GnRH efferensek és célsejteinek jellemzése egérben és emberben

4.2.1. A GnRH-IR nyúlványok ultrastrukturális vizsgálata egérben

A GnRH-IR nyúlványok axon terminálisokat és aszimmetrikus szinapszisokat képeznek jelöletlen dendriteken, az RP3V és az Arc területén. Az axon terminálisok kicsi, átlátszó megjelenésű vezikulákat és immunjelölt dense-core vezikulákat tartalmaznak. Az axon terminálisok átmérője körülbelül 0.5 μm . A Herbison labor által is leírt GnRH dendronokat detektáltam 0.712 \pm 0.211 μm és 1.62 \pm 0.748 μm közötti átmérővel. Hasonlóan az axon varikozitásokhoz és terminálisokhoz, mitokondriumokat, kicsi, átlátszó és dense-core vezikulákat tartalmaznak, de a posztzinaptikus oldalon találhatóak és szinaptikus inputokat kapnak azonosítatlan axon terminálisoktól.

4.2.2. A KP-KP kapcsolatok elemzése egérben

A KP-IR sejtek nyúlványainak sűrű hálózatát detektáltam a POA és Arc területén konfokális mikroszkópia segítségével. KP-IR varikozitásokat figyeltünk meg a KP-IR sejtesteken, a POA és Arc területén egyaránt. Ultrastrukturális vizsgálataink során KP-IR axon terminálisokat azonosítottunk, melyek nagy dense-core vezikulákat és kis, átlátszó vezikulákat tartalmaztak mindkét területen. A KP-IR terminálisok szimmetrikus, axo-szomatikus (n=5 a POA-ban; n=3 az Arc-ban) szinapszisokat alakítottak ki a másik KP-IR sejtestjével.

4.2.3. A KP-KP kapcsolatok elemzése emberben

A humán infundibuláris mag konfokális vizsgálata kimutatta, hogy a KP-IR sejtek többsége az az infundibuláris mag caudális részében helyezkednek el, míg az infundibuláris nyél területén kevesebb számban található. Ultravékony metszetek elemzésével azt találtuk, hogy a KP-IR axonok szinapszisokat formálnak jelöletlen sejtesteken és dendriteken. Továbbá, ebben a régióban a KP-IR axonok gyakran formálnak kontaktusokat másik KP-IR neuronokkal. Ezek a kontaktusok axo-dendritikus és axo-szomatikus szinapszisok voltak, illetve axo-axonikusak.

4.2.4. A KP- és/vagy TH-IR sejteken lévő GnRH-IR appozíciók konfokális mikroszkópos elemzése az RP3V és Arc területén

A GnRH sejtestek a szepto-preoptik-hipotalamikus vonalban találhatóak, azonban nyúlványaik megtalálhatóak az RP3V és a medibazális hipotalamusz területén is, ahol varikozitásokat formálnak. Ez a két terület tartalmazza a KP- és TH-IR sejteket is. Három immunfluoreszcens jelöléssel GnRH-IR nyúlványokat azonosítottunk mindhárom sejttípus (úgy mint a KP-, TH-, és KP/TH-IR sejtek) közelében az RP3V területén, illetve a mindkét sejttípus (úgy mint KP- és TH-IR sejtek) közelében, az Arc területén.

4.2.5. A GnRH axonok szinaptikus célsejt azonosítása

A KP- és/vagy TH-IR sejteken azonosított GnRH-IR appozíciókat tovább vizsgáltuk ultrastrukturális szinten. Ultravékony metszetek elemzése során 13 esetben találtunk vagy axo-szomatikus vagy axo-dendritikus szinapszisokat a GnRH-IR axon terminálisok és KP-IR sejtek között. A TH-IR neuronok esetében, 12 szinaptikus kapcsolatot azonosítottunk. A GnRH-IR preszinaptikus elemek kicsi, kerek, átlátszó vezikulákat és néhány dense-core vezikulát tartalmazott, melyek ezüst szemcsékkel voltak jelölve. Az összes detektált szinapszis (25 szinapszis) az RP3V területén (n=8) és az Arc területén (n=17) aszimmetrikus jelleget mutatott.

