

Zárójelentés

Endokannabinoid szignalizáció szerepe a reprodukció hypothalamikus szintű szabályozásában

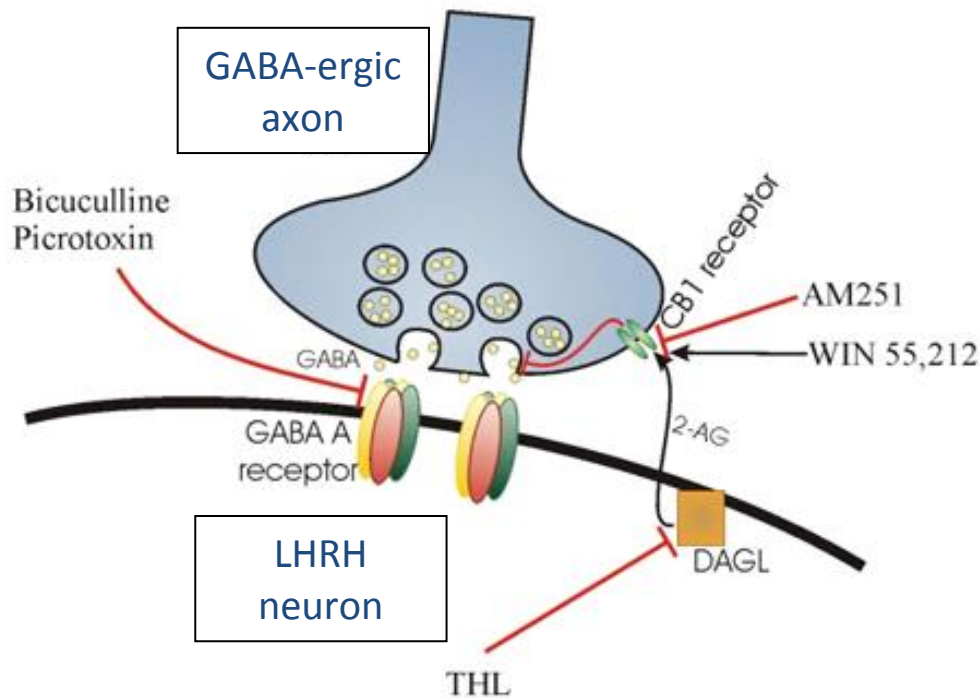
OTKA nyilvántartási szám: K 73002

Kutatóhely neve: Endokrin Neurobiológiai Kutatócsoport (MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet)
Projekt kezdete: 2008-04-01
Lezárás dátuma: 2012-04-30

I. Az eredeti munkaterv összefoglalója

Az ivarrendszer működését a hypothalamus luteinizáló hormon-releasing hormon (LHRH) neuronrendszere szabályozza. Az LHRH neuronhálózat különféle idegi neuromodulátor anyagok és hormonok befolyása alatt áll. Az idegszövetben a preszinaptikus bemenetek működését lipid hírvivők, endokannabinoidok módosítják. **A pályázat célja az endokannabinoid szignalizáció szerepének megismerése az LHRH neuronok élettevékenységének szabályozásában.** Korszerű molekuláris biológiai, elektrofiziológiai, elektronmikroszkopos módszerek és transzgenikus állatkísérleti modellek alkalmazásával tervezzük **1.** kimutatni az LHRH neuronokban termelődő endokannabinoidok szintézisében és lebontásban résztvevő enzimeket és vizsgálni az endokannabinoid metabolizmus ösztrogén-függését; **2.** jellemezni az LHRH neuronok gátló és serkentő afferens idegi bemeneteinek kannabinoid receptor 1 (CB1) tartalmát; **3.** megismerni az LHRH idegsejtek CB1 tartalmú glutamáterg és gamma-aminovajsav (GABA)-erg idegi bemeneteinek eredő sejtjeit az agyban; továbbá, **4.** whole cell patch-clamp módszer alkalmazásával jellemezni az LHRH neuronrendszerre és specifikus idegi afferenseire irányuló retrográd endokannabinoid jelátvitel főbb elektrofiziológiai jellemzőit és élettani szerepét. **A vizsgálatok az LHRH sejtműködés új szabályozó mechanizmusait hivatottak feltárni.** A várható eredmények hasznosíthatók lesznek gyógyszeripari fejlesztésekben és kábítószer függőségben szenvedők szaporodásbiológiai kórképeinek megértésében.

II. Az elért eredmények összefoglalója



Sémás ábra a projekt során feltárt, az LHRH neuronokból eredő és a GABA-erg idegvégződések működését szabályozó retrográd endokannabinoid szignalizációs mechanizmus bemutatására

II/1. Elsődleges eredmények összegzése

1. Igazoltuk, hogy az LHRH idegsejtek 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) endokannabinoidot termelnek, mely folyamat a diacylglycerol lipáz (DAGL) enzim szelektív blokkolásával felfüggeszthető (**13**).
2. Bebizonyítottuk, hogy az LHRH idegsejtek működését szabályozó neuronális afferensek preszinaptikus idegvégződései 1-es típusú kannabinoid receptort (CB1) tartalmaznak (**13**).
3. Feltártuk, hogy az LHRH neuronokból felszabaduló 2-AG markáns, tónusos gátló hatást fejt ki az LHRH idegsejteket szabályozó GABA-erg idegvégződésekre, mely hatás AM251 inverz agonista adásával felfüggeszthető. A gátlás szintetikus CB1 agonista (WIN55,212) alkalmazásával is kiváltható (**13**).

4. Kimutattuk, hogy az endokannabinoid hatás csökkenti a GABA-A receptorok által mediált miniatűr poszt-szinaptikus áramok (mPSC-k) frekvenciáját, valamint módosítja az LHRH idegsejtek tüzelési frekvenciáját (13).

5. Bizonyítottuk, hogy az LHRH idegsejteket is magába foglaló Broca-féle diagonális köteg területén a krónikus ösztrogén kezelés nem befolyásolja sem az endokannabinoid lebontás meghatározó enzimét jelentő FAAH, sem a CB1 mRNS expresszióját. Ugyanakkor, az ösztradiol jelzetten növeli a 2-AG szintéziséért felelős DAGL mRNS expressziót.

6. Feltérképeztük a hypothalamus endokannabinoid receptort (CB1 marker), GABA-t (GAD65 marker) és glutamátot (vGLUT2 marker) termelő magcsoportjait rágszálóban és ezen neuron fenotípusok egymáshoz való viszonyát az egyes területeken. Az LHRH-sejtműködés szempontjából meghatározó agyterületen, az antero-ventrális periventrikuláris mag (AVPN)-ban a GABA-erg, glutamáterg és CB1 tartalmú idegsejtek nagy számban és fenotípusos átfedésben mutathatók ki (21).

7. Feltártuk az LHRH neuronok eltérő intrahypothalamikus eredetű kisszeptin (KP)-erg afferens rendszereit rágszálóban (20) és igazoltuk a CB1 receptor előfordulását az LHRH idegsejtet beidegző KP-tartalmú idegvégződésekből is. Leírtuk továbbá az LHRH neuronrendszer kolinerg afferenseit (4) és igazoltuk az LHRH-sejtműködést gátló RFRP neuron rendszer ösztrogén általi szabályozását (17).

8. Igazoltuk a humán LHRH idegsejtek gazdag kisszeptin (12), GABA és glutamát rendszerek általi beidegzését (24), továbbá feltártuk a kisszeptinerg rendszer életkorhoz és nemhez kötött sajátosságait (19).

9. Módszertani fejlesztés eredményeként, részben az OTKA kutatási projekthez kapcsolódóan, valósítottuk meg hypothalamikus és egyéb limbikus struktúrák slice elektrofiziológiai (patch clamp) és nagy áteresztő képességű gén expressziós (microarray, TaqMan array) vizsgálatát (2,7,15,17,18). A módszerek alkalmazásával új kannabinoid, ghrelin és ösztrogén szignalizációs (15,16,18,22) mechanizmusokat tártunk fel, melyek a reprodukció új jövőbeli irányait jelölhetik ki.

II/2. További, kiegészítő eredmények összegzése

10. Standardizáltuk a kannabinoid receptor 1 (CB1) ultrastrukturális nyomon követését hypothalamikus axonokban a posztszinaptikus elem egyidejű kémiai azonosításával (5).

11. Beállítottuk a szelet elektrofiziológiai módszert és a retrográd endokannabinoid szignalizáció *in vitro* nyomon követését és mérését hypothalamikus mintán (2).

12. Tanulmányoztuk a CB1 antagonisták kezelés eltérő különböző központi és perifériás idegrendszeri hatásait (3).

13. LHRH sejt modellben (GT1-7) tanulmányoztuk a gén expresszió ösztrogén függőségét és időbeli profilját (7).

14. Új glutamáterg neuron rendszereket azonosítottunk a hypothalamus területén (1).

