

Pályázatunkban 3 fő kérdéscsoportra kerestük a választ:

1. A hipotalamusz paraventriculáris magjában elhelyezkedő, stresszel kapcsolatos parvocelluláris neuronok GABAerg és hisztaminerg beidegzésének strukturális és funkcionális vizsgálata.

1.1. A GABAerg innerváció

1.1.1. Ultrastrukturális vizsgálatok

A stresszválasz szabályozásában lényegesek azok az ellenőrző folyamatok, melyek a stresszválasz leállításáért felelősek. A PVN CRH neuronjainak gátló szabályozásában a negatív szteroid feedback (Lsd a beszámoló 3. pontja) mellett a GABAerg gátlásnak is jelentős szerep jut. Korábbi munkáinkban elsőként igazoltuk, hogy GABAerg neuronok szimmetrikus (gátló) szinapszissal végződnek a CRH neuronokon. A jelen beszámolási periódusban végzett kutatásainkban azt vizsgáltuk, változik-e a GABAerg innerváció krónikus stressz hatására? Az állatokat 3 hétig, naponta kétszer különböző pszichogén stresszoroknak tettük ki. A krónikus stressz állapotot az állatok tömeg gyarapodásának lassulása, a mellékvesék tömegének növekedése illetve a csecsemőmirigy sorvadása igazolta. Kontroll, és krónikusan stresszelt állatok paraventriculáris magjában pre-embedding CRH és posztembedding GABA immunreakciót végeztünk és az ultravékony sorozatmetszeteket diszektor sztereológiai módszerrel elemeztük.

Krónikus stressz hatására a PVN parvocelluláris szubdivíziójában szignifikánsan emelkedik a térfogat-egységre vonatkoztatott szinapszis szám.

A GABAerg szinapszisok összes száma valamint a CRH neuronokon végződő GABAerg szinapszisok száma is emelkedik, ami arra utal, hogy krónikus stressz során egy új egyensúlyi állapot alakul ki a serkentő és gátló bemenetek közt.

Kapcsolódó publikációk:

Ildikó H. Miklós and Krisztina J. Kovács (2005) Stress-induced Plasticity of GABAergic Influence on Corticotropin-releasing Hormone (CRH) Neurons.

Neuroendocrinology of Stress Conference of American Neuroendocrine Association, San Diego, USA

Konferencia abstract

Ildikó H. Miklós and Krisztina J. Kovács (2006) Synaptic reorganization in the rat hypothalamus following chronic psychological stress. International Society of Psychoneuroendocrinology Meeting, Leiden, Hollandia

Ildikó H. Miklós and Krisztina J. Kovács (2006) Stress-induced Plasticity of GABAergic Influence on Corticotropin-releasing Hormone (CRH) Neurons. Magyar Idegtudományi Társaság Konferenciája, Budapest

Ildikó H. Miklós and Krisztina J. Kovács (2006) Reorganization of synaptic inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus after chronic variable stress

1.1.2. Funkcionális vizsgálatok a GABAerg rendszer vonatkozásában

A GABAerg rendszernek nemcsak a krónikus, hanem az akut stresszben is jelentős szabályozó szerepe lehet. A PVN CRH-t termelő sejtjeinek GABAerg innervációja a PVN közeli, GABAerg "gyűrűből" ered, de nem ismertük ezen rendszer funkcióját a stresszel-kapcsolatos CRH neuronok vonatkozásában.

GAD67-GFP transzgenikus egértörzs felhasználásával c-Fos immediate early gén aktivációs marker és a GABAerg neuronokat jelző GFP együttes kimutatásával bizonyítékokat szolgáltatunk arra vonatkozóan, hogy akut stressz hatására a gátló GABAerg rendszer is aktiválódik.

Kapcsolódó közlemények:

Bali B and Kovacs KJ (2003) GABAergic control of neuropeptide gene expression in parvocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. Eur. J. Neuroscience 18:1518-1526.

