

## **I. Publikált és közlésre benyújtott munkák**

### **A VGLUT2 fehérje szubcelluláris megoszlása neuroendokrin idegsejtekben (1. publikáció)**

A VGLUT2 fehérje szubcelluláris megoszlását vizsgáltuk neuroendokrin idegvégződések területén. Pre-embedding immun-elektronmikroszkópiát alkalmazva megállapítottuk, hogy a VGLUT2 immunreaktivitás kis-világos szinaptikus vezikulákba lokalizálható az eminentia mediana külső zónájában, ahol a parvicelluláris neuroszekretoros rendszerek axonja végződik. Hasonlóképpen, a magnocelluláris neuroszekretoros terminálisok VGLUT2 tartalmát a hátsó hipofízis területén az oxitocint és vazopresszint szekretáló terminálisok kis-világos vezikuláiban láttuk.

### **Vér-agy gát-mentes területekre vetülő glutamáterg neuronok feltérképezése (1. publikáció)**

FluoroGold (FG) szisztémás adását és a VGLUT2 mRNS *in situ* hibridizációs kimutatását követően, lokalizáltuk a vér-agy gát mentes területekre vetülő glutamáterg idegsejteket hím patkányokban. FG-ot felvevő, és egyúttal VGLUT2 mRNS-t is expresszáló idegsejteket a paraventriculáris, supraoptikus és periventriculáris magokban, valamint a preoptikus területen figyeltünk meg.

### **Glutamáterg és GABAerg neuroendokrin rendszerekre vonatkozó ismeretek összefoglalása (2. publikáció)**

Felkérésre összefoglaló cikket írtunk a Journal of Neuroendocrinology c. folyóiratba a neuroendokrin/endokrin rendszerekben előforduló glutamát (és GABA) biológiai jelentőségéről.

### **Glicin transzporter 1 expresszió szabályozása tranziens ischémiát követően (3. publikáció)**

Leírást adtunk a gliális glicin transzporter 1 fehérje szintjének változásairól az arteria cerebri media tranziens okklúzióját és reperfüziót követően. *In situ* hibridizációs eredményekkel kiegészítve az immuncitokémiai vizsgálatokat, valószínűsítettük, hogy a fehérje szint változásainak hátterében poszt-transzkripciós folyamatok állnak.

#### **Glutamáterg sejtpopuláció azonosítása a szuprakiazmatikus idegmagban (4. publikáció)**

A VGLUT2 mRNS és immunreaktivitás hipotalamikusan megoszlását vizsgálva, a zömmel GABAerg idegsejtekből álló szuprakiazmatikus idegmagban leírtunk egy korábban nem ismert, elszórt neuronokból álló glutamáterg sejtpopulációt. Ezen ritka sejttypusban nem volt megfigyelhető a mag ismert, fő neuropeptidjeinek előfordulása.

#### **GnRH neuronok kolinerg afferenseinek jellemzése (5. publikáció)**

A reprodukciót szabályozó GnRH neuronrendszer afferens bemeneteit morfológiai eszközökkel vizsgálva, leírtunk egy eddig nem ismert, kolinerg bemenetet. A kontaktusok elektronmikroszkópos elemzésével megállapítottuk, hogy a kolinerg hatások főképp nem-szinaptikus úton érik a GnRH neuronokat.

#### **Alfa és beta ösztrogén receptort tartalmazó idegsejtek jellemzése a hipotalamusz szuprakiazmatikus idegmagyában (6. publikáció)**

A két ösztrogén receptor altípus immunhisztokémiai megjelenítésével karakterizáltuk a mag ösztrogén-receptív idegsejtjeit. Megállapítottuk, hogy a magban a béta receptor izoforma a domináns. Leírtuk a receptorok megoszlásának nemek közti különbségeit és ösztrogén hormon státusztól való függését. Kolokalizáltuk a receptorokat a mag többféle fenotípusú, de elsősorban kalbindint tartalmazó neuronjaiban.