15. Számítógépes matematikai modellt fejlesztettünk az LHRH sejt működés és annak néhány meghatározó élettani paraméterének modellezésére (11, 23).

16. Azonosítottuk az akut ösztadiol kezelés biomarkereit az idegszövetben (15).

17. Hypophyseotroph és nem-hypophyseotroph TRH idegsejt projekciók új hypothalamikus cél struktúráinak azonosítása (8,9,14).

18. Igazoltuk az LHRH idegsejtek működését befolyásoló, az elülső periventriculáris hypothalamikus mag területén (AVPV) előforduló, kisspeptint szintetizáló idegsejtek suprachiasmaticus mag eredetű idegi bemeneteinek vasopressin tartalmú komponenseit (10).

19. A paraventriculáris idegmag hypophyseotroph idegsejt populációinak vizsgálata során kimutattuk, hogy azok szerveződése, valamint a parvi- és magnocelluláris rendszerek magon belüli elrendeződése egérben jelentősen eltér a patkányban leírtaktól (6).

20. Feltártuk a krónikus ösztadiol szubsztitúció által szabályozott gén csoportokat középkorú, petefészek irtott, nőtény patkányok frontális agykérgében. Eredményeink a dopaminerg és peptiderg neurotranszmissziós folyamatok, valamint az immunválasz kialakításában résztvevő mechanizmusok érintettségére utalnak az agykéregben (**16,18**).

III. Az eredményeket megjelenítő közlemények jegyzéke

1. Hrabovszky E, Liposits Z: Novel aspects of glutamatergic signalling in the neuroendocrine system, *J NEUROENDOCRINOL* 20:(6)743-751, 2008

IF: 3,252

2. Kola B, Farkas I, Christ-Crain M, Wittmann G, Loll F, Amin F, Harvey-White J, Liposits Z, Kunos G, Grossman AB, Fekete C, Korbonits M: The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system, *PLOS ONE* 3: (3)e1797, 2008

IF: 4,411

3. Nogueiras R, Veyrat-Durebex C, Suchanek PM, Klein M, Tschop J, Caldwell C, Woods SC, Wittmann G, Watanabe M, Liposits Z, Fekete C, Reizes O, Rohner-Jeanrenaud F, Tschop MH: Peripheral, but not central, CB1 antagonism provides food intake independent metabolic benefits in diet-induced obese rats, *DIABETES* 57: (11) 2977-2991, 2008

IF: 8,398

4. Turi GF, Liposits Z, Hrabovszky E: Cholinergic afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons of the rat, *NEUROCHEM INT* 52: 723-728, 2008

IF: 3,228

5. Deli L, Wittmann G, Kalló I, Lechan RM, Watanabe M, Liposits Z, Fekete C.: Type 1 cannabinoid receptor-containing axons innervate hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons., *ENDOCRINOLOGY*, 150(1):98-103, 2009

IF: 4,993

6. Kadar A, Wittmann G, Liposits Z, Fekete C: Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining, *J NEUROSCI METHODS* 184:(1)115-118, 2009

IF: 2,295

7. Varju P, Chang KC, Hrabovszky E, Merchenthaler I, Liposits Z.: Temporal profile of estrogen-dependent gene expression in LHRH-producing GT1-7 cells., *NEUROCHEM INT.* 54(2):119-34., 2009

IF: 3,541

8. Wittmann G, Fuzesi T, Liposits Z, Lechan RM, Fekete C: Distribution and axonal projections of neurons co-expressing thyrotropin-releasing hormone and urocortin 3 in the rat brain,

J COMP NEUROL 517:(6)825-840, 2009

IF: 3,718

9. Wittmann G, Fuzesi T, Singru PS, Liposits Z, Lechan RM, Fekete C: Efferent projections of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons residing in the anterior parvocellular subdivision of the hypothalamic paraventricular nucleus, J COMP NEUROL 515:(3)313-330, 2009

IF: 3,718

10. B. Vida, L. Deli, E. Hrabovszky, T. Kalamatianos, A. Caraty, C. W. Coen, Z. Liposits and I. Kallo: Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurones innervating kisspeptin neurones in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen, JOURNAL OF NEUROENDOCRINOLOGY 22, 1032–1039, 2010

IF: 4,650

11. Csercsik D, Farkas I, Szederkenyi G, Hrabovszky E, Liposits Z, Hangos KM: Hodgkin-Huxley type modelling and parameter estimation of GnRH neurons, Biosystems 100 198–207, 2010

IF: 1,478

12. Hrabovszky E, Cciofi P, Vida B, Horvath MC, Keller E, Caraty A, Bloom GR, Ghatei MA, Dhillo WS, Liposits Z, Kallo I: The kisspeptin system of the human hypothalamus. Sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons,

EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE, 31, 1984–1998, 2010

IF: 3,658

13. Imre Farkas, Imre Kalló , Levente Deli, Barbara Vida, Erik Hrabovszky, Csaba Fekete, Suzanne M. Moenter, Masahiko Watanabe, and Zsolt Liposits: Retrograde Endocannabinoid Signaling Reduces GABAergic Synaptic Transmission to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons,

ENDOCRINOLOGY Vol. 151, 12, 5818-5829, 2010

IF: 4,993

14. Kadar, Andrea; Sanchez, Edith; Wittmann, Gabor; Singru, Praful; Fuzesi, Tamas; Marsili, Alessandro; Larsen, Reed; Liposits, Zsolt; Lechan, Ronald; Fekete, Csaba: Distribution of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH)-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the mouse,

J COMP NEUROL. 518(19):3948-61, 2010

IF: 3,774

15. Miklós Sárvári, Erik Hrabovszky, Imre Kalló, Orsolya Galamb, Norbert Solymosi, István Likó, Béla Molnár, Károly Tihanyi, Zsolt Liposits: Estradiol replacement alters expression of genes related to neurotransmission and immune surveillance in the frontal cortex of middle-aged, ovariectomized rats.

ENDOCRINOLOGY, 151, 3847-3862, 2010

IF: 4,993

16. Sarvari M, Hrabovszky E, Kallo I, Galamb O, Solymosi N, Liko I, Molnar B, Tihanyi K, Szombathelyi Z, Liposits Z: Gene expression profiling identifies key estradiol targets in the frontal cortex of the rat,

ENDOCRINOLOGY 151: (3)1161-1176, 2010

IF: 4,993

17. C.S. MOLNÁR, I. KALLÓ, Z. LIPOSITS, E. HRABOVSKY: Estradiol downregulates RF-Amide Related Peptide (RFRP) expression in the mouse hypothalamus, ENDOCRINOLOGY, Vol. 152 (4): 1684-1690, 2011

IF: 4,993

18. Sarvari M, Hrabovszky E, Kallo I, Solymosi N, Toth K, Liko I, Szeles J, Maho S, Molnar B, Liposits Z. Estrogens regulate neuroinflammatory genes via estrogen receptors alpha and beta in the frontal cortex of middle-aged female rats.

JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION 8:(1) 82. 2011

IF: 5,785

19. Hrabovszky E, Molnar CS, Sipos MT, Vida B, Ciofi P, Borsay BA, Sarkadi L, Herczeg L, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillo WS, Kallo I, Liposits Z Sexual dimorphism of kisspeptin and neurokinin B immunoreactive neurons in the infundibular nucleus of aged men and women.

FRONTIERS IN ENDOCRINOLOGY 2: p. 80. p. 15, 2011

IF: -

20. Kallo I, Vida B, Deli L, Molnar CS, Hrabovszky E, Caraty A, Ciofi P, Coen CW, Liposits Z Co-localisation of kisspeptin with galanin or neurokinin B in afferents to mouse GnRH neurones.

JOURNAL OF NEUROENDOCRINOLOGY 24:(3),464-476, 2012

IF: 4,65

21. Hrabovszky E, Wittmann G, Kallo I, Fuzesi T, Fekete C, Liposits Z: Distribution of type 1 cannabinoid receptor expressing neurons in the septal-hypothalamic region of the mouse. Colocalization with GABAergic and glutamatergic markers.

JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY 520:(5),1005-1020, 2012

IF: 3,774

22. Farkas I, Sarvari M, Aller M, Okada N, Okada H, Liko I, Liposits Z Estrogen receptor alpha and beta differentially mediate C5aR agonist evoked Ca²⁺-influx in neurons through L-type voltage-gated Ca²⁺ channels.

NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL, 2012, (in press)

IF: 3,601

23. Csercsik D, Farkas I, Hrabovszky E, Liposits Z A simple integrative electrophysiological model of bursting GnRH neurons.

JOURNAL OF COMPUTATIONAL NEUROSCIENCE 32:(1) pp. 119-136. (2012)

IF: 2,325

24. Hrabovszky E, Molnár Cs, Nagy R, Vida B, Borsay B, Rácz K, Herczeg L, Watanabe M, Kalló, Liposits Z : Glutamatergic and GABA-ergic innervation of human gonadotropin releasing hormone-I neurons.