4.2.6. Hormonális és laktációhoz kapcsolódó hatások a KP- és TH-IR neuronok GnRH inputjára

4.2.6.1. Cirkadián hatások a KP sejtek GnRH inputjára

Megvizsgáltuk a diurnális változások hatásait a KP sejtek GnRH inputjának a mennyiségére az RP3V és az Arc területén. Az RP3V esetén a kvantifikációt kolhicin és OVX+E2 kezelt állat modelben, míg az Arc területén kolhicin és OVX+olaj kezelt állat modellekben végeztük. GnRH-IR varikozitásokat az RP3V KP-IR sejtek körülbelül 25%-ában találtunk [$23.79 \pm 6.93\%$, ZT4–5 (n = 5) és $28.19 \pm 4.41\%$, ZT11–12 (n = 7)], míg az Arc KP-IR sejtjei esetében ez a szám körülbelül 50% volt [$45.99 \pm 3.02\%$, ZT4–5 (n = 5) és $55.13 \pm 4.62\%$, ZT11–12 (n = 5)]. A százalékok nem mutattak szignifikáns különbségeket a különböző zeitgeber időpontokban.

4.2.6.2. A laktáció hatása a KP- és /vagy TH-IR sejtek GnRH inputjára

A dopaminerg sejtek GnRH inputjának lehetséges változásait vizsgáltuk laktáló anyáknál (posztpartum 11. napon) és a 24 órás kölyök elvont laktáló anyáknál, hármas immunfluoreszcens jelöléssel és konfokális mikroszkópos elemzéssel. A KP-pozitív és a KP-negatív TH-IR (KP+/TH+-IR és KP-/TH+-IR) sejtek GnRH-IR appozíciójának számát elemeztük laktáló anyáknál összehasonlítva nem-laktáló (OVX+E2 kezelt) és 24 órás kölyökkelvont laktáló anyákkal.

A TH-IR sejtek alacsonyabb arányban immunreaktívak KP-re a laktáló anyák POA területén

Az OVX+E2 kezelt egerekben a TH sejtek magas százaléka ($57.8 \pm 4.3\%$) immunreaktív KP-re. Ez az arány szignifikánsan alacsonyabb laktáló anyáknál ($16.1 \pm 5\%$ -a az összes leszámolt IR sejtnek, $F = 28.069$, $p < 0.001$; egy-utas ANOVA, post hoc Tukey). Az egyes jelölt TH (KP-/TH+-IR) vagy KP (KP+/TH--IR) sejtek száma szignifikánsan megemelkedett (a TH esetében; $39.8 \pm 3.7\%$ vs. $72.4 \pm 2.9\%$ -a az összes leszámolt sejtnek, $F = 30.986$, $p < 0.001$; egy-utas ANOVA, post hoc Tukey, a KP esetében; $2.4 \pm 0.8\%$ vs. $15.4 \pm 4.1\%$ -a az összes leszámolt sejtnek, $F = 5.056$, $p = 0.03$; egy-utas ANOVA, post hoc Tukey). A kölyök elvétele 24 órára, nem változtatta meg a kolokalizációs százalékat az anyáknál ($17.3 \pm 4.6\%$ -a az összes leszámolt sejtnek).

A laktáció és a kölyök elvonás hatásai a TH-IR sejteken lévő GnRH-IR appozíciók számára

Konfokális mikroszkópos elemzéssel kimutattuk, hogy a GnRH neuronok appozíciókat formálnak mindhárom fenotípusú sejtben (úgy mint KP+/TH+, KP-/TH+, or KP+/TH-) a POA területén, illetve a TH-IR neuronokon (úgy mint KP-/TH+) az Arc területén. A laktáló anyáknál a GnRH-IR appozíciók száma szignifikánsan emelkedett a KP-/TH+ sejteken, a POA területén ($68.5 \pm 4.3\%$ laktáló állatban, $72.3 \pm 6\%$ kölyökkelvont állatokban vs.