#### **Az adenohipofízis további glutamáterg mirigysejtjeinek karakterizálása (7. és 12. publikációk)**

Az adenohipofízisben korábban általunk leírt VGLUT2 transzporter izoforma mellett, kimutattuk, hogy a VGLUT1 izoforma is megjelenik az endokrin sejtek egy alcsoportjában. Míg a VGLUT2 a gonadotróf és tirotróf sejtek glutamáterg fenotípusát közvetíti, addig a VGLUT1 csaknem kizárólag az ACTH-immunreaktív kortikotróf sejtekben fordult elő.

#### **Génexpressziós profil ösztrogén általi regulációja a GnRH neuronok *in vitro* modelljét jelentő GT1-7 sejtvonalon (8. publikáció)**

Microarray módszerrel azonosítottuk a GnRH-t termelő GT1-7 idegsejtek ösztrogén által szabályozott génjeit, és jellemeztük az ösztrogén-függő expressziós változások időbeli lefutását.

### **Matematikai modellek felállítása GnRH neuronok elektrofiziológiai sajátosságainak jellemzésére (9. és 16. publikációk)**

Matematikai modelleket állítottunk fel GnRH neuronok alap elektrofiziológiai tulajdonságainak és a „burst” jelenségének modellezésére. A modell működését elektrofiziológiai kísérletekkel a gyakorlatban ellenőriztük.

### **Retrográd kannabinoid szignalizáció okozta gátlás kimutatása egér GnRH idegsejtek GABAerg bemeneteiben (10. publikáció)**

Elektrofiziológiai vizsgálatsorozattal megmutattuk, hogy az endokannabinoid jelátviteli rendszer gátló hatást gyakorol a GnRH idegsejtek működésére, melyet GABAerg idegi bemenetek közvetítenek. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal is megerősítettük a CB1 receptor jelenlétét a GnRH neuronokon szimmetrikus szinapszist képező idegi afferensekben.

### **Kisspeptin és neurokinin B emberi reprodukcióban játszott szerepének vizsgálata (11. és 17. publikációk)**

*Post mortem* emberi hipotalamusz minták immunhisztokémiai vizsgálatával feltérképeztük az emberi hipotalamusz kisspeptint és neurokinin B-t termelő idegsejtjeiről. Leírtuk a két peptid jelentős fokú kolokalizációját az infundibuláris mag neuronjaiban. Kizárólag női szövetmintákban kimutattuk egy korábban ismeretlen kisspeptin sejtcsoport létezését, mely a rágcسالók anteroventrális periventrális területének nemi dimorfizmust mutató neuronjaihoz hasonló. Jelentős nemi dimorfizmus meglétét tártuk fel az infundibuláris mag neurokinin B-t és kisspeptint termelő neuronjainak számában, azok rostvetületeinek sűrűségében, és GnRH idegsejtekkel képzett kontaktusainak számában is.

### **Ösztrogén hormonok magasabb rendű agykérgi működésekben játszott szerepének elemzése microarray vizsgálatokkal (13, 14. és 19. publikációk)**

Ovariektomizált patkányok akut és krónikus ösztrogén pótlását alkalmazó modellekben azonosítottuk az ösztrogén hormonok által szabályozott gének változásait. A változásokat független módszertani megközelítéssel erősítettük meg.

Az eredmények segítenek a poszt-menopauzális hormonpótlás kognitív működésekre gyakorolt jótékony hatásainak értelmezésében. Ösztrogének agykérgi hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy egy rágszáló menopauza modellben az ösztradiol szabályozza számos inflammatorikus gén expresszióját is. Ösztrogén receptor izotípus szelektív agonisták használatával igazoltuk, hogy a szabályozásban mindkét ösztrogén receptor izotípus részt vesz.