ENDOCRINOLOGY (2012) in press

IF: 4,993

IV. Az elért eredmények (2008-2012) scientometriai összegzése

Közlemények száma	24
Összesített impakt érték	96,214
Összes idézet száma	201
Független idézetek száma	155

V. Az egyes munkacsomagokban elvégzett munka és az eredmények bemutatása

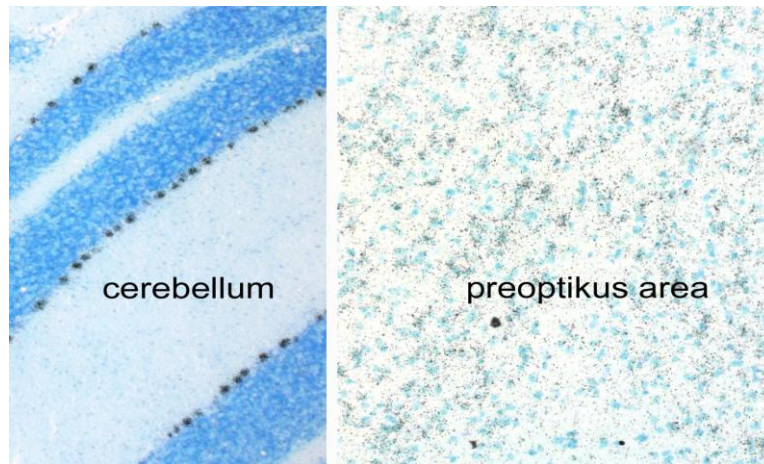
Munkacsomag száma. 1

Feladat/cél megnevezése. DAGL és FAAH próbák elkészítése és tesztelése *in situ* hibridizációban.

Elvégzett munka és eredmények bemutatása. Az egér FAAH cDNS 737 bp hosszúságú szakaszát egér hypothalamikus cDNS könyvtárból, PCR segítségével amplifikáltuk, majd azt a PGemT klónozó kit (Promega) használatával E.coli kompetens sejtbe juttattuk. A transzformációt követően, a felszaporított plazmidot a Qiagen MaxiPrep segítségével izoláltuk, SallI restrikciós enzimmal felnyitottuk, majd ³⁵S-UTP jelenlétében, T7 RNS polimerázzal antiszensz próbává árttuk. A DAGL- α mRNS kimutatásához egy 1169 bp hosszúságú cDNS templátot használtunk Dr. Katona István (MTA-KOKI) laboratóriumából. A FAAH cDNS-hez hasonlóan, ezt is E.coli kompetens sejtben szaporítottuk, a Qiagen MaxiPrep alkalmazásával izoláltuk, BamHI restrikciós enzimmal linearizáltuk, majd - ³⁵S-UTP jelenlétében - antiszensz RNS próbává írtuk át. A korábban általunk gyártott egér LHRH templátról nem-izotópos próbát írtunk át digoxigenin-UTP jelenlétében. Fenti próbáinkat izotópos és nem-izotópos hibridizációs módszerrel teszteltük.

A teszt hibridizálások eredménye megmutatta, hogy a digoxigeninnel megjelölt LHRH próba alkalmas volt a preoptikus terület LHRH idegsejtjeinek szelektív és érzékeny megjelenítésére.

A DAGL- α próbával több agyi régióban, így a cerebellum Purkinje sejtjeiben és a preoptikus terület számos idegsejtjében kaptunk autoradiográfias jelet. Bár a FAAH templát bázissorrendjét nukleinsav szekvenálással meg is erősítettük, a cDNS-ről ártított izotópos RNS próba használatával egy-sejt szintű jel nem volt kimutatható.

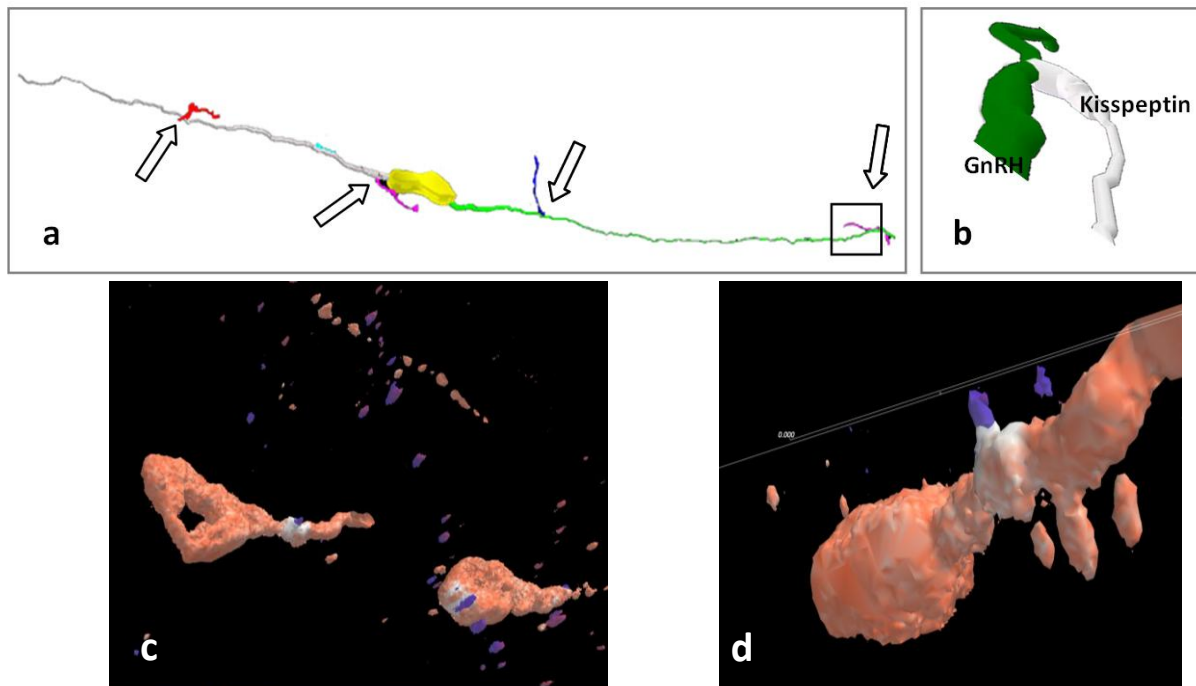


DAGL- α mRNS-t expresszáló neuronok a cerebellumban (Purkinje sejtek) és a preoptikus területen.

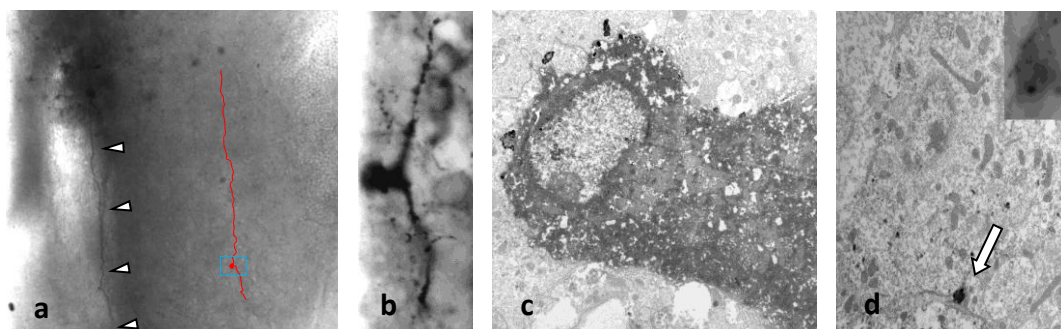
Munkacsomag száma. 2

Feladat/cél megnevezése. Módszertan meghonosítása LHRH idegsejtek teljes nyúlványrendszerének kimutatására sejt feltöltéssel.

Elvégzett munka és eredmények bemutatása. LHRH promotor vezérlése alatt zöld fluorescens fehérjét expresszáló idegsejtek membránpotenciálját és tüzelési aktivitását mértük whole cell, illetve loose patch módszerrel. A mérő pipettába biocytint tettünk, amit a mérés során illetve a mérést követően a sejtbe juttattunk. A mérést és sejtfeltöltést követően az agyszeletet 4% PFA oldatban fixáltuk egy éjszakán át, majd a biocytint avidinhez kötött peroxidázzal (reakciója révén nikkel-diaminobenzidinnel) vagy avidinhez kötött fluorescens molekulával mutattuk ki. A festési eljárást követően az LHRH idegsejtek teljes nyúlvány rendszere kirajzolódik, sőt többes jelölés esetén, a sejtek más neuropeptid/neurotranszmitter tartalma, illetve idegi kapcsolatrendszere is kimutatható. A feltöltött sejteket és afferenseit fluorescens markerek használatával konfokális mikroszkópban, míg elektronenz markerek segítségével elektronmikroszkópban vizsgáltuk.