Bali B, Erdélyi F, Szabó G and Kovács KJ (2005) Visualization of stress-responsive inhibitory circuits in GAD65-eGFP transgenic mice Neuroscience Lett 380:60-65

Kovács KJ., Miklós I.H., Bali B. (2004) GABAergic Mechanisms Constraining the Activity of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis. Stress: Current Neuroendocrine and Genetic Approaches, Annals of the New York Academy of Sciences 1018: 466-476

1.2 Hisztaminerg innerváció:

1.2.1. Strukturális vizsgálatok

A hisztamin jelentős szerepet tölt be számos élettani folyamat szabályozásában, többek közt a neuroendokrin szabályozó folyamatokban és a vegetatív funkciók szabályozásában. Ennek ellenére a reguláció funkcionális anatómiai alapjai sem fénysem elektronmikroszkópos szinten nem voltak ismertek.

- Preembedding immunreakciók kombinációjával hisztaminerg rostokat mutattunk ki a paraventricularis magban, a CRH neuronokkal szoros kontaktusban.
- Elektronmikroszkópos vizsgálataink azonban nem mutattak ki szinaptikus kapcsolatot a hisztaminerg rostok és a CRH neuronok között, ami a hisztamin neuromodulációs hatását valószínűsíti.

Ezzel a részfeladattal kapcsolatban a kísérleti munka befejeződött, az eredmények dokumentálva vannak, hamarosan tervezzük egy közlemény összeállítását.

1.2.2. Funkcionális vizsgálatok

1.2.2.1. A hisztaminerg neuronok szerepe a stresszválasz szabályozásában

Funkcionális vizsgálatiaink jelentős heterogenitást mutattak ki a hisztaminerg tuberomammillaris neuronok stressz-indukálta aktiválódásában. Különböző fizikális és emocionális akut stresszorokat alkalmazva c-Fos aktivitás marker és hisztidin decarboxylase in situ hibridizációs hisztokémia kombinálásával kimutattuk hogy a hisztaminerg neuronok stresszor és almag specifikusan aktiválódnak a hátsó hipotalamuszban. Vizsgálataink elsőként mutattak rá ezen, egységesnek tartott neuronpopuláció funkcionális különbözőségére.

Kapcsolódó publikációk:

Miklós IH and Kovács KJ (2003) Functional heterogeneity of the responses of histaminergic neuron subpopulations to various stress challenges. *Eur. J. Neurosci.* 18: 3069-3079.

Kovács KJ (2004) Histamine in Neuroendocrine regulation. In: *Histamine Biology eds: Falus and Grossman*

1.2.2.2. A hisztamin szerepe a táplálékfelvétel szabályozásában

A hipotalamikus hisztamin a stresszválasz szabályozásán kívül szerepet játszik a táplálékfelvétel és a metabolizmus szabályozásában. Az OTKA támogatás keretében folytattuk azon vizsgálatainkat, melyek a hisztamin metabolikus szabályzó szerepére vonatkoztak hisztidin dekarboxylase enzim génkiütött (HDC-KO) egereken.

- A hisztamin szintézisére képtelen egerek egy specifikus metabolikus fenotípust mutatnak: idősebb korban elhíznak, az epididimális fehér zsírszövet mennyisége nagymértékben megnő, glukóz intolerancia és hiperleptinémia alakul ki az állatoknál.
- A hiperleptinémia oka a viscerális fehérzsírszövet megnövekedése.
- A HDC-KO egerekben a leptin rezisztencia nem vezethető vissza sem a hipotalamusz, sem a máj leptin receptorainak (ObRB) csökkenésére, sem a hipotalamuszban a JAK-STAT szignál transzdukciós útvonal hibájára.

Kapcsolódó közlemények:

Fülöp AK, Földes A, Buzás E., Hegyi K, Miklós IH, Romics L, Kleiber M, Nagy A, Falus A, Kovács KJ. (2003) Hyperleptinemia, Visceral Adiposity and Decreased Glucose Tolerance in Mice with a Targeted Disruption of the Histidine Decarboxylase (HDC) Gene. *Endocrinology* 144: 4306-4314.

Hegyi K, Fülöp K, Kovács K, Tóth S, Falus A. (2004) Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol. Int.* 28: 159-169.

Hegyi K, Fülöp AK, Kovács KJ, Falus A, Tóth S. (2004) High leptin level is accompanied with decreased long leptin receptor transcript in histamine deficient transgenic mice. *Immunol. Lett.* 92: 193-197.