### **Egér vazopresszin és kisszeptin idegsejtjeinek szerepe cirkadián szignálok közvetítésében a GnRH idegsejtek felé (15. publikáció)**

Leírtunk egy két-neuronos pályát, mely a szuprakiazmatikus mag vazopresszint és az anteroventrális periventrikuláris mag kisszeptint termelő idegsejtjeinek közvetítésével juttathat cirkadián információt a GnRH idegsejtek felé. Hipotézisünk szerint ez a neuronpálya felelős elsősorban a proösztrosz délutáni GnRH/LH surge pontos napszaki időzítéséért.

### **A gonadotropin-inhibiting hormon, RFRP ösztrogén általi szabályozása alfa ösztrogén receptoron keresztül (18. publikáció)**

A szaporodást hipotalamikusan 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 proösztrosz délutáni GnRH „surge” és az ezt követő ovuláció létrejöttében.

### **Az emberi GnRH neuronrendszer glutamáterg és GABAerg szabályozásának vizsgálata (20. publikáció).**

Az első körben az Endocrinology c. folyóiratban kedvező bírálatot kapó, jelenleg revízió alatt álló új kéziratunk az emberi GnRH neuronrendszer GABAerg (VIAAT-immunreaktív) és glutamáterg (VGLUT1-immunreaktív és VGLUT2-immunreaktív) beidegzését vizsgálta és hasonlította össze szemikvantitatív módon is. Főbb megállapítások: Szemben a patkányban leírtakkal, az emberi GnRH idegsejteket nem

csupán VGLUT2-immunreaktív, hanem VGLUT1-immunreaktív glutamáterg neuronok is beidegzik. A legbővebb bemenetet sejttestekre GABAerg neuronok adják, míg dendriteken a GABAerg és glutamáterg (VGLUT1+VGLUT2) bemenetek száma hasonló. Végül, immuncitokémiával nem mutatható ki VGLUT2 fehérje jelenléte a GnRH-immunreaktív idegrostokban. Mivel az utóbbi negatív észlelet oka lehet technikai is (egérben sem tudunk a patkányban látotthoz hasonló kolokalizációs jelenséget kimutatni), az emberi GnRH idegsejtek aminosav fenotípus karakterizálását kettős-*in situ* hibridizációval is próbáljuk a továbbiakban tanulmányozni.

DNS technikák alkalmazásával előállítottunk egy olyan plazmid DNS konstrukciót, mely fúziós fehérje bakteriális expressziójára alkalmas. Ennek alkalmazásával EColi baktériumban a humán VGLUT2 fehérje egy szakaszát GST fehérje C-terminálisához kötötten állítottuk elő. A fehérjével egerek immunizálását végeztük el és az emberi VGLUT2 ellen poliklonális antitestet állítottunk elő.

### **Az egér hipotalamusz glutamáterg, GABAerg és kannabinoid receptor-1 (CB1) tartalmú neuronjainak feltérképezése (21. publikáció)**

*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 kisszeptin sejtpopulációinak további neurokémiai jellemzése és szerepük vizsgálata a GnRH idegsejtek beidegzésében (22. publikáció)**

Kettős-*in situ* hibridizációs és immuncitokémiai vizsgálatokat használva, kimutattuk galanin és neurokinin B előfordulását a nucleus arcuatus kisszeptin idegsejtjeiben és galanin megjelenését az anteroventrális periventrikuláris mag kisszeptin neuronjaiban. Hármasszínű fluoreszcens elemzéssel százalékosan jellemeztük ezen neuropeptidek

előfordulását a GnRH idegsejteket innerváló, kisspeptin tartalmú axon terminálisokban. A kontaktusok egy kis százalékában megjelenő neurokinin B kimutatásával bizonyítottuk, hogy a GnRH idegsejtek kisspeptinerg beidegzésében a nucleus arcuatus is részt vesz.