LHRH idegsejtek dendritfájának és axonjának konfokális mikroszkópos vizsgálata. A sejtek nyúlványrendszerét NeuroLucida program segítségével rekonstruáltuk (a), az afferensek kapcsolódási helyét a dendritnyúlványokon megjelöltük (nyílhegyek) és kimértük (a és b), majd 3D-ben rekonstruáltuk (c és d). A módszer segítségével meghatároztuk a kisszeptin afferensek számát, és az LHRH sejteken elfoglalt pozícióját.



Az elektronmikroszkópos vizsgálatok előkészítéseképpen a feltöltött sejteket nickel-diaminobenzidinnel jelöltük. Az (a) kép egy szeletben feltöltött és megfestett LHRH sejt (nyílhegyek) képét mutatja. A képen látható a sejt rajzmásolata is, amelyen egy kis keret jelzi azt a részt, amelyről fény- (b) illetve elektronmikroszkópos felvétel is készült (c). A szeletben a feltöltött sejt nyúlványa (nyíl) is azonosítható volt (d).

Munkacsomag száma. 3

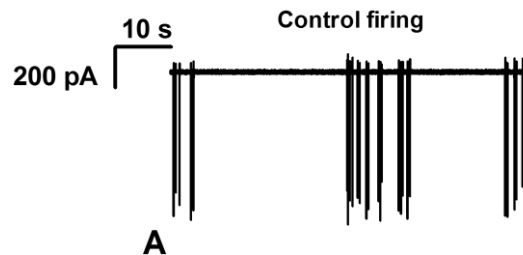
Feladat/cél megnevezése. Szövet processzálás, immuncitokémia és *in situ* hibridizáció optimális paramétereinek kidolgozása genetikailag módosított LHRH neuronok afferenseinek vizsgálatára.

Elvégzett munka és eredmények bemutatása. Dr. Linda Buck rendelkezésünkre bocsájtotta a laboratóriumában előállított azon transzgenikus egértörzset (Cell, 2005,123(4):683-95), melyben az LHRH promotor irányítása alatt a retrográd transz-szinaptikus jelölőanyag, barley lectin (BL) termelődik. Az egértörzs steril rederiválását majd homozygota formában történő elszaporítását követően, konzultáltunk az egér előállítását közvetlenül elvégző Ulrich Boehm-mel és megkezdtük az optimális kimutatási módszer beállítását az LHRH idegsejteket beidegző, BL-t retrográd úton felvevő afferens neuronok immunhisztokémiai kimutatására. Ehhez a Sigma cég wheat germ agglutinin antitestjét alkalmaztuk, az eredeti cikkben javasoltaknak megfelelően. Saját laboratóriumi körülményeink között ezzel a kimutatási módszerrel nem sikerült megismételni az eredeti cikkben leírtakat. Mind az LHRH idegsejtekben, mind a visszajelölt sejtekben az immunfestés erőssége a háttértől alig tért el. A negatív eredmények egyik lehetséges oka a transzgenikus egértörzs tenyésztése közben bekövetkező DNS metiláció lehetett. Megjegyzendő az is, hogy az eredeti Cell közleményt nem követte számos egyéb publikáció ezzel az állatmodellel. Így az sem kizárt, hogy olyan objektív korlátok, mint az alacsony szintű transzgen expresszió is okozhatta negatív észleleteinket. A tetemes genotipizálási és tenyésztési költségek miatt a GABAerg és glutamáterg afferensek valószínű eredetének azonosítására a továbbiakban más, alternatív megközelítéseket, immuncitokémiai és *in situ* hibridizációs módszereket használtunk.

Munkacsomag száma. 4

Feladat/cél megnevezése. Az LHRH neuronok akciós potenciál paramétereinek mérése kontroll kísérletekben.

Elvégzett munka és eredmények bemutatása. Loose-patch clamp mérésekkel vizsgáltuk az egér akut agyszövetben található LHRH-GFP neuronok tüzelését. A méréseket voltage-clamp üzemmódban végeztük, a vizsgált neuronok tüzelését jellemezve. Ennek során megállapítottuk, hogy kontrol körülmények között az LHRH neuronok jellemző tüzelési mintázata burst-ös jelleget mutat. A burst-ökben 4.2 ± 0.2 volt az akciós áramok átlagos száma, és a burst-ök között eltelt átlagos idő 34.0 ± 11.2 s-nak adódott. A burst-ökön belül az egyes akciós áramok között eltelt átlagos idő 0.2 ± 0.03 s, a teljes mérési időre (4 min) vonatkozó tüzelési frekvencia 0.6 ± 0.07 Hz volt.

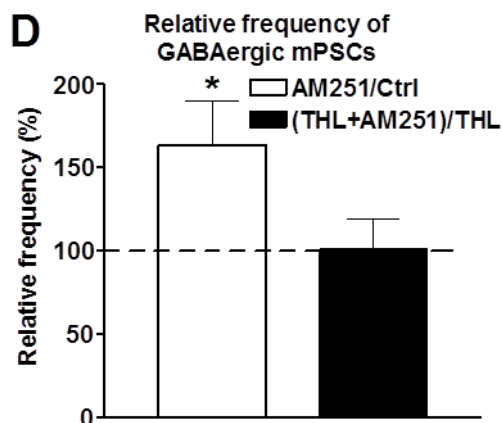


Az LHRH neuron tüzelésére a burst-jelleg a jellemző.

Munkacsomag száma. 5

Feladat/cél megnevezése. Kettős *in situ* hibridizációs vizsgálatok elvégzése DAGL kimutatására LHRH sejtekben.

Elvégzett munka és eredmények bemutatása. A DAGL- α mRNS expresszió LHRH idegsejtekben kettős *in situ* hibridizációs megközelítéssel nem volt látható. Ezért a továbbiakban a DAGL- α jelenlétét és az LHRH idegsejtek endokannabinoid termelését érzékenyebbnek gondolt funkcionális vizsgálattal, elektrofiziológiai megközelítéssel is felvetettük. Ehhez azt az eredményünket használtuk (lásd 12. munkacsomag), mely szerint a CB1 antagonistá AM251 megnövelte a GABAerg mPSCk frekvenciáját az LHRH neuronokban. Ez azt jelezte, hogy tónusos endokannabinoid felszabadulás történik. Farkas és mtsai (Endocrinology 2010) cikkében intracelluláris elektródban alkalmazott tetrahydrolipstatinnal sikeresen felfüggesztettük az LHRH idegsejtek endogén DAGL enzimaktivitását. A 2-AG termelés blokkolásával a GABAerg mPSCk frekvenciájának AM251 általi fokozása kivédhető volt. A kísérlettel igazoltuk, hogy az LHRH idegsejtek által termelt endogén kannabinoidok felelősek a GABAerg bemeneteken érvényesülő, AM251-gyel felfüggeszthető tónusos gátló hatásért. A kettős *in situ* hibridizációs módszerrel szemben, a fenti funkcionális vizsgálat - nagyobb érzékenységének köszönhetően - igazolni tudta, hogy az LHRH idegsejtek DAGL enzimet termelnek.



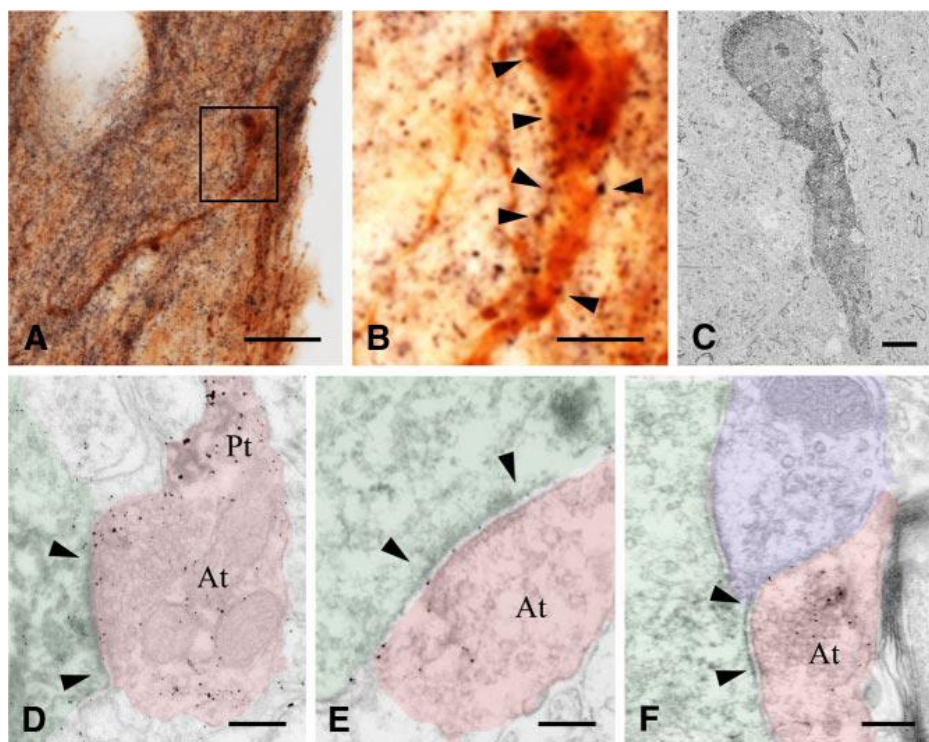
A CB1 inverz agonista AM251 alkalmazása megnöveli az LHRH idegsejtekből elvezethető miniatűr posztzinaptikus áramok frekvenciáját. Az AM251 hatása a DAGL gátló tetrahydropipstatin alkalmazásával kivédhető.

