

Az elért eredmények rövid ismertetése:

Kisspeptin és neurokinin B emberi reprodukcióban játszott szerepének vizsgálata (1.)

Post mortem emberi hipotalamusz minták immunhisztokémiai vizsgálatával feltérképeztük az emberi hipotalamusz kisspeptint és neurokinin B-t termelő idegsejtjeit. Leírtuk a két peptid jelentős fokú kolokalizációját az infundibuláris mag neuronjaiban. Jelentős nemi dimorfizmus meglétét tártuk fel az infundibuláris mag neurokinin B-t és kisspeptint termelő neuronjainak számában, azok rost-vetületeinek sűrűségében, és GnRH idegsejtekkel képzett kontaktusainak számában is.

A gonadotropin-inhibiting hormon, RFRP ösztrogén általi szabályozása alfa ösztrogén receptoron keresztül (2.)

A szaporodást hipotalamikus szinten szabályozó peptiderg rendszerek vizsgálatával igazoltuk, hogy a dorzomediális idegmag „RFRP” (RF-amide related peptide)-t termelő idegsejtjeinek RFRP mRNS expressziója magas ösztrogén hormon szint mellett lecsökken. Valószínűsítettük, hogy a negatív regulációért a sejtekben alacsony szintben előforduló alfa típusú ösztrogén receptor felelős. A gátló természetű RFRP peptid szintjét csökkentő mechanizmus permisszív szerepet játszhat a proösztrozus délutáni GnRH „surge” és az ezt követő ovuláció létrejöttében.

Az egér hipotalamusz glutamáterg, GABAerg és kannabinoid receptor-1 (CB1) tartalmú neuronjainak feltérképezése (3.)

In situ hibridizációs egyes- és kettős-jelölési vizsgálatokkal átfogó térképet készítettünk az egér hipotalamusz mindazon neuronjairól, melyekben az 1. típusú kannabinoid receptor (CB1) mRNS-e expresszálódik. Ezen idegsejtek hipotalamikus és extrahipotalamikus vetületeinek neurotranszmitter ürülését a poszt-szinaptikus célsejtekből felszabaduló endokannabinoidok retrográd szignalizáció révén gátolják. Párhuzamosan a CB1 mRNS térképének elkészítésével, hiánypótló munkaként az egér hipotalamusz GABAerg és glutamáterg idegsejtjeiről is egy átfogó leírást készítettünk, a GAD65 és VGLUT2 mRNS-ek megoszlásának szomszédos metszeteken elvégzett szisztematikus feltérképezésével.

Egér kisspeptin sejtpopulációinak további neurokémiai jellemzése és szerepük vizsgálata a GnRH idegsejtek beidegzésében (4.)

Kettős-*in situ* hibridizációs és immuncitokémiai vizsgálatokat használva, kimutattuk galanin és neurokinin B előfordulását a nucleus arcuatus kisspeptin idegsejtjeiben és galanin megjelenését az anteroventrális periventrikuláris mag kisspeptin neuronjaiban. Hármasszínű fluoreszcens elemzéssel százalékosan jellemeztük ezen neuropeptidek előfordulási gyakoriságát a GnRH idegsejteket innerváló, kisspeptin tartalmú axon

terminálisokban. A kontaktusok egy kis százalékában megjelenő neurokinin B kimutatásával bizonyítottuk, hogy a GnRH idegsejtek kisszeptinerg beidegzésében a nucleus arcuatus is részt vesz.

Az emberi GnRH neuronrendszer glutamaterg és GABAerg szabályozásának vizsgálata (5.).