48.2±3.2% OVX+E2 egerekben, $F= 8.834$, $p=0.006$; egy-utas ANOVA, post hoc Tukey). Ezzel ellentétben, a KP+/TH+ sejtek szignifikánsan csökkent számú GnRH appozíciókat kaptak, ugyanazokat az állat modelleket összehasonlítva (13.1±3.8% és 12.4±3.7% vs. 49.3±3.4%, $F=36.225$, $p< 0.001$; egy-utas ANOVA, post hoc Tukey). A nettó eredmény egy kis mértékű csökkenés volt a TH-IR sejtek GnRH-IR appozíciók százalékában, a laktáló állatok egész preoptikus TH-IR sejtpopulációját összehasonlítva a nem-laktáló állatokkal ($F=4.946$, $p< 0.032$; egy-utas ANOVA, post hoc Tukey). A kölykök elvétele nem okozott változást a kontaktok számában. A TH-IR sejtpopulációk (KP+ és KP-) GnRH-IR appozícióinak százaléka magas volt (96.9±1.5%, 81.6 ±4.1%, 84.8±5.9% a POA területén az OVX+E2 egerekben, laktáló vagy kölyökeltávolított anyákban). A TH-IR sejtek GnRH-IR appozícióinak átlagos száma nem különbözött a vizsgált csoportokban, de ez az érték szignifikánsan alacsonyabb volt a POA területén mint az Arc területén, minden vizsgált csoportban ($F=34.043$, $p< 0.001$; két-utas ANOVA, post hoc Tukey).

5. Következtetések

Az értekezésem első felében, megvizsgáltam a glicin lehetséges célsejtjeit a bazális előagyban. Ennek érdekében morfológiai és funkcionális kísérleteket hajtottunk végre.

Először is a GlyR jelenlétét próbáltuk meg kimutatni a GnRH és kolinerg sejtekben. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az összes bazális előagyi régió immunreaktív GlyR-ra, köztük azok a régiók is amelyek tartalmazzák a két lehetséges célsejt csoportot. Kettős immunfluoreszcens jelölést és konfokális mikroszkópos elemzést alkalmazva, nem találtunk egyértelmű bizonyítékot arra vonatkozólag, hogy a GnRH neuronok expresszálják-e a GlyR-t, ezzel ellentétben a kolinerg sejtek az összes bazális előagyi régióban GlyR pozitivitást mutatott. Továbbá, kettős immunjelölést alkalmazva nem sikerült a GLYT2-IR axon terminálisok és GnRH sejtek között szinaptikus kapcsolatot azonosítani. A kolinerg sejtek esetében más volt a helyzet: a GLYT2-IR axon terminálisok szimmetrikus, axo-szomatikus és axo-dendritikus szinapszisokat formáltak, amelyek gyakran disztálisabb dendrit ágakon jelentek meg arra utalva, hogy ezek kevésbé erőteljes, de mégis jelentős, az agyi plaszticitásban fontos szerepet játszó gátlást hoznak létre. A bazális előagyi glicinerg afferensek eredetének vizsgálatára pályajelölési módszert alkalmaztunk. CTB-t vagy FluoroGoldot injektáltunk GLYT2-GFP transzgen állat, különböző bazális előagyi régióiba, majd kielemeztük a kettősen jelölt (CTB vagy FluoroGold és GFP-pozitív) sejtek eloszlását az agytörzsben. Azt az eredményt kaptuk, hogy bazális előagyban található glicinerg rostok sejttestjei főként a Raphe Magnusban, az agytörzs Gigantocellular formációjában és a periaqueductal greyben találhatóak. Majd

