

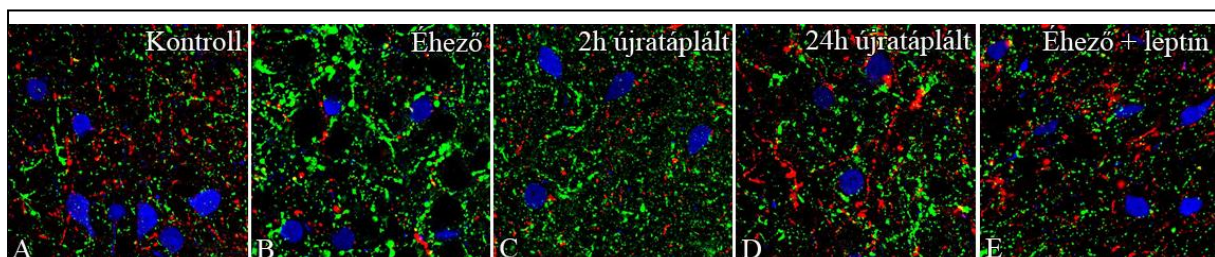
## 81845 számú OTKA pályázat zárójelentése

Dr. Frederic Flamant (Lyon) laboratóriumában Kádár Andrea előállított egér embrionális őssejteket, melyekben rekombináció segítségével a ROSA26 locusba illesztette be a ROSA26-PSD95-GFP konstrukciót. Az embrionális őssejteket alklónoztta és szelektálta. A szelektált klónokat hazahozta a laboratóriumunka és felnövesztette. A felnövesztett klónokból azonban nem sikerült kimutatnunk a targeting konstrukció megfelelő inzercióját. Kidolgoztunk egy új PCR alapú igen hatásos szelekciós eljárást a targeting konstrukció illeszkedésének jobb ellenőrzéséhez. Az eljárás segítségével tovább dolgoztunk embrionális őssejték genotípusának megváltoztatásán. A sikertelenség után Kádár Andrea ismételt kiutazott Dr. Frederic Flamant laboratóriumába, ahol előállított egy pozitív ROSA26-PSD95-GFP klónt. Az embrionális őssejt klón beültetésre került, azonban a megszületett founderok utódai nem termelték megfelelő módon a fúziós fehérjét Cre rekombinázt termelő egerekkel történt keresztezés után. Jelenleg az Intézetben nemrégiben beállított CRISPR rendszer felhasználásával kívánjuk folytatni a ROSA26-PSD95-GFP egerek előállítását, mely módszer nem igényli az embrionális őssejték módosítását. Az egerek előállításán a pályázat befejezését követően is dolgozunk.

Azért, hogy a vizsgálatainkban a hypothalamus paraventriculáris magjában elhelyezkedő hypophysiotrop TRH idegsejteket a nem hypophysiotrop TRH idegsejtektől elkülönülten tudjuk tanulmányozni, feltártuk az egér hypothalamus hypophysiotrop TRH idegsejtjeinek elhelyezkedését, ami nagymértékben eltér a korábban patkányban tapasztalt megoszlástól. E vizsgálati eredmények nagymértékben elősegítik, hogy a transzgenikus állatokon végzett kísérletekben valóban a hypothalamus-hypophysis-pajzsmirigy tengelyt irányító, hypophysiotrop TRH sejteket tudjuk tanulmányozni. Vizsgálati eredményeink rávilágítottak arra is, hogy az egér PVN szerkezete jelentősen eltér a mag patkányban leírt szerkezetétől. A

precízebb leírhatóság érdekében ezért új nomenklatúrát javasoltunk az egér PVN almagjainak elnevezésére.

Mivel a ROSA26-PSD95-GFP egerek nem készültek el, a TRH idegsejtek beidegzésének plasztikus változásának tanulmányozásához vizsgáltuk a TRH idegsejtek arcuatus idegmagból eredő AGRP- illetve  $\alpha$ -MSH tartalmú beidegzésének változását éhező és újratáplált állatokban. A vizsgálatokhoz a TRH-Cre egereinket kereszteztük ZEG indikátor egerekkel. A transzgenikus egerek használatára azért volt szükség, mert kolchicin kezelés nélkül csak igen kevés TRH idegsejt detektálható a PVN-ben, különösen éhező állatokban, ahol csökken a TRH termelés, viszont a kolchicin kezelés alapvetően befolyásolja az idegi folyamatokat, így a kezelés mellett nem lehetett volna vizsgálni a fiziológias változásokat. Kontroll és éhező egerek agyából készült metszeteken hármass immunfluoreszcens festést készítettünk, amit konfokális mikroszkópos analízist követően kvantitáltunk. Eredményeink szerint a TRH sejtek felszínén az AGRP és  $\alpha$ -MSH tartalmú varikozitások aránya megduplázódott éhező állatokban.