Vizsgáltuk az emberi GnRH neuronrendszer GABAerg (VIAAT-immunreaktív) és glutamaterg (VGLUT1-immunreaktív és VGLUT2-immunreaktív) beidegzését. Főbb megállapítások: Szemben a patkányban leírtakkal, az emberi GnRH idegsejteket nem csupán VGLUT2-immunreaktív, hanem VGLUT1-immunreaktív glutamaterg neuronok is beidegzik. A legbővebb bemenetet sejttestekre GABAerg neuronok adják, míg dendriteken a GABAerg és glutamaterg (VGLUT1+VGLUT2) bemenetek száma hasonló. Végül, immuncitokémiával nem volt kimutatható VGLUT2 fehérje jelenléte a GnRH-immunreaktív idegrostokban, szemben a patkányban általunk korábban észleltekkkel.

Emberi „KNDy” neuronok vizsgálata felnőtt fiatal férfiak hypothalamusában (6.).

Immunhisztokémiai eredményeink szerint a neurokinin B (NKB) sejttestek és idegrostok sűrűsége a nucleus infundibularis területén többszörösen meghaladja a kisszeptin (KP) tartalmú idegsejteket. Ezen túl, a KP-immunreaktív idegelemek többsége dinorfint nem tartalmaz. Mindezen észleletek szerint az NKB, KP és dinorfin együttes jelenléte a feltételezett pulzus generátor idegsejtekben nem törvényszerű, avval ellentétben, ahogy ezt állatkísérletek alapján eddig feltételezték. Eredményeink megmutatták, hogy a három peptid kolokalizációjának megléte és mértéke fajtól, nemtől és életkortól egyaránt jelentősen függ.

Kisszeptin és neurokinin B idegsejtek életkor-függő morfológiai változásai emberi hipotalamuszban (7.)

Post mortem férfi hipotalamusz minták immunhisztokémiai vizsgálatával feltártuk a kisszeptin és neurokinin B rendszerek jelentős életkor-függő kiterjedését az infundibularis magban. Ez a jelölt perikaryonok számának, jelölt idegrostok sűrűségének, valamint GnRH idegsejtekkel alkotott kontaktusaik számának szignifikáns megnövekedésében nyilvánult meg. Ezen túl, a kisszeptint tartalmazó neurokinin B idegsejtek fiatal férfiakban megfigyelhető alacsony aránya (~33%) 50 év feletti férfiakban 68%-ra nőtt. Mindezen jelenségek hátterében a negatív tesztoszteron visszacsatolás gyengülését feltételezzük, melyre a kisszeptin génje a neurokinin B-t kódoló génnél érzékenyebben reagált.

Substance P jelenléte emberi kisszeptin és neurokinin B idegsejtekben (8.)

Míg rágsálókban és birkában a kisszeptin és neurokinin B idegsejtek dinorfint is tartalmaznak („KNDy” neuronok), korábbi munkánk a dinorfin hiányát mutatta ki emberi kisszeptin idegsejtekben. Az észlelet a rágsáló modell korlátozott alkalmazhatóságát is megmutatta az emberi reprodukció szabályozásának megértéséhez. Ezzel szemben, hármass-immunfluoreszcens vizsgálataink igazolták, hogy az emberi kisszeptin és neurokinin B idegsejtek tartalmazzák a rágsáló kisszeptin neuronjaiból hiányzó substance P-

t. Az infundbuláris mag substance P termelő idegsejtjei jelentős nemi dimorfizmust is mutattak. A kisspeptin/neurokinin B/substance P hármas jelölt idegrostok axo-axonális kontaktusokat is létesítettek GnRH idegsejt nyúlványokkal az infundibuláris nyélben.

Az emberi kisspeptin idegsejtek anatómiája (9.).

Összefoglaló cikkben írtuk le az emberi kisspeptin neuron rendszer ezidáig feltárt anatómiai viszonyait, összehasonlítva a laboratóriumi állatokban megfigyeltekkel.

Gonadotropin-releasing hormone neuronok kisspeptin-erg beidegzése (10.).