megvizsgáltuk a GLYT1-IR asztrocita nyúlványok eloszlását a GnRH és kolinerg sejtek közelében. Kettős immunjelölés után (GnRH vagy ChAT és GLYT1), azt láttuk, hogy a GnRH és kolinerg sejtek be vannak ágyazódva a GLYT1-IR asztrocita nyúlványok közé. Ultrastrukturális szinten ezen nyúlványok a GnRH és kolinerg sejtekre érkező aszimmetrikus és szimmetrikus szinapszisok közelében helyezkednek el, azt sugallva, hogy ezen szinapszisok közelében, az extracelluláris tér glicin koncentrációja szigorúan szabályozott. Végül kollaborátoraink segítségével teszteltük, hogy vajon a glicin direkt hatást fejt ki a GnRH és kolinerg sejtek membrán potenciál tulajdonságaira. Whole cell patch clamp körülmények között nem találtunk változást a GnRH sejtek tüzelési mintázatában glicin hatására. A kolinerg sejtek esetében azonban a glicin gátló hatását sikerült kimutatni.

Az értekezésem második részében jellemeztem a GnRH neuronok efferenseit és azok célsejtjeit egérben és emberben. Először is ultrastrukturális szinten megvizsgáltam a GnRH nyúlványokat a mediobazális hipotalamusz területén. A GnRH nyúlványok átmérője $0.712 \pm 0.211 \mu\text{m}$ és $1.62 \pm 0.748 \mu\text{m}$ között változott, illetve gyakran szinapszisokat formáltak azonosítatlan sejttesteken és dendriteken. Egyes nyúlványok poszt-szinaptikus elemként jelentek meg, míg mások preszinaptikusként, szinapszisokat kialakítva. A Kisspeptin idegsejtek egyik fő szabályozói a GnRH neuronoknak, egérben és emberben egyaránt. Megvizsgáltam ultrastrukturális szinten a KP-KP sejtek kapcsolatát, egérben, az RP3V és Arc területén, illetve emberben az INF területén. Egérben axo-szomatikus szinapszisokat sikerült kimutatni mindkét területen. Ezen kapcsolatok úgy tűnik, hogy filogenetikailag megőrzöttek, hiszen más állatfajokban, úgymint patkányban és birkában is azonosították őket. Humán vizsgálataink során axo-szomatikus, axo-dendritikus szinapszisokat és axo-axonikus kapcsolatokat detektáltunk. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a KP sejtek működése nagy fokú szinkronizált. Azonban ezen kapcsolatokban szerepet játszó neurotranszmitterek és neuromodulátorok faji különbségeket mutatnak, mint például a Dynorfin kevésbé van jelen a humán KP sejtekben.

A GnRH neuronok mellett, hogy a szaporodás szabályozás végső kimenetét adják és a hipotalamo-hipofizeális keringésbe ürülnek, a GnRH neuronok beidegzik az RP3V és Arc területét is. PhD tanulmányaim során megvizsgáltam a GnRH neuronok lehetséges szinaptikus célsejtjeit az RP3V és az Arc területén. Elektron mikroszkópos vizsgálataim során, először mutattunk ki szinaptikus kapcsolatokat a GnRH axon terminálisok és a KP- vagy TH-IR sejtek között. Továbbá megvizsgáltam a lehetséges hatásait a circadián időpontoknak, a hormonális változásoknak és a laktációnak ezen kapcsolatokra. Hármas