## **II. Pályázatból támogatott, nem publikált munkák**

### **VGLUT2 fehérje szubcelluláris megoszlása az adenohipofízisben**

Immun-elektronmikroszkópos kísérleteket végeztünk el a VGLUT2 fehérje ultrastrukturális megoszlásának tanulmányozására. Kolloidális arannyal jelölt ultravékony metszetek elektronmikroszkópos elemzésével megállapítottuk, hogy az adenohipofízis VGLUT2 tartalma dense-core vezikulákhoz (és nem mikrovezikulákhoz) asszociált. A lokalizáció így eltér az idegszövetekből ismert szubcelluláris megoszlástól. Korábbi vizsgálati eredményeinkkel együtt, melyek a VGLUT2-t gonadotroph és thyrotroph sejtekbe lokalizálták, az új észlelet azt sugallja, hogy a glutamát LH, FSH és TSH hormonokkal együtt ürülhet az adenohipofízis egyes sejttypusaiból fiziológias stimulusok hatására.

### **VGLUT2 mRNS expressziós változásai endokrin modellekben**

Laktáló anyaállatban vizsgálatuk a VGLUT2 mRNS expresszió magnocelluláris neuronokon belüli változásait. A sóterheléshez által vazopresszin neuronokban okozotthoz hasonló VGLUT2 mRNS növekedés (Hrabovszky és mtsai, Neurochemistry International, 2006) nem volt oxitocin neuronokban kimutatható. A stress okozta változások elemzése CRH neuronokban és az ösztrogén szint-függő esetleges változások kimutatása GnRH neuronokban szintén nem hozott kimutatható különbséget.

### **A GnRH sejt-specifikus VGLUT2 gén-kiütött (KO) egerek előállítására és vizsgálata**

Dr. Catherine Dulac 2010-ben laboratóriumunk rendelkezésére bocsájtotta a GnRH promoter-specifikus módon Cre fehérjét termelő transzgén egértörzset, melyet a pontos expressziót okozó „BAC” technológia használatával állítottak elő. Ugyancsak ebben az évben behoztuk intézetünkbe Dr. B. Lowell „floxolt” VGLUT2-KO egerét.

A két törzs steril rederiválása, genotípezálásának beállítása, valamint keresztezésük után rendelkezünk állatok GnRH neuron-specifikus módon VGLUT2-génkiütött egerek. A glutamát-hiányos GnRH neuronokat tartalmazó állatok kezdeti karakterizálását elvégeztük. Durva szaporodásbiológiai eltérést nem láttunk a pubertás megjelenésének idejében, az utódok számában. Jelenleg folyamatban van finomabb eltérések keresése. Közben az általunk 2004-ben patkányban leírt (Hrabovszky és mtsai, *Endocrinology*) GnRH/VGLUT2 kolokalizációs jelenség érvényességét egérre a VGLUT2-GFP egértörzs jellemzésével Dumalska és mtsai 2008-ban megerősítették (*J Neurosci.* 28(32):8003-13).

#### **Az OTKA 69127 pályázat támogatásával készült folyóirat cikkek**

1. Hrabovszky E., Deli L., Turi G.F., Kalló I. and Liposits Zs. (2007): Glutamatergic innervation of the hypothalamic median eminence and posterior pituitary of the rat. *Neuroscience*: 144:1383-1392
2. **Hrabovszky E.** and Liposits Z. (2008) Novel aspects of glutamatergic signalling in the neuroendocrine system. *J. Neuroendocrinol.*: 20(6):743-751
3. Kalló I., Jekkel C., Hrabovszky E., Jurányi Z., Vida B., Járasi A., Wilhelm T., Harsing L.G., Jr. and Liposits Z. (2008) Immunohistochemical and *in situ* hybridization studies on glycine transporter 1 after transient ischemia in the rat forebrain. *Neurochem. Int.*: 52(4-5):799-808.
4. Kiss J., Halász, B., Csáki Á., Liposits Z. and Hrabovszky E. (2007) Vesicular glutamate transporter 2 protein and mRNA containing neurons in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of the rat. *Brain Res. Bull.*: 74:397-405
5. Turi G.F., Liposits Z. and Hrabovszky E. (2008) Cholinergic afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons of the rat. *Neurochem. Int.*: 52(4-5):723-728
6. Vida B., Hrabovszky E., Kalamatianos T., Coen C.W., Liposits Z. and Kalló I. (2008) Oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in the suprachiasmatic nucleus of the male and female mice. *J. Neuroendocrinol.*: 20(11):1270-1277
7. Kocsis S.Z., Kalló I., Wittmann G., Fekete C., Liposits Z., Hrabovszky E. (2009): Occurrence and phenotype of glutamatergic elements in the

adenohypophysis of the rat. 12th Annual Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, Budapest, Hungary