Nőstény egérmodellen elvégzett immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az “RP3V” agyterület kisspeptin idegsejtjeinek fele, valamint az arcuatus idegmag kisspeptin neuronjainak egynegyede GnRH idegsejtekből beidegzést nyer. Elektronmikroszkóppal a két rendszer között aszimmetrikus szinapszisokat találtunk, mely serkentő jelátvitelre utalt. Korábbi ismereteinkkel együtt, a feltárt kapcsolat megmutatta, hogy a GnRH és kisspeptin rendszerek közötti neuronális kapcsolat kétirányú.

Cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART) jelenléte emberi kisspeptin és neurokinin B idegsejtekben (11.).

Míg rágsálókban és birkában a kisspeptin és neurokinin B idegsejtek dinorfint is tartalmaznak („KNDy” neuronok), OTKA által támogatott korábbi munkánkban a dinorfin hiányát figyeltük meg az ember kisspeptin idegsejtjeiben. Egyúttal igazoltuk, hogy az emberi kisspeptin neuronok jelentős részében előfordul P anyag (SP), melyet laboratóriumi állatok kisspeptin neuronjai nem tartalmaznak. További hármas-immunfluoreszcens vizsgálatainkkal azt bizonyítottuk, hogy az emberi kisspeptin és neurokinin B idegsejtek tartalmazzák a rágsáló kisspeptin neuronjaiból hiányzó cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neuropeptidet is. Megmutattuk, hogy az infundbuláris mag CART termelő idegsejtjei részben azonosak a SP-t tartalmazókkal. A belőlük származó idegrostok beidegzik a GnRH idegsejteket és a portális ereket tartalmazó eminentia postinfundibularist. Ez az újabb vizsgálat is alátámasztja a rágsáló modell korlátozott alkalmazhatóságát az emberi reprodukció szabályozásának megértéséhez.

A ventrális tegmentális area dopamin sejtjeinek orexinerg beidegzése (12.).

Egy további anatómiai munkánk a laterális hipotalamusz orexinerg neuronjai és az emberi ventrális tegmentális area (VTA) dopaminerg sejtjei közötti axo-dendritikus beidegzést tárta fel. Összehasonlító vizsgálatokkal igazoltuk, hogy ez a kapcsolatsrendszer emberben legalább annyira jelentős szerepet tölthet be a “reward” mechanizmusokban, mint patkányban, ahol azt korábban anatómiai és élettani vizsgálatok bebizonyították.

Peptiderg rendszerek szerepének bemutatása az emberi GnRH neuronok axo-axonális szabályozásában (13.).

Kimutattuk, hogy az emberi GnRH neuronrendszer hipofizeotróp vetületei mentén kisspeptint, neurokinin B-t és Substance P-t tartalmazó idegrostok sűrű fonata, és az axonok között gyakori axo-axonális kontaktus található. Igazoltuk, hogy a GnRH neuronok gyakran hátsó hipofízisig is lehúzódó vetületei a peptiderg szabályozás lényeges támadáspontját jelentik, a morfológiailag könnyebben vizsgálható, dendriteken és sejtesten végződő peptiderg afferensek mellett.

Az emberi kisspeptin idegsejtek anatómiája (14.).

Összefoglaló cikkben jellemeztük az emberi kisspeptin neuron rendszer neurokémiai fenotípusáról ezidáig feltártakat, kiemelve a számottevő különbségeket a laboratóriumi állatokban észleltektől.

Orexin és Melanin koncentráló hormon (MCH) tartalmú bemenetek azonosítása emberi GnRH idegsejteken (15.).

Immunhisztokémiát használva igazoltuk, hogy a laterális hipotalamikusan orexin és MCH idegsejtjei közvetlenül beidegzik a mediális hipotalamusz magokban elhelyezkedő GnRH idegsejteket. Számszerűen is jellemeztük a beidegzés intenzitását, és kimutattuk, hogy az afferens kapcsolatok zöme axo-dendritikus. A laterális hipotalamusz területéről nyert bemenetek szerepet játszhatnak a szaporodásra gyakorolt metabolikus hatások közvetítésében.