Munkacsomag száma. 6

Feladat/cél megnevezése. CB1 immunreaktivitás jelenlétének vizsgálata LHRH idegsejtek afferenseiben.

Elvégzett munka és eredmények bemutatása. CB1 pozitív szimmetrikus és aszimmetrikus szinapszisok százalékos arányának meghatározását terveztük ovariectomizált és ovariectomizált ösztrogén-kezelt állatok LHRH idegsejtjein. Az eredeti tervek szerint ezeket a méréseket már feltöltött sejteken kellett volna végeznünk, de mivel sokáig nem sikerült a sejtfeltöltést megoldani és a szelet finomszerkezeti jegyeit javítani, ezért ezek a vizsgálatok elmaradtak.

Eredményként a hím egérben végzett és közölt ultrastrukturális adataink állnak rendelkezésre.

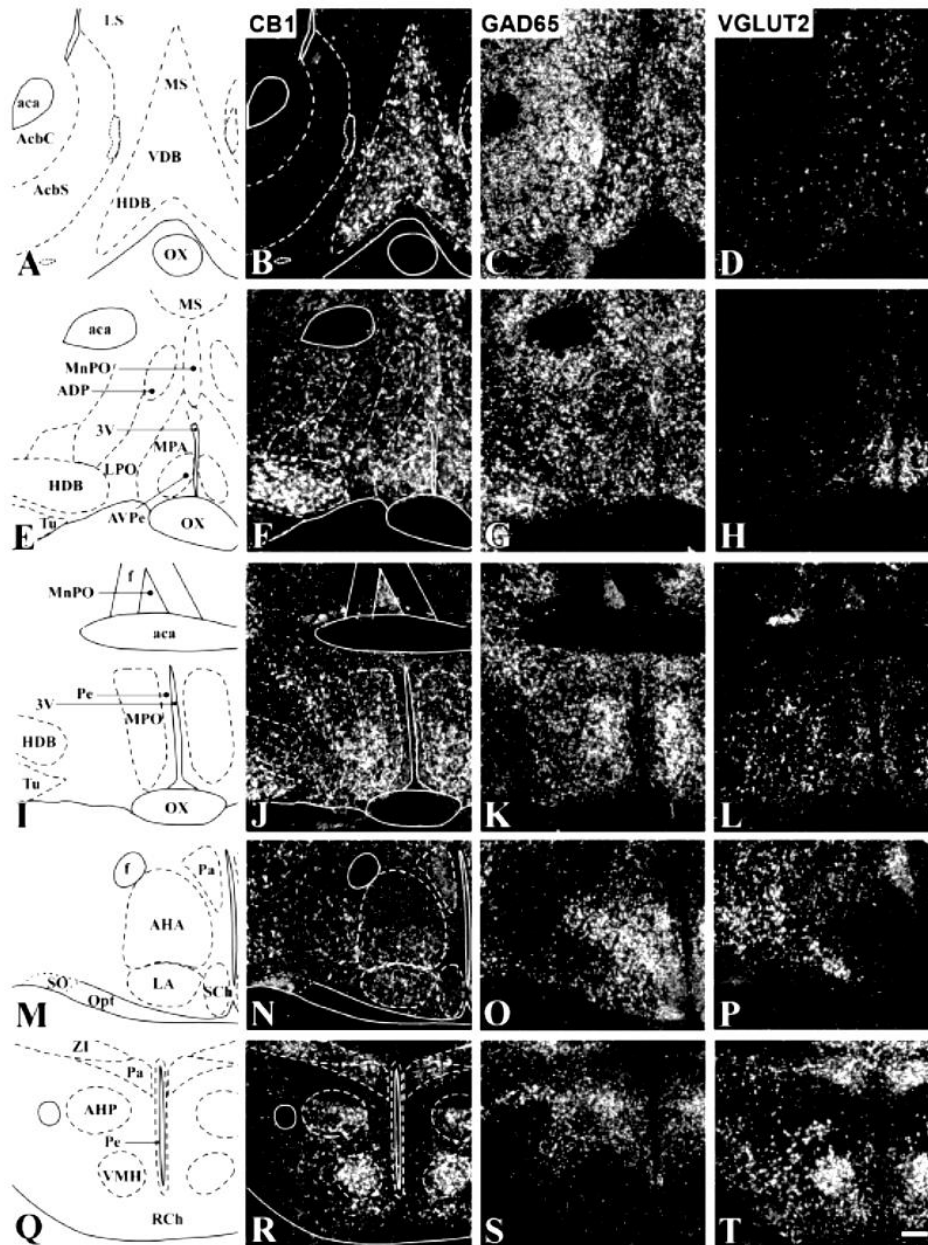


LHRH idegsejteken végződő idegrostok CB1 tartalmának fény- (A,B) és elektronmikroszkópos kimutatása (C-F) egérben. Az endokannabinoid receptor serkentő és gátló idegvégződésekben egyaránt fellelhető (D-F).

Munkacsomag száma. 7

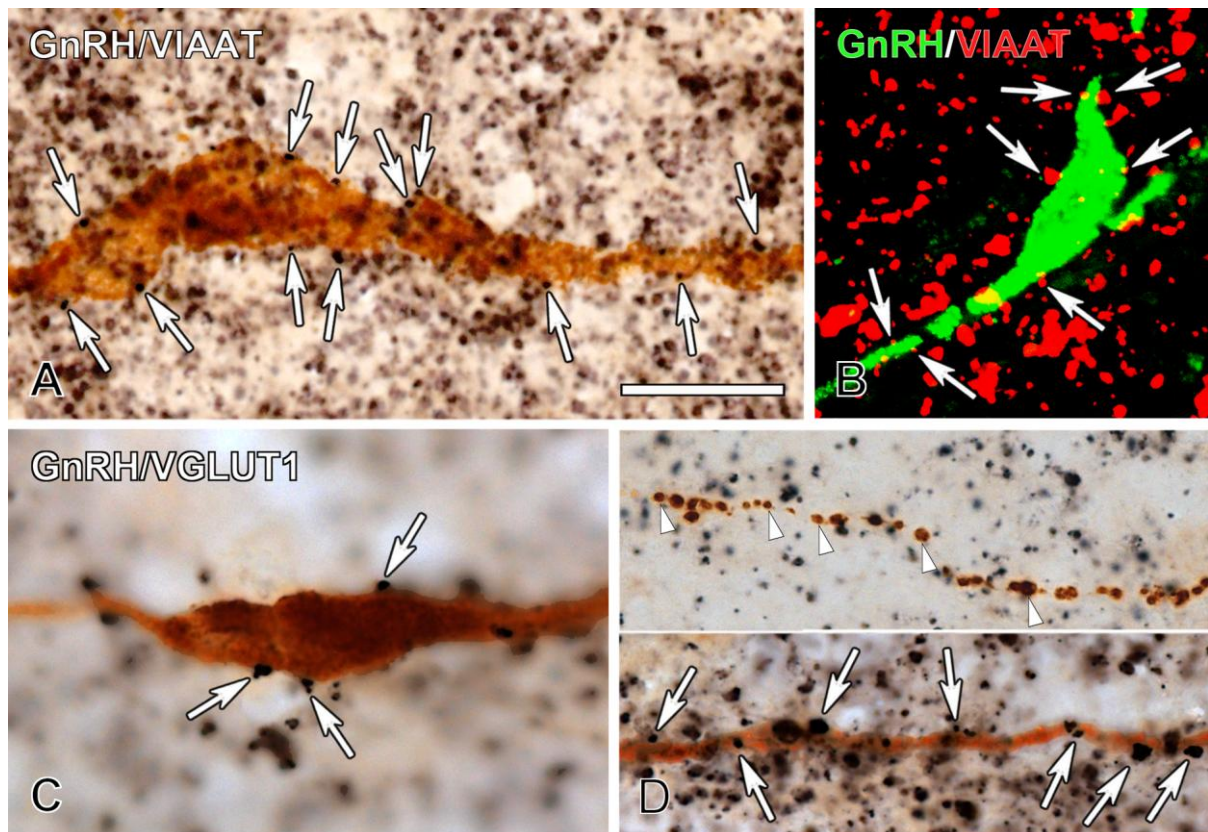
Feladat/cél megnevezése. LHRH neuronok GABAerg és glutamáterg afferensei eredetének feltérképezése.