Földes A, Jelencsics K, Pintér O, Ladjánszky-Márkus V, Kovács K J. (2005) Leptin resistance within the brainstem of histamine deficient mice. *FENS Meeting, Bécs, Ausztria*

2. Hogyan történik a hipotalamusz paraventriculáris magjában (PVN) stresszel kapcsolatos kortikotropin-releasing hormon (CRH), arginin vazopresszin (AVP) valamint az oxytocin OXY gének szabályozása különböző stresszmodellekben? Milyen transzkripciós faktorok szabályozzák a PVN endokrin és autonóm működéseket szabályozó sejtcsoportjaiban a neuropeptid génexpressziót?

2.1. Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a paraventriculáris mag stresszel kapcsolatos neuroszekréciós neuronjaiban a CRH és az AVP gének akut fizikai stressz hatására időben eltérően és más molekuláris hatásmechanizmus alapján indukálódnak. A jelen OTKA támogatás keretében vizsgálatainkat kiterjesztettük más kihívások hatásának vizsgálatára.

A GABAerg gátló tónus felfüggesztése a PVN-ben szelektíven a parvocelluláris AVP génexpresszió fokozódásához vezetett, sem a CRH expressziót a parvocelluláris neuronokban sem az AVP expressziót a magnocelluláris neuronokban nem befolyásolta.

Kapcsolódó publikáció:

Bali B and Kovács KJ (2003): GABAergic control of neuropeptide gene expression in the parvocellular neurosecretory neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus Eur J Neurosci. 18:1518-1526

Kimutattuk, hogy egy speciális immunkihívás, az anafilaxiás reakció is aktiválja a CRH és az AVP génexpressziót a PVN-ben, de a két gén expressziójának indukciója ebben az esetben időben eltér a fizikai stresszor esetében tapasztalttól. Az AVP génexpresszió fokozódás is, hasonlóan a CRH génhez igen gyors, maximumát 15 perccel az immunkihívás után éri el. Ez a jelenség arra utal, hogy a parvocelluláris neuronokban az AVP génexpressziót több transzkripció-regulációs mechanizmus illetve szignál transzdukciós útvonal szabályozhatja.

2.2. További vizsgálatainkban a metabolikus kihívások hatását tanulmányoztuk a paraventriculáris mag neuropeptidjeinek expressziójára. A Dallman munkacsoport közölte, hogy mellékveseirtott állatok fokozott CRH expressziója nemcsak a klasszikus kortikoszteroid kezeléssel, hanem magas kalória tartalmú szacharóz oldat itatásával is visszaszorítható. Mivel a mellékveseirtás patkányokon nemcsak a CRH, hanem az AVP expresszióját is jelentős mértékben fokozza a parvocelluláris neuronokban, célunk az volt, hogy kimutassuk, vajon a metabolikus feedback hasonlóképpen működik-e az AVP génexpressziójának szabályozásában. Kísérletünk váratlan eredményeket hoztak:

1. Nem sikerült megerősítenünk, hogy a szacharóz oldat hosszútávú itatása csökkentené a ADX-indukálta CRH expressziót.
2. A szacharóz itatás hatástalan maradt az ADX hatására fokozódó AVP génexpresszióra a hipofizeotrop, neuroszekréción neuronokban.
3. A cukorítatás (a mellékveseirtástól függetlenül is) AVP génexpressziót indukált a paraventrikuláris mag autonóm projekciós neuronjaiban.
4. A cukorítatás hatása az autonóm projekciós neuronokban specifikus volt az AVP génre, mert sem az oxytocin mRNS, sem a peptid tartalom nem változott.
5. Kimutattuk, hogy a Fra2 transzkripció faktor alkalmas markere a krónikusan aktiválódott neuronoknak, mert Fra-2 aktiválódott ADX hatására a PVN

Közlemény: Bali B, Bosca Z and Kovács KJ (2005) Neuroendocrine and Metabolic Challenges Recruit Distinct Functional Domains in the Rat Hypothalamic Paraventricular Nucleus Endocrine Society Meeting P1-116.