**Ábra 1.** A TRH idegsejtek (kék) AGRP (zöld) és  $\alpha$ -MSH (piros) tartalmú beidegzése a PVN-ben Kontroll (A), Éhező (B), éhezést követően 2 órán keresztül újratáplált (C), éhezést követően 24 órán át újratáplált (D) és leptin kezelt éhező állatokban.

**Táblázat 1.** Éhezés, újratáplálás és leptin kezelés hatása a PVN-ben elhelyezkedő TRH idegsejtek felszínén észlelt AGRP és  $\alpha$ -MSH axon varikozitások számának és a két típusú varikozitás arányának változására

	Control	Fasting	2h refeeding	24h refeeding	Fasting + leptin
AGRP	30.9±0.3	44.9±0.3 ↑↑↑	46.0±0.3 ↑↑↑	34.4±0.1 ↑	34.4±0.1 ↑
$\alpha$ -MSH	19.3±0.4	13.6±0.7 ↓↓↓	13.9±0.8 ↓↓↓	21.0±0.7 ↑	20.5±0.1 —
AGRP/ $\alpha$ -MSH	1.61±0.02	3.34±0.2 ↑↑↑	3.33±0.2 ↑↑↑	1.64±0.1 —	1.67±0.01 —

Továbbá kimutattuk, hogy a TRH idegsejtek beidegzésének éhezés hatására bekövetkező változása kivédhető leptin perifériás adagolásával, ami arra utal, hogy a leptin szint éhezés hatására bekövetkező csökkenése hozza létre a TRH idegsejtek beidegzésének változását. Mivel a magas zsírtartalmú diétán tartott állatokban részleges leptin rezisztencia alakul ki, megvizsgáltuk, hogy 6 hét magas zsírtartalmú diéta hogyan befolyásolja a TRH idegsejtek AGRP és  $\alpha$ -MSH tartalmú beidegzését. Azt tapasztaltuk, hogy e diéta kisebb változást idézett elő, azonban az állatok súlyának gyarapodása ellenére a TRH sejtek  $\alpha$ -MSH tartalmú beidegzése szignifikánsan lecsökkent és megnőtt az AGRP tartalmú beidegzése. Habár az a tény, hogy két óra újratáplálás után, amikor az  $\alpha$ -MSH neuronok aktiváltak, az éhező állatokhoz hasonlóan csökkent marad a TRH idegsejtek  $\alpha$ -MSH beidegzése, arra utal, hogy a beidegzés észlelt csökkenése valóban az axonok strukturális változásának következménye, az eredményeinket meg kívánjuk erősíteni transzgenikus állatok felhasználásával. A kísérletekhez beszereztünk a POMC sejtekben specifikusan Cre rekombinázt termelő egereket és floxolt mirisztilált GFP-t termelő, illetve floxolt channerrhodopsin-YFP fúziós proteint termelő egereket. Mindkét floxolt egértörzs esetében a fluoreszcens protein a sejtmembránba kerül és így kirajzolja a sejt teljes felületét. A floxolt egértörzseket kereszteztük a POMC-Cre egerekkel, hogy a fluoreszcens protein csak a POMC sejtekben termelődjön. Ezen kettős transzgenek felhasználásával, a sejtek peptid termelésétől függetlenül tudjuk vizsgálni a PVN POMC beidegzését. E vizsgálatokat jelenleg végezzük.

Vizsgáltuk továbbá a PVN parvocelluláris sejteire érkező inputok rövidtávú plaszticitását és a retrográd transzmittereknek e folyamatokban betöltött szerepét. Patch clamp elektrofiziológia alkalmazásával kimutattuk, hogy az NPY, az arcuatus idegmag orexigén idegsejtjeinek egyik peptid transzmittere, nem csak gátolja a parvocelluláris idegsejtek génexpresszióját és tüzelését, hanem gátolja ezen sejtek serkentő beidegzését is, csökkenti a parvocelluláris sejteken mérhető spontán mEPSC-k frekvenciáját. Így az NPY gátolja, hogy a parvocelluláris