Elvégzett munka és eredmények bemutatása. Hiánypótló munkaként, teljes térképet készítettünk el az egér hypothalamus GABAerg és glutamáterg idegsejtjeiről, GAD65 és VGLUT2 marker enzim mRNS-ek *in situ* hibridizációs kimutatását használva. Bár a barley lektin detektálásán alapuló kolokalizációs vizsgálatok a transzgenikus modell korlátozott használhatósága miatt meghiúsultak, korábbi irodalmi adatok fényében a GABAerg és glutamáterg neuronok *in situ* hibridizációs térképe számos lehetséges afferens rendszert azonosított, melyek szerepet játszhatnak az LHRH idegsejtek beidegzésében. Az afferensek egyik fontos forrása az anteroventrális periventrikuláris mag, melyben mind GABAerg mind glutamáterg neuronok szép számban láthatóak voltak. Ez a terület az LHRH neuronokat elérő pozitív ösztrogén visszacsatolás régóta gyanított, fő hatóhelye. A GABAerg és glutamáterg neuronok kimutatásával párhuzamosan, elvégeztük szomszédos metszeteken a kannabinoid receptort (CB1 mRNS-t) tartalmazó idegsejtek feltérképezését is. A három térkép összevetése betekintést nyújtott az LHRH idegsejtek azon feltételezhető afferens rendszereibe, melyek aminosav neurotranszmittert tartalmaznak, intrahypothalamikus eredetűek, és neurotranszmitter felszabadulásukat az endokannabinoidok gátló hatása modulálja.



CBI, GAD65 és VGLUT2 mRNS-ek párhuzamos feltérképezése egér hypothalamusban izotópos in situ hibridizációval.

Egy további neuroanatómiai munkában az emberi LHRH idegsejtek GABAerg és glutamaterg afferens kapcsolatait jellemeztük. Kvalitatív vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a glutamaterg idegsejtek VGLUT1 és VGLUT2 alcsoportja egyaránt hozzájárul az LHRH idegsejtek innervációjához. A sejttesteken GABAerg bemenetek dominálnak, míg a dendriteken végződő VGLUT1 és VGLUT2 fenotípusú glutamaterg kontaktusok együttes száma meghaladja a GABAerg dendritikus bemenetek számát.



Humán LHRH idegsejtek gazdag GABAerg (A,B) és glutamáterg (C,D) beidegzése.

Munkacsomag száma. 8

Feladat/cél megnevezése. Az LHRH neuronok akciós potenciál paramétereinek mérése kannabinoid jelenlétében és az eredmények statisztikai kiértékelése.

Elvégzett munka és eredmények bemutatása. A 4. munkacsomaghoz hasonlóan itt is loose-patch clamp mérésekkel vizsgáltuk az akut agyszeletben található LHRH-GFP neuronok tüzelését, voltage-clamp üzemmódban, és a tüzelést az akciós áramokkal jellemeztük. Ennek során megállapítottuk, hogy az LHRH neuronok jellemző tüzelési mintázata a CB1 agonista (WIN55,212, röviden WIN) jelenlétében is a kontroll sejtekhez hasonlóan burst-ös jelleget mutat, noha azok paramétereit változtak. Az egyes burst-ökben mért akciós áramok átlagos száma 8 ± 2.5 %-kal csökkent, míg a burst-ök között eltelt átlagos idő 47 ± 11 %-kal megnőtt. A teljes mérési időre vonatkozó tüzelési frekvencia ennek megfelelően alacsonyabbnak bizonyult (0.3 ± 0.08 Hz) a kontrollhoz képest. A burst-ökön belül az egyes akciós áramok között eltelt átlagos idő azonban nem változott. A WIN által előidézett változások akkor is megjelentek, ha ionotróp glutamát receptor blokkoló volt jelen a kísérletben, míg GABA-A receptor blokkoló alkalmazása esetén eltűnt a WIN hatása. Ez arra utal, hogy a WIN a GABA-A receptor szignalizációján keresztül fejt ki a hatását.



Az LHRH neuronok tüzelési frekvenciáját csökkenti a CB1 agonista.

Munkacsomag száma. 9

Feladat/cél megnevezése. Kettős *in situ* hibridizációs vizsgálatok elvégzése FAAH kimutatására LHRH sejtben.

Elvégzett munka és eredmények bemutatása. Az egér FAAH izotópos hibridizációs próba nem volt alkalmas a FAAH expresszió egy-sejt szintű kimutatására autoradiográfias emulzió. A hibridizációs megközelítés elégtelen érzékenysége miatt az LHRH idegsejtekben feltételezett FAAH expresszió meglétét nem tudtuk igazolni.

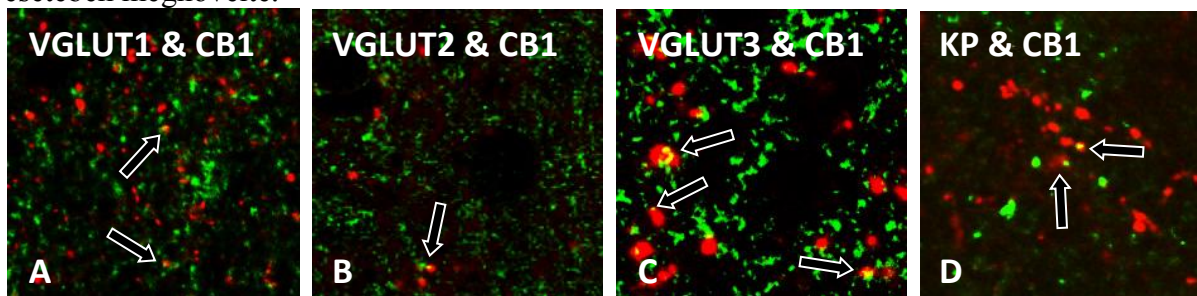
Munkacsomag száma. 10

Feladat/cél megnevezése. CB1 immunreaktivitás jelenlétének vizsgálata glutamát-, GABA és neuropeptid tartalmú idegrostokban a preoptikus area területén.

Elvégzett munka és eredmények bemutatása. Ultrastrukturális szinten LHRH idegsejtekkel szinaptizáló CB1 immunreaktív axonterminálisokat figyeltünk meg, a kapcsolatok között szimmetrikus és aszimmetrikus típusúak egyaránt előfordultak. E morfológia kategóriák az esetek nagy részében gátló, illetve serkentő jelátvitelre utalnak, azaz arra, hogy a CB1 receptor az LHRH idegsejtek GABAerg és glutámérg afferenseiben egyaránt előfordul.

Ezért zöld és piros fluorokrómok használatával immuncitokémiai kettős jelöléseket végeztünk a CB1 és a vezikuláris neurotransmitter transzporterek, illetve neuropeptidok együttes kimutatására. A megfelelő immuncitokémia jelerősség elérése mellett, CB1 immunreaktivitás volt megfigyelhető a VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3 és kisspeptin axon varikozitások egy részében. Az immunreaktivást jelző profilok átfedésbe viszonylag ritkán kerültek, melynek magyarázatául a transzporter fehérjék, neuropeptidok illetve a CB1 receptor axonon belüli eltérő megoszlása állhat.

A CB1 immunreaktivitás beágyazás előtti immuncitokémiai módszer alkalmazása esetén ugyanis jellemző módon az axon preterminális szakaszában dúsul, míg a vezikulák (és a hozzájuk asszociált transzporterek) nagyobb számban elsősorban a terminálisban és a preszinaptikus membrán közelében található. A transzportereket tartalmazó kis vezikulákkal ellentétben a peptideket tartalmazó nagy, sűrű bennéki vezikulák a pre-terminális szakaszhoz közelebb helyezkednek el, ami a kollokalizáció kimutathatóságát a kisspeptin idegrostok esetében megnövelte.