immunfluoreszcens jelölést alkalmazva, kielemeztem a KP-, TH-, és KP/TH-IR sejtek GnRH appozícióit különböző cirkadián időpontokban, különböző hormonális feltételek között, laktáció alatt és laktáló de kölyök elvont állapotban mindkét régióban. A KP és TH colokalizációt befolyásolták a különböző hormonális feltételek. A TH-IR sejtekben alacsonyabb szintű volt a KP sejtek immunreaktivitása a laktáló állatok POA területén. Azonban a KP-, TH-, KP/TH-IR sejtek GnRH appozícióinak száma nem változott szignifikánsan a két vizsgált területen, a különböző hormonális változásokra. Összességében tehát azt mondhatjuk, hogy ezen hormonális hatások nem befolyásolták a KP- és/vagy TH-IR sejtek GnRH-IR appozícióinak számát, azonban nem zárható ki, kommunikációban részt vevő elemek molekuláris/ultrastrukturális szintű változásának lehetősége.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szabolcs Takács¹, Zsuzsanna Bardóczi¹, Katalin Skrapits, Balázs Göcz, Viktória Váczi, Zsófia Maglóczky, Iván Szűcs, Gergely Rácz, András Matolcsy, Waljit S Dhillon, Masahiko Watanabe, Andrea Kádár, Csaba Fekete, Imre Kalló, Erik Hrabovszky Post mortem single-cell labeling with DiI and immunoelectron microscopy unveil the fine structure of kisspeptin neurons in humans **BRAIN STRUCTURE & FUNCTION** 223:(5) pp. 2143-2156. (2018)
¹Megosztott elsőszerzők
2. Zsuzsanna Bardóczi, Tamás Wilhelm, Katalin Skrapits, Erik Hrabovszky, Gergely Rácz, András Matolcsy, Zsolt Liposits, Joanna H. Sliwowska, Árpád Dobolyi and Imre Kalló GnRH neurons provide direct input to hypothalamic tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons which is maintained during lactation **FRONTIERS IN ENDOCRINOLOGY** DOI: 10.3389/fendo.2018.00685 11 p. (2018)
3. Bardóczi Z, Pál B, Kőszeghy Á, Wilhelm T, Watanabe M, Záborszky L, Liposits Z, Kalló I Glycinergic input to the mouse basal forebrain cholinergic neurons **JOURNAL OF NEUROSCIENCE** 37:(39) pp. 9534-9549. (2017)
4. Kalló I, Vida B, Bardóczi Z, Szilvasy-Szabo A, Rabi F, Molnar T, Farkas I, Caraty A, Mikkelsen J, Coen CW, Hrabovszky E, Liposits Z Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons Innervate Kisspeptin Neurons in the Female Mouse Brain. **NEUROENDOCRINOLOGY** 98:(4) pp. 281-289. (2013)

6.2. Egyéb közlemények

1. Hollo K, Ducza L, Hegyi Z, Docs K, Hegedus K, Bakk E, Papp I, Kis G, Meszar Z, Bardóczi Z, Antal M Interleukin-1 receptor type 1 is overexpressed in neurons but not in glial cells within the rat superficial spinal dorsal horn in complete Freund adjuvant-induced inflammatory pain. **JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION** 14: Paper 125. (2017)
2. Jo S, Kalló I, Bardóczi Z, Arrejo e Drigo R, Zeold A, Liposits Z, Oliva A, Lemmon VP, Bixby JL, Gereben B, Bianco AC Neuronal Hypoxia Induces Hsp40-Mediated Nuclear Import of Type 3 Deiodinase As an Adaptive Mechanism to Reduce Cellular Metabolism **JOURNAL OF NEUROSCIENCE** 32:(25) pp. 8491-8500. (2012)
3. Kalló I, Mohacsik P, Vida B, Zeold A, Bardóczi Z, Zavacki AM, Farkas E, Kadar A, Hrabovszky E, Arrojo e Drigo R, Dong L, Barna L, Palkovits M, Borsay BA, Herczeg L, Lechan RM, Bianco AC, Liposits Z, Fekete C, Gereben B A Novel Pathway Regulates Thyroid Hormone Availability in Rat and Human Hypothalamic Neurosecretory Neurons **PLOS ONE** 7:(6) Paper e37860. 16 p. (2012)