Peptiderg rendszereket érintő génexpressziós változások azonosítása a nucleus arcuatus (ARC) területén (16.).

Laser capture microdissection (LCM) módszerrel hím egerek ARC területéről vett mintákból fejlődéstani változást azonosítottunk 18 neuropeptid és 15 peptid receptor expressziójában. A változások lényeges szerepet játszhatnak a pubertás mechanizmusában.

Xenoösztrogének szerepének vizsgálata pubertás precox létrejöttében (17.).

Nőstény patkány modellen vizsgáltuk a normális hormonhatásokkal interferáló környezeti ösztrogének szerepét pubertás precox keletkezésében. Rámutattunk, hogy a preoptikus kisspeptin neuronrendszer jelenti a xenoösztrogén hatás egy valószínű támadáspontját.

Jutalmazási mechanizmusokat szabályozó hipotalamikusan GABAerg és glutamaterg rendszerek azonosítása (18.).

Pályajelölés és *in situ* hibridizáció kombinált alkalmazásával azonosítottuk a ventrális tegmentális area (jutalmazási központ) GABA-erg és glutamaterg bemeneteit adó hipotalamikusan idegsejteket.

1. Hrabovszky E., Molnár C.S., Sipos M.T., Vida B., Ciofi P., Borsay B.A., Sarkadi L., Herczeg L., Bloom S.R., Ghatei M.A., Dhillon W.S., Kalló I. and Liposits Z. (2011) Sexual dimorphism of kisspeptin and neurokinin B immunoreactive neurons in the infundibular nucleus of aged men and women. *Frontiers in Genomic Endocrinology*: 2011:80

2. Molnar C.S., Kalló I., Liposits Z. and Hrabovszky E. (2011) Estrogenic regulation of RF-amide related peptide expression in the mouse hypothalamus. *Endocrinology*: 152(4):1684-1690

(IF.: 4.459)

3. Hrabovszky E., Wittmann G., Kalló I., Füzesi T., Fekete C. and Liposits Z. (2012) Distribution of type 1 cannabinoid receptor expressing neurons in the mouse hypothalamus. Colocalization with GABAergic and glutamatergic markers. *J. Comp. Neurol.*: 520(5):1005-1020

(IF.: 3.808)

4. Kalló I., Vida B., Deli L., Molnár C.S., Hrabovszky E., Caraty A., Ciofi P., Coen C.W. and Liposits Z. (2012) Co-localisation of kisspeptin with galanin or neurokinin B in afferents to mouse GnRH neurones. *J. Neuroendocrinol.*: 24(3):464-476

(IF.: 3.138)

5. Hrabovszky E., Molnár C.S., Nagy R., Vida B., Borsay B.A., Racz K., Herczeg L., Watanabe M., Kalló I. and Liposits Z. (2012) Glutamatergic and GABA-ergic innervation of human gonadotropin-releasing hormone-I neurons. *Endocrinology*: 153(6):2766-76

(IF.: 4.459)

6. Hrabovszky E., Sipos M.T., Molnár C.S., Ciofi P., Borsay B.A., Gergely P., Herczeg L., Bloom S.R., Ghatei M.A., Dhillon W.S. and Liposits Z. (2012) Low degree of overlap between kisspeptin, neurokinin B and dynorphin A immunoreactivities in the infundibular nucleus of young male human subjects challenges the KNDY neuron concept. *Endocrinology* (In press)

(IF.: 4.459)

7. Molnár C.S., Vida B., Sipos M.T., Ciofi P., Borsay B.Á., Rácz K., Herczeg L., Bloom S.R., Ghatei M.A., Dhillon W.S., Liposits Z. and Hrabovszky E. (2012) Morphological evidence for enhanced kisspeptin and neurokinin B signaling in the infundibular nucleus of the aging man. *Endocrinology* 153(11):5428–5439

(IF.: 4.717)

8. Hrabovszky E., Borsay B.A., Rácz K., Herczeg L., Ciofi P., Bloom S.R., Ghati M.A., Dhillon W.S. and Liposits Z. (2013) Substance P immunoreactivity exhibits frequent colocalization with kisspeptin and neurokinin B in the human infundibular region. PLoS One:8(8): e72369.