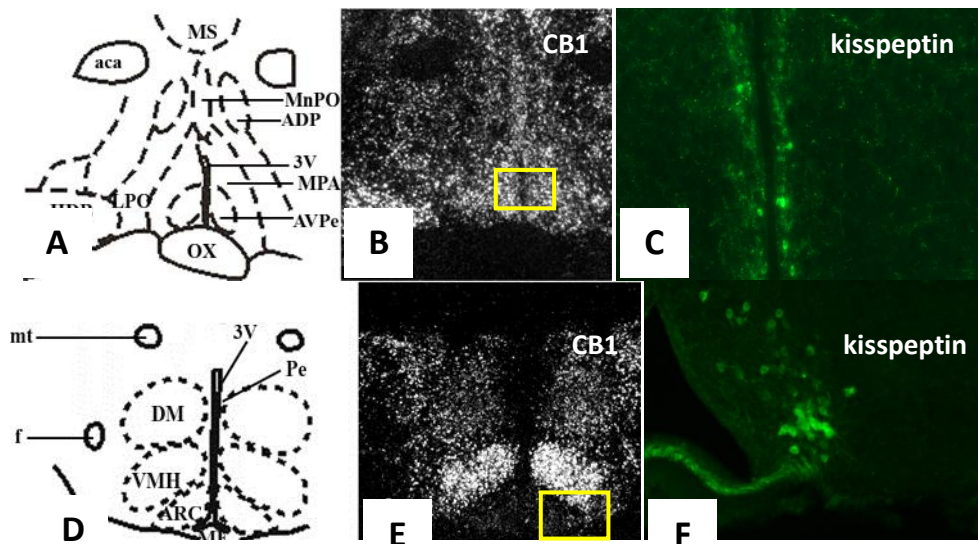


CB1 (zöld) immuncitokémiai kimutatása VGLUT1-3 és kisspeptin tartalmú (piros) idegrostokban (nyilak).

Munkacsomag száma. 11

Feladat/cél megnevezése. LHRH neuronok CB1 tartalmú afferens neuron rendszereinek feltárása.

Elvégzett munka és eredmények bemutatása. Az LHRH idegsejtek afferenseinek kimutatására létrehozott transzgenikus állat riporter génje olyan idegsejtekben is expresszáldott, amelyek bizonyítottan, direkt módon nem állnak az LHRH sejtekkel kapcsolatban. Ezért olyan idegsejtek CB1-tartalmát vizsgáltunk, melyekről immun-elektronmikroszkópos kettős jelölés módszerrel bizonyítani tudtuk, hogy beidegzik az LHRH neuronokat (Kalló és mtsai, JNE, 2012). A kisspeptin sejtek kulcsszerepet játszanak az ösztrogén feedback közvetítésében, s az LHRH szekréció szabályozásában. A surge release kiváltásában a rostrális periventrikuláris preoptikus areában lévő sejtek vesznek részt, míg a pulzatilis szekréciót az arcuatus magban lévő idegsejtek szabályozzák. E régiókban a CB1 receptor mRNS-t is ki lehet mutatni, ami arra utal, hogy a KP sejtek is expresszállhatják e receptort. Ezt a feltételezést az is alátámasztja, hogy az LHRH idegsejtek KP afferenseiben CB1 immunreaktivitás mutatható ki.



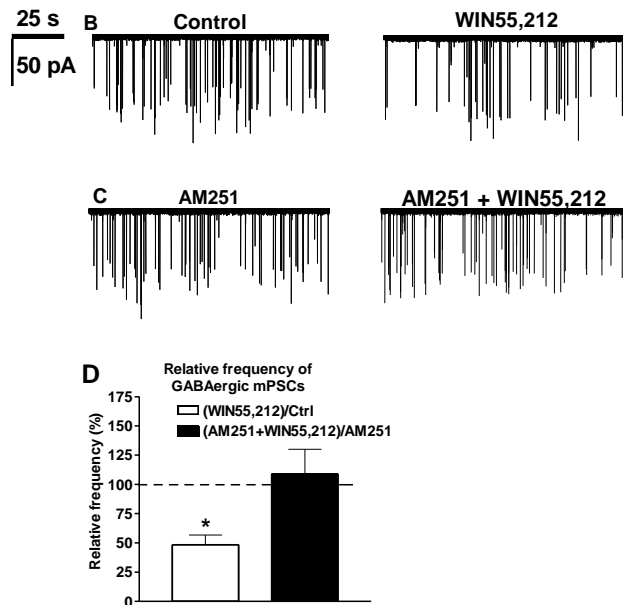
CB1 mRNS mutatható ki az anteroventrális periventrikuláris mag (A és B), valamint az arcuatus mag (D és E) idegsejtjeiben, azokban a régiókban, ahol a kisspeptin sejtek (C és F) is elhelyezkednek (B és E képen sárga kerettel jelölve).

Munkacsomag száma. 12

Feladat/cél megnevezése. Az LHRH neuronokon az EPSCk és IPSCk mérése kannabinoid hiányában, illetve jelenlétében.

Elvégzett munka és eredmények bemutatása. Whole cell patch clamp mérésekkel vizsgáltuk az akut agyszeletben található LHRH-GFP neuronokban a mini posztszinaptikus áramok paramétereit. Glutamát mediálta mEPSC-eket nem tudtunk mérni, mely annak tudható be, hogy ezeket az LHRH neuronokon csak speciális körülmények között lehet regisztrálni (Christian et al., Biol Reprod 2009/80/1128-1135). A GABA mediálta mini posztszinaptikus áramok (mPSCk) mérése során megállapítottuk, hogy WIN jelenlétében az mPSC frekvencia a kontrollhoz képest 52 ± 8 %-kal csökkent, miközben az amplitúdó nem változott. Mivel az irodalomból ismert, hogy a GABA serkentő hatású az LHRH neuronokon, ez az eredmény jól korrelál a tüzelési frekvenciának a 8. munkacsomagban leírt csökkenésével. A WIN hatását

blokkolni tudtuk a CB1 antagonistá AM251 alkalmazásával. További méréseink azt mutatták, hogy a kontrollhoz képest az AM251 önmagában is növelte a frekvenciát, ami arra utal, hogy az LHRH neuronokból spontán módon is történik endokannabinoid felszabadulás. Ezek, valamint a korábbi munkacsomagokban leírt endokannabinoid szignalizáció létét jelzik, amellyel az LHRH neuronok képesek befolyásolni az afferenseik terminálisaiból felszabaduló GABA mennyiségét és ez által szabályozni a saját tüzelési aktivitásukat.



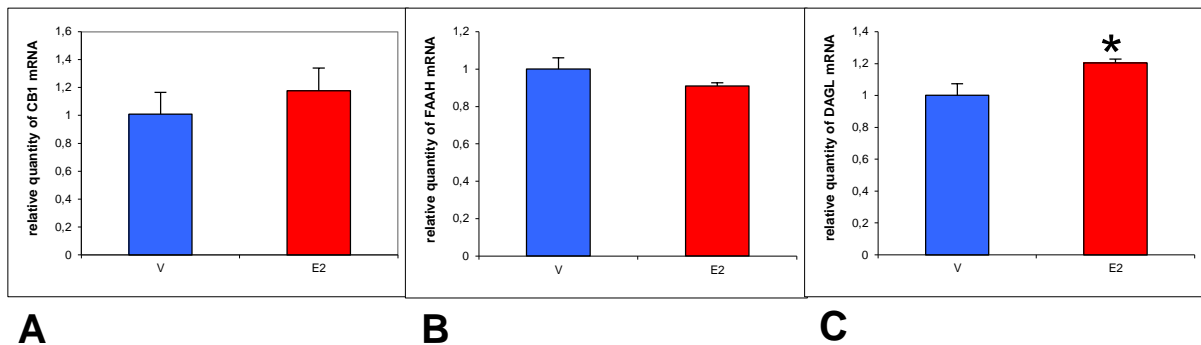
Az LHRH neuronok GABA mPSC frekvenciáját csökkenti a WIN, mely hatás kivédhető az AM251 alkalmazásával.

Munkacsomag száma. 13

Feladat/cél megnevezése. FAAH mRNS ösztrogén függőségének vizsgálata LHRH sejtben.

Elvégzett munka és eredmények bemutatása. Mivel az *in situ* hibridizációs megközelítés nem volt alkalmas az LHRH idegsejteken belüli FAAH expresszió vizsgálatára, a FAAH transzkripció feltételezett ösztrogén függésének igazolására kvantitatív PCR vizsgálatokat végeztünk az ösztrogén receptorokban különösen gazdag preoptikus területből kimetszett szövetmintákból. Ovariectomizált és ovariectomiát követően ösztradiollal szubsztituált egerek FAAH mRNS expresszióját hasonlítottuk össze. Hasonlóképpen vetettük fel az ösztrogén kezelés hatására DAGL- α és CB1 mRNS szintekben bekövetkező esetleges változásokat. A hormonpótlást egy hétig végeztük, bőr alá beültetett szilikon kapszulában 100 μ g/ml, napraforgóolajban oldott ösztradiolt alkalmazva. A mintákból RNS-t izoláltunk, reverz transzkripcióval cDNS-t írtunk vissza, majd valósídejű PCR használatával hasonlítottuk össze az ovariectomizált és ösztrogénnel kezelt csoportok expressziós szintjeit, ANOVA statisztikai próbát alkalmazva.