idegsejteket beidegző serkentő inputok az NPY gátló hatását felülírva serkentsék a parvocelluláris idegsejteket. Az NPY ezen hatását intracellulárisan alkalmazott BAPTA (kálcium chelator) alkalmazásával gátolni lehet, ami arra utal, hogy a vizsgált sejt retrográd transzmitterek segítségével gátolja a serkentő inputokat NPY hatására. Ezt a feltételezést erősíti, hogy a nitric oxid szintázokat blokkoló L-NAME vagy a neuronális nitric oxid szintáz blokkoló nPLA és az 1-es típusú kannabinoid receptor (CB1) antagonistájának az AM251-nek együttes alkalmazása kivédi az NPY serkentő inputokra kifejtett hatását. Mivel az endokannabinoid rendszer vagy a nitric oxid (NO) rendszer blokkolása egyedül nem befolyásolja az NPY hatását, feltételeztük, hogy a parvocelluláris sejteket beidegző serkentő szinapszisokban mindkét retrográd transzmitter rendszer jelen van, így az egyik rendszer gátlása esetén még a másik rendszer képes közvetíteni az NPY gátló hatását. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai kimutatták, hogy a CB1 receptor jelen van parvocelluláris idegsejteket beidegző serkentő axon terminálisokban, azonban nem volt ismert, hogy a NO rendszer anterográd és/vagy retrográd transzmitterként működik a PVN-ben. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a neuronális nitric oxid synthase (nNOS) jelenléte megfigyelhető a parvocelluláris idegsejteket beidegző terminálisok egy részének poszt, illetve preszynaptikus oldalán. Hasonlóképpen a NO hatásainak egyik fő közvetítője a solubilis guanylate cyclase enzim (sGC) megtalálható a parvocelluláris idegsejteken található szinapszisok poszt és preszinaptikus oldalán. Ezen adataink arra utalnak, hogy a PVN-ben a NO rendszer anterográd és retrográd transzmitterként egyaránt működhet. Fény és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a parvocelluláris idegsejteket beidegző egyes serkentő szinapszisokat alkotó terminálisokban az endokannabinoid és a NO transzmitterrendszerek is egyaránt megtalálhatók.

Metabolikus profil meghatározó rendszer alkalmazásával kimutattuk, hogy a PVN-be adott CB1 antagonistá AM251 csökkenti a PVN-be adott NPY táplálkozást serkentő hatását,

azonban ez a változás nem éri el a szignifikáns szintet, de szignifikánsan csökkenti az NPY energialeadást csökkentő hatását. Az nNOS-t gátló nPLA teljes mértékben kivédi a PVN-be adott NPY táplálkozást serkentő hatását, és szignifikánsan csökkenti az NPY energialeadásra kifejtett hatását.

Feltérképeztük a hypothalamusban a CB1 receptort termelő idegsejtek megoszlását és kimutattuk, hogy a korábbi adatokkal ellentétben, a hypothalamusban GABAerg és glutamaterg idegsejtek is termelnek CB1-et.

Feltérképeztük az energiaháztartás szabályozásában fontos szerepet játszó interleukin 6 receptorának megoszlását a humán hypothalamusban és kimutattuk, hogy a receptort az MCH termelő idegsejtek termelik.

Kimutattuk, hogy a hypophysiotrop axonok, köztük a TRH axonok is, az eminencia mediána külső zónájában MCT8 pajzsmirigyhormon transzportert tartalmaznak, így képesek felvenni T3-at az eminencia mediána külső zónájában. Továbbá más hypophysiotrop rendszerekkel, például a hypophysiotrop GnRH rendszerrel ellentétben, a hypophysiotrop TRH axonoknak csak egy igen kicsi százaléka tartalmaz pajzsmirigyhormont bontó enzimet, a 3-as típusú deiodáz, ami arra utal, hogy a TRH sejtek nem tudják befolyásolni az axon terminálison keresztül a neuronba kerülő T3 mennyiségét. E felismerések megváltoztatták a TRH idegsejtek feedback szabályozásának modelljét.

Leírtuk, hogy TRH axonok szinaptikus kapcsolatot létesítenek a tuberomammilláris mag hisztaminerg idegsejtjeivel.

Kimutattuk, hogy az arcuatus mag anorexigén POMC idegsejtjei a felszálló agytörzsi pályáktól és a X-es agyidegtől függetlenül aktiválódnak újratáplálás során. Továbbá leírtunk egy arcuatus idegmag-ventrális és laterális parvocelluláris PVN- nucleus tractus solitarii (NTS) pályát, ami a POMC idegsejtek aktiváló hatását a PVN glutamaterg idegsejtjein

keresztül közvetíti az NTS felé. Feltételezzük, hogy ez a leszálló pálya befolyásolja az NTS idegsejtjeinek a X-es agyidegen keresztül érkező inputokra adott válaszát.

A TRH idegsejtek morfológiai karakterizálásán jelenleg is dolgozunk. Jelenleg rekonstruáljuk és karakterizáljuk a patch clamp elektródon keresztül biocytinnel feltöltött TRH neuronokat. A vizsgálatokhoz TRH-Cre egereket kereszteztünk Z/EG egerekkel és a TRH idegsejteket a zöld fluoreszcencia alapján azonosítottuk.

Munkánk elismeréseként összefoglaló közleményt írhatunk az Endocrine Reviews folyóiratba a hypothalamus-hypophysis-pajzsmirigy tengely centrális szabályozásáról.