(IF.: 3.730)

9. Hrabovszky E. (2014) Neuroanatomy of the human hypothalamic kisspeptin system. Neuroendocrinology: 99(1):33-48.

(IF.: 3.537)

10. Kalló I., Vida B., Bardóczy Z., Szilvássy-Szabó A., Rábi F., Molnár T., Farkas I., Caraty A., Mikkelsen J., Coen C.W., Hrabovszky E. and Liposits Z. (2013) Gonadotrophin-releasing hormone axons innervate kisspeptin neurones in the female mouse brain: a pathway for feedback regulation of GnRH neurones? Neuroendocrinol.: 98(4):281-289.

(IF.: 3.537)

11. Skrapits K., Borsay B.A., Herczeg L., Ciofi P., Bloom S.R., Ghati M.A., Dhillon W.S., Liposits Z. and Hrabovszky E. (2014) Cocaine and amphetamine regulated transcript immunoreactivity is present in a subset of human hypothalamic kisspeptin and neurokinin B cells. PLoS One: 9(8):e103977.

(IF.: 3.730)

12. Hrabovszky E., Molnár C.S., Borsay B.A., Rácz K., Herczeg L. and Liposits Z. (2013) Orexinergic input to dopaminergic neurons of the human ventral tegmental area. PLoS One:8(12):e83029.

(IF.: 3.730)

13. Borsay B.A., Skrapits K., Herczeg L., Ciofi P., Bloom S.R., Ghati M.A., Dhillon W.S., Liposits Z. and Hrabovszky E. (2014) Hypophysiotropic gonadotropin-releasing hormone projections are exposed to dense plexuses of kisspeptin, neurokinin B and substance P immunoreactive fibers in the human: a study on tissues from postmenopausal women. Neuroendocrinology: 100(2-3):141-152.

(IF.: 4.373)

14. Skrapits K., Borsay B.A., Herczeg L., Ciofi P., Liposits Z. and Hrabovszky E. (2015) Neuropeptide co-expression in hypothalamic kisspeptin neurons of laboratory animals and the human. Front Neuroscience (Lausanne): 9:29.

(IF.3.656)

15. Skrapits K., Kanti V., Savanyú Z., Maurnyi C., Szenci O., Horváth A., Borsay B.Á., Herczeg L., Liposits Z. and Hrabovszky E. (2015) Lateral hypothalamic orexin and melanin-concentrating hormone neurons provide direct input to hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons in the human. *Frontiers in Cellular Neuroscience* (in press)

(IF.: 4.289)

16. Molnár C.S., Sárvári M., Vastagh C., Maurnyi C., Fekete C., Liposits Z. and Hrabovszky E. (2015) Altered gene expression profile of the hypothalamic arcuate nucleus of male mice suggests profound developmental changes in peptidergic signaling. *Neuroendocrinology* (in press)

(IF.: 4.373)

17. Kriszt R., Winkler Z., Polyák Á., Kuti D., Molnár C., Hrabovszky E., Kalló I., Szőke Z., Ferenczi S. and Kovács K.J. (2015) Xenoestrogens ethinyl estradiol and zearalenone cause precocious puberty in female rats via central kisspeptin signaling. *Endocrinology* (in press)

(IF.: 4.503)

18. Kalló I., Molnár C.S., Szőke S.E., Hrabovszky E., Fekete C. and Liposits Z. (2015) Area-specific analysis of the distribution of hypothalamic neurons projecting to the rat ventral tegmental area, with special reference to the GABAergic and glutamatergic efferents. *Frontiers in Neuroanatomy* (in press)

(IF.: 3.544)

Σ IF= 68.04