Eredményeink szerint ovariectomizált egerek és ösztradiollal szubsztituált egerek preoptikus területén a FAAH és a CB1 mRNS-ek szintje marginális változást mutatott, mely nem érte el a statisztikai szignifikanciát. Ezzel szemben, a DAGL- α kismérvű emelkedése ösztradiol hatására statisztikailag szignifikánsnak bizonyult. Azon további, publikált tanulmányainkban, melyekben a frontális agykérgi transzkriptom ösztrogén-függését vizsgálatuk, a kannabinoid rendszerrel összefüggő fenti gének nem mutattak változást, sem akut, sem krónikus paradigmában.

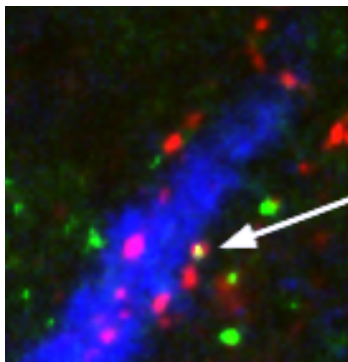


CB1 (A), FAAH (B) és DAGL-α (C) mRNS szintek alakulása vivőanyaggal (V) és ösztadiollal (E2) kezelt egerek preoptikus területén.

Munkacsomag száma. 14

Feladat/cél megnevezése. Hármás jelölés kidolgozása CB1 és neurotranszmitter/ neuropeptid immunreaktivitás együttes kimutatására LHRH idegsejtek afferenseiben.

Elvégzett munka és eredmények bemutatása. Különböző fluorokrómok használatával immuncitokémiai hármás jelöléseket végeztünk az LHRH (kék), CB1 (zöld) és a vezikuláris neurotranszmitter transzporterek vagy neuropeptidok (piros) együttes kimutatására. Az LHRH idegsejtekkel szoros kapcsolatban álló varikozitásokban kolokalizáció csak CB1 és kisspeptin vonatkozásában volt kimutatható, míg CB1, VGLUT1-3 illetve VIAAT esetében az immunreaktivást jelző profilok az afferensekben átfedésbe nem, vagy csak nagyon ritkán kerültek.



CB1 (zöld) immunreaktivitás megjelenése (nyíl) LHRH (kék) idegsejttel szoros kapcsolatban lévő kisspeptin (piros) axon varikozitásban. A kolokalizáció sárga színben tűnik fel.

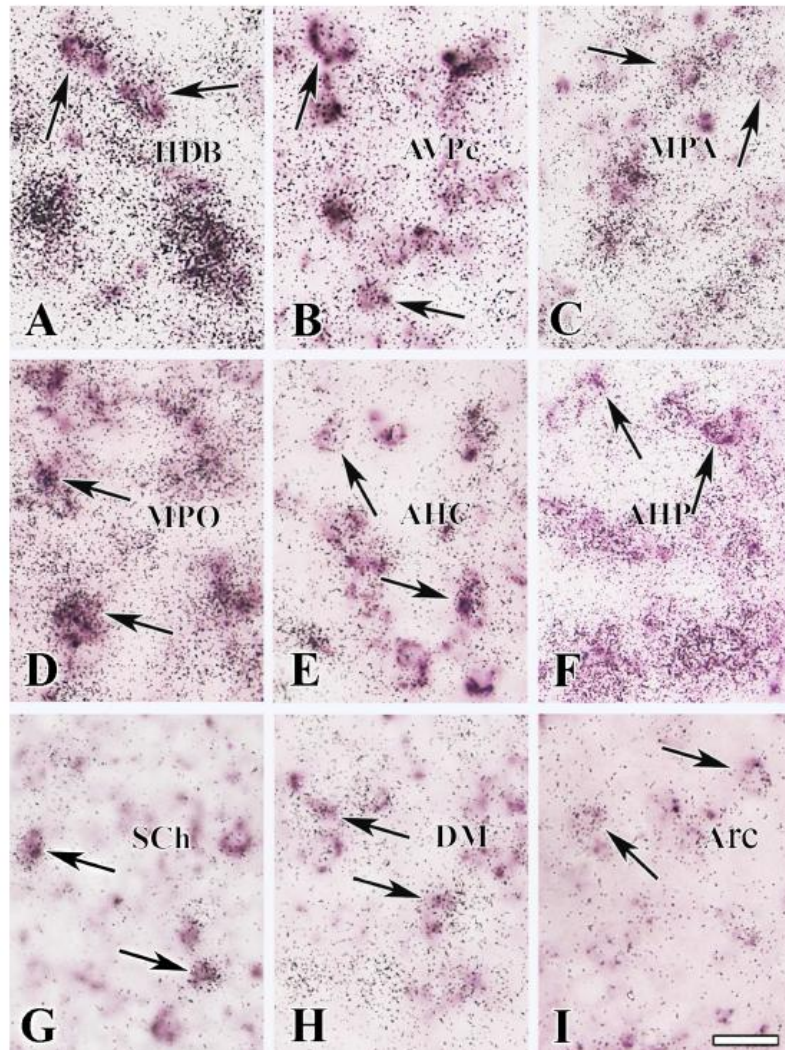
Munkacsomag száma. 15

Feladat/cél megnevezése.

Hármás-jelöléses vizsgálatok elvégzése LHRH neuronok CB1 mRNS tartalmú és egyúttal GABAerg vagy glutamaterg afferenseinek vizsgálatára.

Elvégzett munka és eredmények bemutatása. Azon vizsgálataink nem hozták meg a kívánt eredményt, melyekben az LHRH-barley lectin transzgenikus egértörzs használatával próbáltuk meg azonosítani az LHRH idegsejtek bemeneteit adó interneuronokat. A negatív eredmények lehetséges oka a transzgenikus egértörzs túl alacsony szintű barley lectin termelése vagy „transgene silencing” jelenség volt. Alternatív megközelítésként a GABAerg és glutamaterg afferenseket immuncitokémiai, immun-elektronmikroszkópos valamint *in situ* hibridizációs módszerekkel vizsgáltuk. A CB1, GAD65 és VGLUT2 mRNS-ek *in situ* hibridizációs térképeinek összevetésével azonosítottuk a preoptikus area és a hypothalamus főbb GAD65/CB1 és VGLUT2/CB1 expressziót mutató területeit. Kettős *in situ* hibridizációs vizsgálatokkal egy-sejt szinten is igazoltuk, hogy mindezen területeken GABA/CB1 ill. glutamát/CB1 kettős-fenotípusú egyedi neuronok fordulnak elő. Immun-elektronmikroszkópos tanulmányokban szinaptikus kapcsolatot tártunk fel CB1-immunreaktív idegrostok és LHRH-immunreaktív sejtestek valamint dendritek között. A szinapszisok egy része a GABAerg rendszerre jellemző szimmetrikus morfológiát mutatott. Elektrofiziológiai

vizsgálatsorozattal sikerült is igazolni, hogy a kannabinoidok hatását az LHRH neuronok felé főképp GABAerg idegsejtek közvetítik, GABA_A receptoron keresztül.



CBI (autoradiográfias jel) és GAD65 (lila hisztokémiai jel; BCIP/NBT festék) mRNS-eket együttesen expresszáló neuronok in situ hibridizációs megjelenítése az egér hypothalamusában.

Munkacsomag száma. 16

Feladat/cél megnevezése. Magas és alacsony ösztrogén koncentráció esetén mérjük az EPSCk és IPSCk jellemző paramétereit az LHRH neuronokon. CB1 antagonistá alkalmazásával vizsgáljuk az ösztrogén retrográd kannabinoid szignalizációban betöltött szerepét.

Elvégzett munka és eredmények bemutatása. Whole cell patch clamp mérésekkel kívántuk vizsgálni, hogy az ösztrogén az akut agyszletben található LHRH-GFP neuronokban hogyan befolyásolja a PSC-k paramétereit. A pályázati projekt indulása után azonban más kutatólaboratóriumból megjelent egy közlemény (Chu et al., J Neurosci 2009/29/5616-5627), amelyben leírták, hogy az LHRH neuronokban az ösztrogén képes módosítani a GABA PSC-eket. Az általuk használt modellben ovariektomizált állatokban vizsgálták, hogy hogyan hat a GABAerg neurotranszmisszióra az alacsony valamint a magas ösztrogén szint, és azt találták, hogy a PSC-k frekvenciája és amplitúdója is függ az ösztrogén koncentrációjától. Saját

kísérleteink ugyanakkor azt mutatták, hogy sem az endokannabinoidok receptorának (CB1), sem pedig az endokannabinoidok szintézisében illetve degradációjában szerepet játszó enzimeknek (DAGL illetve FAAH) az mRNA expresszióját nem, vagy csak marginálisan befolyásolta az ösztrogén szint. Ez arra utal, hogy noha a PSC-k paramétereit képes megváltoztatni az ösztrogén koncentráció magas illetve alacsony mivolta, ez nagy valószínűséggel nem az endokannabinoid szignalizáció révén történik.