8. Varju P., 1, Ken Chang, C.N. Hrabovszky E., Merchenthaler I. and Liposits Z. (2009) Temporal profile of estrogen-dependent gene expression in LHRH-producing GT1-7 cells. *Neurochem. Int.*: 54:(2)119-134
9. Csercsik D., Farkas I., Szederkenyi G., Hrabovszky E., Liposits Z. and Hangos K. (2010) The Hodgkin-Huxley type modelling and parameter estimation of GnRH neurons. *Biosystems*: 100(3):198-207
10. Farkas I., Kallo I., Deli L., Vida B., Hrabovszky E., Fekete C., Moenter S.M., Watanabe M. and Liposits Z. (2010) Retrograde Endocannabinoid Signaling Reduces GABA-ergic Synaptic Transmission to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Endocrinology*: 151(12):5818-5829
11. Hrabovszky E., Ciofi P., Vida B., Horvath M.C., Keller É., Caraty A., Bloom S.R., Ghatei M.A., Dhillon W.S., Liposits Z. and Kallo I. (2010) The kisspeptin system of the human hypothalamus. Sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur. J. Neurosci.*: 31:1984-1998
12. Kocsis Z.S., Molnár C.S., Watanabe, M., Daneels G., Moechars D., Liposits Z. and Hrabovszky E. (2010) Demonstration of vesicular glutamate transporter-1 in corticotroph cells in the anterior pituitary of the rat. *Neurochem. Int.*: 56(3):479-486
13. Sarvari M., Hrabovszky E., Kallo I., Galamb O., Solymosi N., Liko I., Molnar B., Tihanyi K., Szombathelyi Z., Liposits Z. (2010) Gene expression profiling identifies key estradiol targets in the frontal cortex of the rat. *Endocrinology*: 151(3):1161-1176
14. Sarvari M., Kallo I., Hrabovszky E., Solymosi N., Toth K., Likó I., Molnar B., Tihanyi K. and Liposits Z. (2010) 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
15. Vida B., Deli L., Hrabovszky E., Kalamatianos T., Caraty A., Coen C.W., Liposits Z. and Kalló I. (2010) Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurons innervating kisspeptin neurons in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. *J. Neuroendocrinol.*: 22(9):1032-1039



16. Csercsik D., Farkas I., Hrabovszky E. and Liposits Z. (2011) A simple integrative electrophysiological model of bursting GnRH neurons *J. Comput. Neurosci.*: 1-18
17. 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
18. 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
19. Sárvári M., Hrabovszky E., Kalló I., Solymosi N., Tóth K., Likó I., Széles J., Mahó S., Molnár B. and Liposits Z. (2011) Estrogens regulate neuroinflammatory genes via estrogen receptor alpha and beta in the frontal cortex of middle-aged female rats. *J.Neuroinflamm.*: 8:82
20. Hrabovszky E., Molnár C.S., Nagy R., Kalló I., Borsay B., Sarkadi L., Herczeg L., Watanabe M. and Liposits Z. (2011) Glutamatergic and GABAergic innervation of GnRH neurons in the human hypothalamus. *Endocrinology*. (Submitted)
21. 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.*: (2011 Sep 20. doi: 10.1002/cne.22766)
22. 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.*: (2011 Nov 30. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02262.x.)

**Fentiekből az OTKA támogatást feltüntető, és már elfogadott cikkek össz-impaktja: 65.98**