A témában még egy kiegészítő kísérlet befejezése szükséges, és az ezzel kiegészített anyagot fogjuk publikálni 2007-ben.

3. Neuropeptid génexpresszió tanulmányozása in vitro, organotipikus hipotalamusz szeleteken.

3.1. A kortikoszteroid gátlás vizsgálata organotipikus szelet tenyészeteken

Az organotipikus szelet kultúra alkalmas eszköznek bizonyult a hipotalamikus neuropeptid génexpresszió szabályozásának tanulmányozására. Előnye, hogy a szövet megőrzi az in vivo környezetre jellemző citoarchitekturát, a neuronon-neuron, neuron-glia kapcsolatokat, de nem tartalmazza azokat az extrahipotalamikus bemeneteket, melyek bonyolítják a szabályozási képet. A hipotalamikus szeletkultúra ezen előnyét használtuk ki annak a régen fennálló kérdésnek az eldöntésére, hogy van-e közvetlen szteroid feedback hatás a paraventrikuláris magban.

Eredményeink a következők:

1. A kortikoszteroid és a dexametazon gátolják a CRH génexpressziót a hipotalamusz organotipikus tenészeiben.
2. A szteroid hatás közvetlen, nem függ a neuronális bemenetektől, mert az akciós potenciálok gátlása tetrodotoxinnal nem befolyásolta a szteroidok gátló hatását.
3. A forskolin indukálta CRH expresszió kortikoszteroidokkal gátolható és nem függ a neurális inputok aktivitásától.

Ezen eredményeink a paraventrikuláris mag CRH neuronjain kifejtett közvetlen kortikoszteroid feedback hatást igazolják.

Kapcsolódó publikáció:

Bali B and Kovács KJ (2004) Glucocorticoid feedback is present in hypothalamic slice cultures. IBRO International Workshop on Neuronal Circuits: from elementary to complex functions.

A munkatervben szerepelt, hogy a CRH-hoz hasonlóan megvizsgáljuk a szteroidok hatását az AVP expresszióra is, de időközben egy hasonló témájú közlemény jelent meg japán szerzők tollából, így a továbbiakban csak a CRH expresszió szabályozásával foglalkoztunk. Eredményeink kézirat formájában, közvetlenül elküldés előtt vannak (J. Neuroendocrinology).

3.2. A lokális GABAerg gátlás hatásnak vizsgálata a PVN-re organotipikus szelet tenyészetekben

A GABAerg gátlás felfüggesztése a hipotalamusz szelet tenyészetben szelektíven fokozta a c-Fos expressziót a PVN-ben és emelte mind a CRH mRNS mind az AVP hnRNS mennyiségét.

Eredményeink arra utalnak, hogy a lokális GABAerg input gátló hatással van mind a CRH, mind az AVP génexpresszióra a PVN stresszel kapcsolatos neuronjaiban.

Kapcsolódó publikáció:

Bali B and Kovács KJ (2003): GABAergic control of neuropeptide gene expression in the parvocellular neurosecretory neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus Eur J Neurosci. 18:1518-1526

4. Egyéb, a szerződésben nem szereplő, de (részben) ezzel a támogatással megvalósult eredményeink.

A paraventriculáris mag kiemelt jelentőséggel bír a neuroendokrin és az vegetatív stresszválasz szabályozásában, integrálásában. A neuroendokrin stresszválasz afferens és efferens szabályozásáról viszonylag sok adat áll rendelkezésre ismereteink hiányosak az autonóm működések vonatkozásában. Ezért, és további vizsgálatok megalapozásaként bevezettük laboratóriumunkban a retrográd vírusjelölési technikát, mely alkalmas az egyes szervek autonóm beidegzésében résztvevő neuronhálózat felderítésére. Neuroendokrin immunológiai vizsgálatainkhoz kapcsolódik az a kísérletsorozat, amelyben feltérképeztük a csontvelő autonóm beidegzésében szerepet játszó központi idegrendszeri struktúrákat. E kísérletek "melléktermékeként" írtuk le azokat a elemi immunológiai folyamatokat az agyban, melyek a mikroglia közvetítésével zajlanak és a vírusfertőzött neuronok eliminálására vezetnek.